The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Mosul / College of Science
Department of Biology

The lipopolysaccharide (LPS) of *Pseudomonas aeruginosa* as a potential vaccine

Nuha AbdulRazaq Hameed Abed Al-Majmaa

Ph.D. Dissertation

Biology / Microbiology

Supervised By

Prof. Dr.

Hiyam Adil Ibrahim Al-Taii

1445 A.H. **2024 A.D.**

Abstract

This study was conducted to evaluate the effectiveness, immunogenicity and protection efficacy of the *Pseudomonas aeruginosa* D-LPS-Carrier conjugates, following challenge with the virulent isolates of *P. aeruginosa* in control and immunized mice.

In the present study, a total of (122) specimen from both ages and genders was collected from hospitalized patients from March 2021 to mid-May 2021. These specimens were collected from (urine, burn swabs, wound swabs, and sputum). Depending on the microscopic, cultural, biochemical identification, API (Analytical Profile Index) 20E Test and VITEK2 system, 49 (40.16%) of *P. aeruginosa* isolates were obtained, including 23/49 (46.9%) from urine, 12/49 (24.5%) from burns, 10/49 (20.4%) wounds, and 4/49 (8.2%) from Sputum.

Qualitative and quantitative biofilm formation by *P. aeruginosa* isolated using the Congo red agar (CRA) and Microtiter plat assay (MTP) revealed that (63.27%) and (89.81%) are biofilm producers, respectively. The results of antibiotics susceptibility test for the (49) isolates of *P. aeruginosa* against 9 different antibiotic from (5) classes showed a highest resistance to ceftazidime (77.55%), ciprofloxacin (73.47%), and less resistance against imipenem (44.90%) and meropenem (48.98%).

DNA from 18 isolates of *P. aeruginosa* was extracted with high purity and the identification of isolates was confirmed for all *P. aeruginosa* isolates using *16S rRNA* gene. The molecular virulence genes detection results highlighted that *lasB* and *plcH* genes were found in all *P. aeruginosa* isolates followed by *pilB* (66.67%) and *exoS* (11.11%) and the results of the virulence genes was confirmed by sequencing and comparing them to submitted counterparts in NCBI.

The Lipopolysaccharide (LPS) was extracted from virulent isolate of *P. aeruginosa* using three different methods and the results showed high yielding and purity compared with standard LPS. Rabbit pyrogen test (RPT) of extracted LPS demonstrates its biological activity and pyrogenic nature of the endotoxin. The results of (RPT) also showed that the detoxified LPS (D-LPS) and D-LPS-carrier conjugates were non-pyrogenic when tested at a dose of 10 µg/kg and evoked < 0.6°C increase in temperature after 3 h of the test proving its safety.

The results also revealed that D-LPS- conjugate vaccine based LPS of *P. aeruginosa* and protein including Bovine serum albumin (BSA) and diphtheria toxoid DT (CRM197) or Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) Nanoparticles carriers was successfully synthesized and the success of the binding was confirmed by using gel filtration and Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR).

To evaluate the antigenicity of the D-LPS-BSA, D-LPS-DT and D-LPS-PLGA NPs conjugate vaccines, 96 male BALB/c mice (6-8 weeks old, 20-30 g) were divided into 8 groups (12 per group) and injected subcutaneously at a dose of 10 µg/ml three times at 1-week intervals for six weeks; followed by bacterial challenge test to confirm the potential *in vivo* efficacy of *P. aeruginosa* D-LPS conjugate vaccine. The study revealed that there were no observed weight changes in control and immunized mice.

The notable observation in the immunogenicity study was the significant increase of IgG titers against the D-LPS-PLGA NPs followed by D-LPS-DT (CRM197) and D-LPS-BSA conjugate. Mice immunized with D-LPS-PLGA NPs conjugate elicited fivefold higher IgG antibody in comparison to D-LPS only. The results also showed A highly significant elevation ($P<0.05$) was observed in the serum pro-inflammatory cytokine profiles (Interleukin 6 (IL-6), Interleukin1β (IL-

1β), and Tumor necrosis factor α (TNF-α) in infected control mice while it was significantly lower in D-LPS-conjugated vaccine group provide evidence for the efficacy of the *P. aeruginosa* vaccine.

The hematological test results revealed a significant increase in total WBC count and differential WBC count with remarkable rise in lymphocytes, granulocytes, and mid in the infected control group than the infected immunized group.

Histopathologically, infected control mice showed severe damage to the liver, lung, and spleen compared to the infected immunized mice. Liver histology included blood vessel congestion, inflammatory cell infiltration, and necrosis. Lung alterations include alveolar wall and septal thickening, inflammatory cell infiltration, capillary congestion, and necrosis. Finally, spleen histology shows necrosis, inflammatory cells, and blood vessel congestion.

This study evaluated the protective efficacy of D-LPS-conjugates in a mouse model infected with *P. aeruginosa*. All mice survived after immunization with D-LPS-PLGA NPs conjugate (100% protection). In addition, D-LPS-DT (CRM197) conjugate immunization protected 90% of mice, and only one died after 5 days. This demonstrates that immunization prolonged the survival of mice following challenge test. Furthermore, the protective efficiency of D-LPS-BSA conjugation was 40%, considerably lower than mice immunized with other conjugates. This suggests that the D-LPS-BSA conjugate may partially mediate protection, but its efficacy is not entirely full.

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لتقييم الفعالية, المستضدية وكفاءة الحماية لمقترنات متعدد السكريات الدهني المزال سميته لبكتيريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* مع النواقل بعد اجراء اختبار التحدي للعزلات الضارية لبكتريا *P.aeruginosa* للفئران السيطرة و الممنعة.

في الدراسة الحالية، تم جمع (122) عينة من المرضى الراقدين في المستشفى لكلا الجنسين ومختلف الأعمار, خلال الفترة من آذار 2021 الى منتصف آيار 2021. جمعت هذه العينات من (الادرار, مسحات الحروق, مسحات الجروح، والبلغم). واعتمادا على الصفات المجهرية، الزرعية، الاختبارات البايوكيميائية، ونظام API 20E وVITEK2 تم الحصول على 49 (40.16 %) من عزلات *P. aeruginosa* تتضمن 49/23 (46.9%) من الادرار، 49/12 (24.5%) من الحروق، 49/10 (20.4%) من الجروح و49/4 (8.2 %) من البلغم.

بينت نتائج الكشف عن تكوين الاغشية الحيوية نوعياً وكمياً من قبل عزلات *P. aeruginosa* باستخدام طريقة اكار الكونكو الاحمر Congo red agar (CRA) وطريقة مقايسة صفيحة المعايرة الدقيقة Microtiter plate assay (MTP) تكوين الاغشية بنسبة (63.27%) و (89.81%) على التوالي. كما اظهرت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لـ49 عزلة من بكتريا *P. aeruginosa*, ضد (9) من المضادات الحيوية تابعة لخمس اصناف, ان اعلى مقاومة كانت للمضادات ceftazidime بنسبة (77.55%) و ciprofloxacin بنسبة (73.47%) و كانت اقل مقاومة ضد المضاد الحيوي imipenem بنسبة (44.9%) و meropenem بنسبة (48.98%).

تم استخلاص الحمض النووي لـ18 عزلة من *P.aeruginosa* بدرجة نقاء عالية وتم تأكيد التشخيص لجميع عزلات *P.aeruginosa* باستخدام جين *16S rRNA*. كما ابرزت نتائج الكشف الجزيئي للجينات الضراوة عن وجود جين *LasB* و *plcH* في كل عزلات *P.aeruginosa* يليه جين *pilB* بنسبة (66.67%) وجين *exoS* بنسبة (11.11%), وقدتم تأكيد هذه النتائج من خلال اجراء التسلسل لجينات الضراوة ومقارنتها مع التسلسلات المشابهة المسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية NCBI.

تم استخلاص متعدد السكريد الدهني Lipopolysaccharide (LPS) من العزلة الضارية لبكتيريا *P. aeruginosa* وباستخدام ثلاثة طرق مختلفة, واظهرت النتائج استخلاص متعدد السكريد الدهني بنقاوة وانتاجية عالية للـ LPS المستخلص مقارنة مع الـ LPS القياسي. كما اظهر اختبار البايروجين في الارانب Rabbit pyrogen test (RPT) للـ LPS المستخلص فعاليته البايولوجية وطبيعته المولدة للحرارة للسموم الداخلية. بالاضافة الى ذلك, أظهرت نتائج اختبار RPT ايضا ان مستخلصات الـ LPS المزال سميتها ومقترنات متعدد السكريد الدهني خالي من المواد السمية مع النواقل Detoxified-LPS -carrier conjugate هي مستخلصات غير بيروجينية (خالية من المواد المولدة للسموم) عند اختبارها بجرعة 10 مايكروغرام لكل كيلوغرام واثارت زيادة في درجة الحرارة اقل من 0.6 درجة مئوية بعد3 ساعات من الاختبار مما يثبت سلامتها.

أظهرت النتائج أيضآ نجاح وفاعلية تصنيع اللقاح المعتمد على استخدام الـ LPS لبكتيريا *P. aeruginosa* مع النواقل البروتينية التي تتضمن البومين المصر البقري bovine serum albumin (BSA) و توكسويد الدفثيريا Diphtheria toxoid DT (CRM197) بالاضافة الى حوامل المواد النانوية التي تتضمن Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles vaccine based LPS. وتم تأكيد نجاح الارتباط بأستخدام الترشيح الهلامي gel filtration والتحليل الطيفي للأشعة تحت الحمراء (FT-IR).

لغرض تقييم المستضدية للقاحات المقترنة DLPS-PLGA NPs و-D-LPS, D-LPS-BSA DT(CRM197) تم استخدام 96 فأرا من نوع BALB/C بعمر من 6 إلى 8 اسبوع ووزن 30 - 20 غرام وتم تقسيمها في 8 مجموعات 12 لكل مجموعة وتم حقنها تحت الجلد بجرعة 10 ميكروغرام /مل ، ثلاث مرات بفاصل اسبوع لمدة 6 اسابيع ثم تبعه اختبار التحدي البكتيري لتأكيد فعالية اللقاح المقترن لبكتيريا *P. aeruginosa* في الجسم الحي. وكشفت الدراسة انه لم تكن هناك أي تغيرات ملحوظة في اوزان فئران السيطرة والممنعة.

أظهرت نتائج الدراسة زيادة كبيرة في مستوى الاجسام المضادة من نوع IgG لـ D-LPS-PLGA NPs يليه D-LPS-DT (CRM197) ثم D-LPS-BSA مقارنة بفئران السيطرة. الفئران الممنعة

بواسطة D-LPS-PLGA NPs المقترن حفز تكوين الأجسام المضادة IgG بمقدار 5 أضعاف مقارنة ب-D LPS فقط. النتائج ايضا اظهرت ارتفاع كبير للغاية ($p<0.05$) في مستويات السايتوكينات المحرضة للالتهابات Pro-inflammatory cytokines (TNF-a, IL-IB, IL6) في مصل فئران السيطرة المصابة بينما كان أقل بشكل ملحوظ في مجموعاميع الفئران الممنعة باللقاحات المقترنة D-LPS وهذا دليل على فعالية لقاح *P. aeruginosa*.

كشفت نتائج فحص الدم اختلافات كبيرة ($p<0.05$) بين مجاميع الفئران المحصنة المصابة مقارنة بمجاميع فئران السيطرة، حيث أظهرت النتائج زيادة ملحوظة في العدد الكلي والتفريقي لكريات الدم البيضاء مع ارتفاع ملحوظ في الخلايا الليمفاوية والخلايا المحببة والMid في مجموعة فئران السيطرة المصابة مقارنة بالمجموعة الممنعة من الفئران.

بينت الدراسة المرضية النسيجية وجود ضرر شديد في الكبد والرئة والطحال في فئران السيطرة المصابة مقارنة بالفئران الممنعة المصابة. التغيرات النسيجية في الكبد تمثلت بأحتقان الأوعية الدموية وارتشاح الخلايا الالتهابية وتنكس وتنخر خلايا الكبد .التغيرات في الرئة تميزت بسماكة في الجدار السنخي والحاجز، وارتشاح الخلايا الالتهابية، واحتقان الشعيرات الدموية وانتفاخ الرئة، وانحطاط الخلايا الظهارية ونخرها. واخيرا تغير نسيجي في الطحال يظهر نخرا مع وجود خلايا التهابية واحتقان وتوسع في الأوعية الدموية.

قيمت هذه الدراسة الفعالية الوقائية لمقترنات D-LPS في الفئران لعدوى *P. aeruginosa*. واظهرت النتائج نجاة جميع الفئران بعد التمنيع باستخدام D-LPS-PLGA NPs بحماية 100%. أظهرت نتائج التمنيع بالمقترن D-LPS-DT (CRM197) حماية 90% من الفئران وتوفي فأر واحد بعد 5 ايام، وهذا يدل على أن التحصين أطال فترة بقاء الفئران على قيد الحياة بعد جرعة التحدي. وبالاضافة لذلك كان لاقتران D-LPS-BSA فعالية وقائية بنسبة 40% اي اقل بكثير من الفئران المحصنة باللقاحات المقترنة الأخرى، مما يشير إلى أن اتحاد D-LPS-BSA يمكنه توفير الحماية ولكن ليس بشكل كامل.

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

متعدد السكريات الدهني لبكتريا الزوائف الزنجارية كلقاح محتمل

نهى عبد الرزاق حميد عبد المجمع

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة / احياء مجهرية

بإشراف

الأستاذ الدكتورة

هيام عادل إبراهيم الطائي

1445هـ **2024م**