مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۱، شماره ۱، بهار ۹۰، صفحات ۷ تا ۱۳

Original Article

تهیه و ارزیابی فیزیکوشیمیایی وزیکول غشاء خارجی نیسریا مننژیتیدیس سروگروه A به عنوان کاندیدای واکسن مننگوکوکی

سید علی دلباز[۱]، سید داور سیادت[۲]، محمدرضا آقا صادقی[۲]، مهرانگیز زنگنه[۳]، سید مهدی سادات[۲]، جلال صولتی[۴]، رضا قربانی[۵]، ارفع مشیری[۶]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج
[۲] استادیار، گروه هپاتیت وایدز، انستیتو پاستور ایران
[۳] دانشیار، گروه بیماری‌های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۴] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج
[۵] دانشجوی کارشناسی علوم آزمایشگاهی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۶] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: *واکسن‌های پلی‌ساکاریدی نیسریا مننژیتیدیس سروگروه A به علت ایجاد پاسخ‌های مستقل از لنفوسیت T دارای معایبی هستند. در نتیجه پژوهش‌های زیادی برای جایگزین کردن آنها با اجزاء دیگر باکتری انجام شده است که می‌توان به وزیکول غشاء خارجی (OMV) حاوی PorA اشاره کرد. در پژوهش حاضر، پس از استخراج و ارزیابی بیولوژیکی OMV نیسریامننژیتیدیس سروگروه A ،توان القاء سنتز آنتی‌بادی بر علیه آن در حیوان آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *استخراج OMV پس از کشت انبوه نیسریامننژیتیدیس سروگروه A توسط روش سیادت و همکاران انجام شد. سپس خصوصیات فیزیکو- شیمیایی OMV با استفاده ازمیکروسکوپ الکترونی، SDS-PAGE و وسترن بلات ارزیابی شد. مقدار LOS موجود در OMV با استفاده از آزمون LAL و توان OMV درالقاء آنتی‌بادی اختصاصی با استفاده از الایزا بررسی شد.*

یافته‌ها: *مقدارپروتئین موجود در OMV، ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم اندازه‌گیری شد. اندازه OMV ۵۰ تا ۱۵۰ نانومتر بود و در ارزیابی SDS-PAGE محدوده PorA درناحیه ۴۰kDa-۳۵ قرار داشت که با روش وسترن نیز تائید شد. مقدار LOS در آزمون LAL در محدوده مجاز مصرف گزارش شد. افزایش عیار معنی‌داری درمقدار IgG پس ازاولین تزریق مشاهده شد.*

نتیجه‌گیری: *OMV در طی مراحل استخراج، شکل فضایی خود را حفظ نموده و توان القاء عیار بالایی از آنتی‌بادی‌های اختصاصی بر علیه نیسریا مننژیتیدیس سروگروه A را دارد. به همین دلیل می‌تواند پس از بررسی فازهای بالینی کاندید واکسن مننگوکوکی شود.*

واژگان کلیدی: *نیسریامننژیتیدیس، وزیکول غشاءخارجی (OMV)، PorA.*

مقدمه

نیسریا مننژیتیدس یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده مننژیت باکتریایی محسوب می‌شود.این باکتری براساس تفاوت درساختار پلی‌ساکارید کپسولی‌اش به ۱۳ سروگروه مختلف تقسیم می‌شود که ۵ سروگروه A، B، C، Y و W135 جزو پاتوژن‌های اصلی انسان به شمار می‌روند. سروگروه‌های B و C مننگوکوک سبب اکثر موارد ابتلا به عفونت‌های مننگوکوکی در اروپا و آمریکا هستند و این درحالی است که سروگروه A مننگوکوک شیوع زیادی رادر آسیا و آفریقا دارد که بیشتر این موارد در کشورهای

آدرس نویسنده مسئول: تهران، انستیتو پاستور ایران، گروه هپاتیت وایدز، دکتر سید داور سیادت
(email: d.siadat@gmail.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱/۱۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۸/۳۰

Sub-Saharan آفریقا روی می‌دهد و به این مناطق کمربند مننژیتی می‌گویند. این منطقه از اتیوپی در شرق آفریقا و تا سنگال در غرب امتداد دارد و جمعیتی بالغ بر ۳۰۰ میلیون نفر را در بر می‌گیرد (۳-۱).

ترکیب شیمیایی کپسول پلی‌ساکاریدی سروگروه A مننگوکوک، هوموپلی‌مری از N- استیل مانوز آمین فسفات است که با اتصالات $\alpha 1 \rightarrow 6$ به هم متصل می‌شوند (۴،۳). بر خلاف پلی‌ساکارید کپسولی سروگروه B مننگوکوک که به علت شباهت به گلیکوپروتئین‌های پلی سیاله شده سلول‌های انسانی نمی‌تواند ایمونوژن‌های مناسبی محسوب شوند، کپسول پلی‌ساکارید سروگروهA مننگوکوک توانایی ایجاد پاسخ‌های ایمنی را دارد (۵،۴)، اما با توجه به اینکه واکسن‌های پلی‌ساکاریدی، دارای معایبی به لحاظ ساختار آنتی‌ژنی غیروابسته به لنفوسیت Tهستند، امروزه پژوهش‌های متعددی در زمینه واکسن‌های زیرواحدی مونووالانت و یا کونژوگه، با جایگزینی اجزاء دیگر باکتری ازجمله پروتئین‌های غشاء خارجی جهت ایجاد پاسخ‌های ایمنی وابسته به لنفوسیت T صورت گرفته است (۶-۳). وزیکول غشاء خارجی مننگوکوک (OMV) متشکل از پروتئین‌های کلاس ۱ تا ۴، فسفولیپید، پلی‌ساکارید کپسولی و لیپواولیگوساکارید می‌باشد. این ماکرومولکول در خلال سیر رشد باکتری در بدن میزبان رها می‌شود و پژوهش‌ها نشان می‌دهدکه نقش عمده‌ای را در القاء ایمنی حفاظت بخش پس از ابتلا به بیماری دارد. از مهم‌ترین اجزاء این ماکرومولکول می‌توان به PorA، از خانواده کلاس ۱ پروتئین‌های غشاء خارجی، اشاره نمودکه توانایی ایجاد پاسخ‌های باکتریسیدی را دارد (۸،۷).

علاوه براین وجود سایر ترکیبات ازجمله لیپوالیگوساکارید و فسفولیپیدها، دارای خاصیت آدجوانتی بوده وپاسخ حفاظتی مناسبی را درانسان ایجاد می‌نمایند (۷،۳). امروزه وزیکول غشاء خارجی نیسریا مننژیتیدس سروگروهB به عنوان یک واکسن زیرواحدی، بر علیه عفونت‌های مننگوکوکی مجوز مصرف انسانی را دریافت نموده است (۹،۳-۷).

در پژوهش حاضر، پس از کشت انبوه باکتری در شرایط کنترل شده فرمانتور، استخراج وزیکول غشاء خارجی حاوی PorAنیسریا مننژیتیدیس سروگروهA انجام شد و ارزیابی‌های فیزیکوشیمیایی آن مورد بررسی قرارگرفت. درنهایت القاء پاسخ ایمنی بر علیه وزیکول غشاء خارجی سروگروه A مننگوکوک درحیوان آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرارگرفت.

مواد و روشها

تهیه بذر تلقیحی نیسریامننژیتیدیس سروگروه A

برای استخراج وزیکول غشاء خارجی، سویه استاندارد (CSBPI/G243) نیسریا مننژیتیدیس سروگروهA ازکلکسیون باکتری‌های استاندارد بخش واکسن‌های باکتریایی وتهیه آنتی‌ژن انستیتو پاستور ایران تهیه شد. ۲۵میلی‌لیتر از کشت ۱۸ ساعته نیسریامننژیتیدیس سروگروهA، در محیط مولرهینتون مایع به نیم لیتر محیط کشت فرانتز اصلاح شده حاوی عصاره مخمر دیالیز شده تلقیح شد و به مدت ۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۶ درجه و اتمسفر ۵ درصد با دورشیکر 1500 rpm نگهداری شد (۱۱،۱۰).

کشت در فرمانتور

در شرایط استریل ۵۰۰ میلی‌لیتر بذر تلقیحی به مخزن فرمانتور Contact-flow Bithoven unit system حاوی ۴۰ لیتر محیط کشت فرانتز اصلاح شده منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد و دور موتور rpm ۴۰۰ -۳۰۰ و جریان هوای ۵ لیتر در دقیقه نگهداری گردید. به منظور غیر فعال کردن باکتری‌ها در انتهای فاز لگاریتمی، مخزن فرمانتور به مدت نیم ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (۱۰، ۱۱، ۱۲).

استخراج و تخلیص وزیکول غشاءخارجی

وزیکول غشاءخارجی نیسریا مننژیتیدیس سروگروه A با روش سیادت و همکاران (۱۲) استخراج گردید. به اختصار، ابتدا جسم سلولی غیرفعال نیسریا مننژیتیدیس سروگروه A به مدت ۱ ساعت در دور ۶۰۰۰rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید و توده جسم سلولی در بافر کلرورسدیم به حالت تعلیق درآورده شد و پس از هموژنیزاسیون به مدت ۳۰ دقیقه وزن مرطوب آن تعیین گردید. این تعلیق مجدداً در ۶۵۰۰rpm به مدت ۱ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. رسوب سلولی در ۷/۵ برابر وزن مرطوبش با تریس بافر ۰/۱ مولار (سیگما) محتوی اتیلن دی آمین تتراکلرواستیک اسید (EDTA) ۱۰ میلی‌مولار (سیگما) w/v به صورت تعلیقی یکنواخت درآمد. به تعلیق فوق مقدار ۱/۲۰ حجمی محلول تریس بافر ۰/۱ مولار محتوی EDTA و سدیم دزوکسی کولات ۱۰۰ گرم در لیتر (مرک) اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه توده سلولی تیمار شده با دزوکسی کولات توسط اولتراسانتریفوژ

(بک من L8,80M) به مدت ۱ ساعت در دور ۱۶۵۰۰rpm و در ۴ درجه سانتی‌گراد جدا گردید. سپس مایع سلولی عاری از سلول به مدت ۲ ساعت در دور ۴۲۰۰۰rpm و ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید.
آنگاه تعلیقی از رسوب به دست آمده در بافر تریس ۰/۱ مولار حاوی EDTA، ۱۰۰ میلی‌مولار و دزوکسی‌کولات ۵ گرم در لیتر تهیه گردید و به مدت ۲ ساعت در ۱۶۵۰۰rpm و ۴ درجه سانتی‌گراد، اولتراسانتریفوژ شد. رسوب OMV در ۱۵ میلی لیتر آب مقطر حاوی ۳ درصد سوکروز حل و پس از عبور از فیلتر میلی پور ۰/۲۲ میکرون استریل گردید (۱۴-۱۰).

سنجش میزان پروتئین تخلیص شده با کمک روش اسپکتوفوتومتر با کمک دستگاه نانودراپ

سنجش میزان پروتئین تخلیص شده با کمک روش اسپکتوفوتومتر در طول موج ۲۸۰ لاندا و با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد (۱۴،۱۳).

ارزیابی پروتئین تخلیص شده با روش SDS-PAGE

جهت تائید خلوص پروتئین‌های موجود درOMV و همچنین تخمین وزن مولکولی آنها، نمونه تخلیص شده به میزان ۱۰ میکرولیتر بر روی ژل SDS-PAGE ۱۰درصد الکتروفورز گردید. جهت تعیین وزن مولکولی پروتئین مارکر (SIGMA) استفاده گردید (۱۵-۱۲).

میکروسکوپ الکترونی

برای تأیید خلوص و تعیین شکل فضایی وزیکول غشاء خارجی از میکروسکوپ الکترونی استفاده گردید. ابتدا مقداری از OMV در PBS ۰/۰۱ مولار با اولتراسوند یکنواخت شد و سپس مقدار۱۰ لاندا از OMV روی گرید نیکلی پوشیده شده با فرم وار و بخار کربن قرار داده شد. پس از آن، گریدها با PBS ۰/۰۱ مولارحاوی ۰/۱ درصد ژلاتین (MERCK) شستشو داده شدند. OMVs روی گرید با PBS ۰/۰۱ مولار حاوی ۱ درصد گلوترآلدهید به مدت ۱ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد ثابت شدند و در مرحله آخر گریدها تحت رنگ‌آمیزی کنتراست منفی با فسفوتنگستنات (pH= ۷.۵) قرار گرفتند و توسط میکروسکوپ الکترونی زایس مدل CEA902A بررسی شدند (۱۵-۱۱).

آزمون LAL

برای اندازه‌گیری میزان اندوتوکسین موجود در نمونه OMVs، از روش LAL کروموژنیک توسط کیت بیووایتاکر و بر اساس پروتکل شرکت سازنده استفاده گردید (۱۶،۱۲).

آزمون پیروژنی

جهت بررسی عوامل تب زا، آزمون پیروژنی طبق پیشنهاد فارماکوپه آمریکا روی OMV نیسریامننژ یتیدیس سروگروهA انجام شد. در این آزمایش، پس از تزریق وریدی محلول آزمایش افزایش گرمای بدن حیوان اندازه‌گیری می‌شود. به طوری که ابتدا ۳ راس خرگوش سفید نیوزلندی با وزن ۲ الی ۲/۵ کیلوگرم انتخاب شدند. دمای طبیعی بدن خرگوش‌ها قبل ازتزریق و در هر ساعت تا ساعت پنجم پس از تزریق توسط رکتومتر مورد سنجش قرار گرفت. اگر افزایش گرمایی بدن ۳ خرگوش نسبت به مجموع گرمای طبیعی بدن حیوانات قبل از تزریق بیش از ۴ درجه سانتی‌گراد شود آزمون پیروژنی مثبت تلقی می‌شود (۱۲).

وسترن بلات

پس از انتقال باندهای پروتئینی از روی ژل SDS-PAGE برروی کاغذ نیتروسلولز و بلوک کردن آن توسط BSA به مدت ۱ شبانه روز، با افزودن آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد PorA و Anti mouse IgG HRP به عنوان آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه به صورت مجزا و در نهایت افزودن سوبسترای DAB، وجود یا عدم وجود پروتئین اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۵،۱۱).

برنامه ایمونیزاسیون موش‌ها

برای ارزیابی پاسخ‌های ایمونولوژیکی OMV نیسریامننژیتیدیس سروگروه A از موش‌های سوری استفاده گردید. یک گروه پنج تایی برای انجام ترزیقات، خون‌گیری و بررسی‌های ایمونولوژیکی انتخاب شدند. تزریقات به صورت داخل عضلانی و در روزهای ۰، ۱۴، ۲۸ و ۴۲ انجام پذیرفت و به هرموش ۵ میکروگرم OMV، ترزیق گردید.
خون‌گیری از موش‌ها در روزهای ۰ ، ۱۴ ، ۲۸ و ۴۲ بعد از ترزیق اول (ترزیق زمان صفر) در شرایط استریل انجام پذیرفت. سرم‌ها جمع‌آوری و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۳).

تعیین عیار آنتی‌بادی اختصاصی برعلیه OMV نیسریا مننژیتیدیس سروگروه A

برای بررسی آنتی‌بادی‌های بر علیه OMV مننگوکوکی از روش الایزای غیررقابتی استفاده گردید. بعد از پوشاندن چاهک‌ها با

OMV و بلوک نمودن با BSA از سرم حیوان ایمیونیزه شده، رقت های مختلف تهیه گردید و به چاهک‌ها افزوده شد. پس از ۱ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنتی‌بادی دوم کونژوگه با آنزیم افزوده گردید وپس از ۱ ساعت انکوباسیون سوبسترای آنزیم افزوده شد. سپس جذب نوری رنگ (OD) توسط دستگاه ELISA Reader تعیین گردید (۱۷). برای بررسی OD به دست آمده در گروه‌های زمانی از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه با نرم‌افزار SPSS version 15.0 استفاده شد. $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

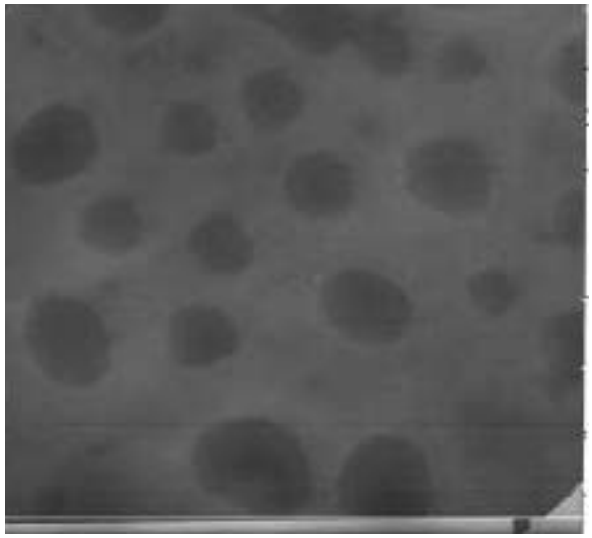
یافته‌ها

شرایط کشت

در پژوهش حاضر، پس از تلقیح بذر مورد نظر به ۴۰ لیتر محیط کشت فرانتز اصلاح شده، تا انتهای فاز لگاریتمی رشد، کلیه پارامترهای تخمیری در شرایط کاملاً کنترل شده و اپتیمم کشت غوطه‌ور، به صورتی در فرمانتور تنظیم گردید تا سلول‌ها به حداکثر تکثیر خود برسند. در این شرایط از ۴۰ لیتر برات تخمیری ۳۰/۴ گرم وزن مرطوب سلولی به دست آمد.

میکروسکوپ الکترونی

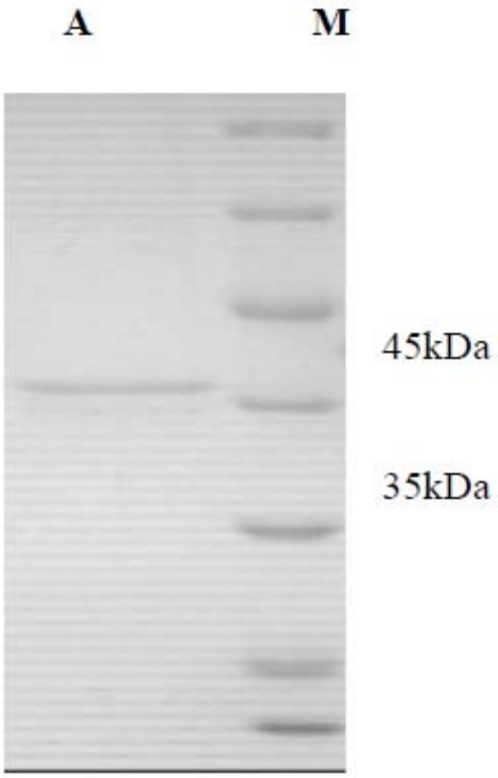
خصوصیات مورفولوژی OMVs حاوی PorA پس از گذر از مراحل مختلف فرآیندستخراج وتخلیص با رنگ آمیزی کنتراست منفی توسط میکروسکوپ الکترونی بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، اندازه وزیکول‌ها ۵۰ تا ۱۵۰ نانومتر است و بیش از ۷۰ درصد آنها شکل فضایی خود را حفظ کرده‌اند.



شکل ۱- میکروگراف الکترونی وزیکول‌های غشاء خارجی نیسریامننژیتیدیس سروگروهA. وزیکول‌های ۱۵۰-۵۰ نانومتر حاوی PorA با رنگ‌آمیزی کنتراست منفی مشاهده گردید.

بررسی وزن مولکولی

همان‌طور که در شکل ۲ ملاحظه می‌گردد، PorA موجود در OMV سروگروه A مننگوکوک در محدوده ۴۰-۳۵ کیلودالتونی قراردارد.



شکل ۲- الگوی SDS-PAGE از OMV حاوی PorA. M: مارکر، A: OMV سروگروهA مننگوکوک

سنجش میزان پروتئین با استفاده از روش نانودراپ

مقدار پروتئین اندازه‌گیری شده به روش اسپکتوفوتومتری با استفاده از دستگاه نانودراپ ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید.

تست LAL

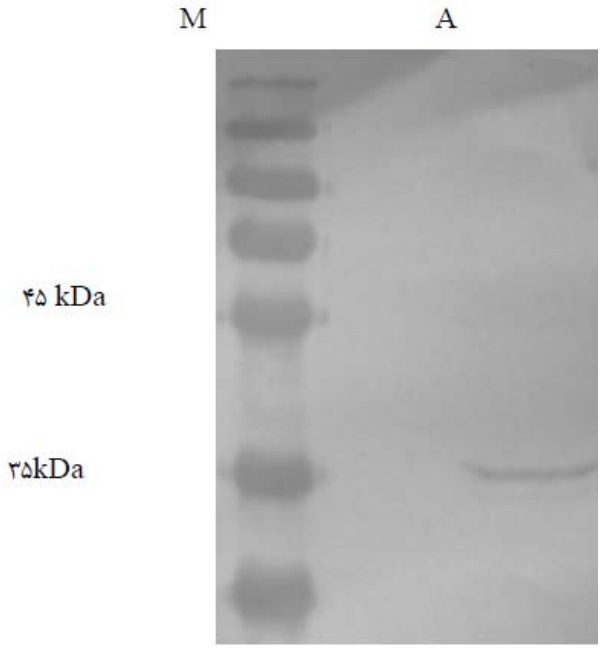
میزان اندوتوکسین محاسبه شده ۱۲۶ EU/ml بودکه در حد استاندارد FDA قرار داشت.

آزمون پیروژنی

پس از انجام آزمون، هیچ گونه افزایش دمای قابل ملاحظه‌ای در خرگوش ها مشاهده نگردید که نشان دهنده فقدان پیروژن بودن OMV استخراج شده است.

وسترن بلات

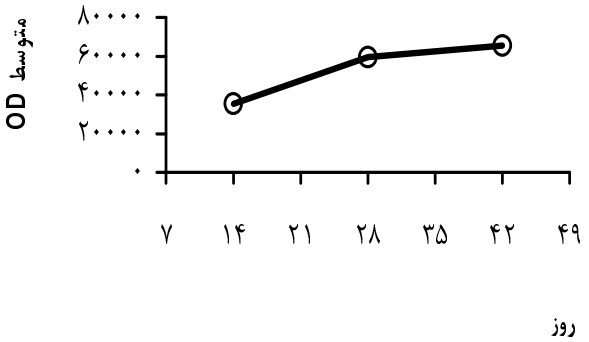
همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد باند ظاهر شده روی کاغذ نیتروسلولز در محدوده ۴۰kDa-۳۵ قرار دارد که موقعیت PorA را در این ناحیه با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ضد PorA به اثبات رسید .



شکل ۳- وسترن بلاتینگ. M: مارکرپروتئینی Pre-Stained. A: باند ظاهرشده درمحدوده۳۵-۴۰ کیلودالتون.

الایزا

عیار Total IgG حاصل از تزریق OMV نیسریا مننژیتیدیس سروگروه A در نمودار ۳-۱نشان داده شده است.



نمودار ۱- عیار IgG تولید شده بر علیه OMV سروگروه A مننگوکوک درروزهای متعدد پس از تزریق.

بحث

نیسریا مننژیتیدیس سروگروه A اصلی‌ترین عامل ایجاد کننده مننژیت اپیدمیک در نواحی کمربند مننژیتی در آفریقا است. سویه‌های مختلف این سروگروه سبب ایجاد اپیدمی‌های گسترده در سرتاسر آفریقا و بخشهای گسترده‌ای ازآسیا و خاورمیانه می‌شود (۵،۳)؛ در نتیجه وجود یک واکسن موثر که بتواند حفاظت طولانی مدت را در افراد واکسینه ایجاد نماید لازم و ضروری است. تاکنون واکسن‌های مختلف و متعددی برای پیشگیری ازعفونت‌های مننگوکوکی سروگروهA تولید و به بازار عرضه شده است که از جمله میتوان به واکسن‌های بر پایه پلی‌ساکارید کپسولی اشاره کرد (۳). این واکسن‌ها در کودکان بالای ۵ سال و بزرگسالان در سال اول پس از واکسیناسیون حفاظت‌کننده هستند. از این واکسن‌ها بیشتر برای کنترل اپیدمی‌ها استفاده می‌شود، اما استفاده از آنها برای برنامه‌های منظم ایمونیزاسیون مورد تردید و ابهام است. واکسن‌های برپایه پلی‌ساکارید کپسولی به علت ماهیت پلی‌ساکاریدی‌شان دارای معایبی هستند که ازجمله این معایب، ایجاد پاسخ‌های ایمونولوژیکی مستقل از لنفوسیت T است. پاسخ‌های مستقل از لنفوسیت T دارای خصوصیاتی از جمله عدم ایجاد خاطره ایمونولوژیکی، ناکارآمدی در ایمنی زا بودن برای کودکان زیر ۲سال، عدم توانایی در تغییر ایزوتایپ آنتی‌بادی از IgM به IgG می‌باشد (۱۸،۳). این محدودیت‌ها در واکسن‌های پلی ساکارید سبب شده تا پژوهش‌های گسترده‌ای برای جایگزینی آنها با انواع دیگری از آنتی‌ژن‌ها صورت پذیرد (۱۸،۳،۱۳). یکی از این جایگزین‌ها واکسن‌های بر پایه OMV است. وزیکول‌های غشایی به طور طبیعی توسط گونه‌های مختلف مننگوکوک در طی رشدشان تولید می‌شوند که قسمت مهمی از آن را پروتئین‌ها و ۲۰ تا ۲۵ درصد آن را لیپوالیگوساکاریدها تشکیل می‌دهد (۳، ۹-۷).

OMVs به سادگی می‌توانند توسط سانتریفوژ و با مجاورت ملایم با دترژنت از سلول جدا گردند و با اولتراسانتریفوژ تغلیظ یابند (۱۱، ۱۲، ۱۴).

وزیکول‌های غشای خارجی استخراج شده از باکتری، حاوی پروتئین‌های اصلی کلاس ۱و ۲و ۳ (پورین) و به مقدار کمی پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا هستند. پورین‌های PorA و PorB، پروتئین‌های اصلی غشاء خارجی در گونه‌های نیسریا مننژیتیدیس هستند. OMV حاوی PorA قادر است القائ تمام زیرکلاس‌های IgG را تحریک کند (۱۱، ۱۲، ۱۵).

کلاسن و همکاران در سال ۱۹۹۶، روش دزوکسی کولات اولتراسانتریفوژ افتراقی را برای استخراج و تخلیص OMV پایه‌ریزی نمودند. آنها مقدار مناسبی از OMV حاوی PorA را از نیسریا مننژیتیدیس سروگروهB به دست آوردند. این گروه از محققان نشان دادند که از بین ۴ کلاس عمده پروتئین‌های

غشاء خارجی نیسریا مننژیتیدیس، کلاس ۱ (PorA)، سیستم ایمنی اختصاصی را نسبت به سایر پروتئین‌های غشاء خارجی بیشتر تحریک می‌کند (۱۱). در پژوهش حاضر، با استفاده از تجربیات به دست آمده، به استخراج و ارزیابی‌های فیزیکوشیمیایی OMV نیسریامننژیتیدیس سروگروه A پرداخته شد.

درتحقیق حاضر، امکان تولید نیمه صنعتی OMV حاوی PorA خالص سویه استاندارد نیسریا مننژیتیدیس سروگروه A (CSBPI,G243) برای اولین بار در ایران مورد ارزیابی قرار گرفت، به طوری که از ۳۰/۴ گرم توده سلولی، ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر OMV به دست آمد.

در بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی بیش از ۷۰ درصد وزیکول‌ها نیسریا مننژیتیدیس سروگروه A شکل فضایی طبیعی خود را حفظ نمودند و در مراحل مختلف فرایند خالص سازی، سالم ماندند که با تجربیات کلاسن و همکارانش در مورد سروگروهB مننگوکوک منطبق بود (۱۱).

الگوی حرکت الکتروفورتیک PorA موجود در OMV نیسریا مننژیتیدیس سروگروهA در SDS-PAGE به صورت یک باند ضخیم در جایگاه ۴۰-۳۵ کیلودالتون قرار گرفته است و این درحالی است که کلاسن و همکارانش محدوده قرارگیری PorA موجود در OMV نیسریامننژیتیدیس سروگروهB را در جایگاه ۴۵-۴۰کیلودالتون گزارش کرده بودند. یکی ازمزایای تخلیص در این پژوهش، پایین بودن میزان LPS در OMV است (۱۲). زیرا میزان قابل توجهی از دزوکسی کولات جایگزین LPS متصل به OMV می‌شود. این امر سبب می‌گردد تا میزانLPS موجود در OMV تا سطح مجاز برای تزریق کاهش یابد. بنابراین وزیکول‌های خالص کاملا عاری از LPS نیستند (۱۲،۱۱). آزمون LAL نشان داد که میزان LPS همراه OMV در محدوده مجاز مصرف فراورده‌های بیولوژیکی قرار دارد. اگر چه LPS یک ماکرومولکول سمی است، اما میزان اندک آن در ثبات و حفظ پایداری OMV بسیار موثر است. همچنین LPS به عنوان یک آدجوانت قوی در وزیکول عمل می‌کند (۱۷). با انجام آزمون پیروژنی درخرگوش، فقدان خواص پیروژنیک OMV استخراج شده به روش دزوکسی کولات تائید شد (۱۷،۱۲).

با استفاده از روش وسترن بلات، حضور PorA موجود در وزیکول غشاء خارجی نیسریا مننژیتیدیس سرو گروه A در محدوده ۳۵ تا۴۰کیلودالتونی به اثبات رسید.

در پژوهش حاضر با استفاده از سرم هیپرایمیون حاصل از تزریق OMV سروگروهA مننگوکوک به موش، عیار آنتی‌بادی القا شده مورد بررسی قرار گرفت. آزمون ELISA بر علیه OMV مننگوکوک سروگروهA نشان داد که افزایش عیار آنتی‌بادی (IgG) معنی‌داری (۱/۶ برابر) پس از اولین تزریق یادآور در روز ۲۸ ایجاد می‌شود.

با توجه به مطالب بیان شده، OMV مننگوکوک یکی از جایگزین‌های مهم واکسن‌های پلی‌ساکاریدی در پیشگیری از عفونت‌های مننگوکوکی است که علاوه بر ماهیت پروتئینی، به دلیل دارا بودن خصوصیات شکلی-فضایی پروتئین در فرم طبیعی و حفظ اپی‌توپ‌ها و موتیف‌های پس از گذار از مراحل تخلیص، ایمنوژن قوی محسوب می‌گردد (۳، ۹، ۱۲). امروزه در زمینه روش‌های خالص‌سازی پروتئین‌های دیواره باکتریایی بحث‌های زیادی مطرح است، به طوری که پژوهشگران معتقدند که دستکاری‌های متعدد، سبب تخریب ساختمان فضایی و در نهایت اپی‌توپ‌های موثر در القا پاسخ‌های ایمنی شده و در نهایت پروتئین تخلیص شده تنها ساختمان اول یعنی سکانس اسیدهای آمینه اولیه را دارا می‌باشد (۳، ۱۱، ۱۲). به همین دلیل اگر روشی ملایم در استخراج استفاده گردد که مجموعه‌ای از پروتئین‌ها را با حفظ خصوصیات فضایی تخلیص نماید، بسیار مطلوب و موثر خواهد بود و روش به کار رفته در این پژوهش خصوصیات بیان شده را دارا است (۱۱، ۱۲). بنابر این OMV می‌تواند وارد بررسی فازهای بالینی شده و به عنوان نسل جدید واکسن‌های زیرواحدی، جایگزین واکسن پلی‌ساکاریدی گرددکه نه تنها می‌تواند در پیشگیری از عفونت‌های مننگوکوکی سروگروهA مفید باشد، بلکه بر علیه سایر سروگروه‌های مننگوکوک نیز کارا خواهد بود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل تحقیقات انجام یافته در قالب پروژه پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان، از همکاری کلیه همکاران بخش‌های هپاتیت و ایدز و واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی‌ژن انستیتو پاستور ایران کمال تشکر را دارند.

REFERENCES

1. Jodar L, Feavers IM, Granof DM. Development of vaccines against meningococcal disease. Lancet 2002; 359: 1499-508.

2. Ruggeberg JJ, Pollard AJ. Meningococcal vaccines. Pediat Drugs 2004; 6: 251-66.

3. Siadat SD, Norouziuan N. Past, present and future perspective of meningococcal vaccine. J Infect Develop Countries 2007; 1: 129-46.

4. Siadat SD, Norozian D, Tabaraie B, Behzadiannejad Q, Ahmadi H, Najar-Peerayeh, et al. Comparative studies of conjugated capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A with outer membrane vesicle of *Neisseria meningitidis* serogroup B. Res J Microbiol 2007; 2: 337-45.

5. Romero JD, Outschoorn IM. Current status of meningococcal group B vaccine candidates: capsular or non capsular. Clin microb Rev1994; 7: 559-75.

6. Kheirandish M, Siadat SD, Norouzian D, Razavi MR, Aghasadeghi MR, Rezaie N, et al. Measurement of opsonophagocytic activity of antibodies specific to *Neisseria meningitidis* serogroup A capsular polysaccharide-serogroup B outer membrane vesicle conjugate in animal model. Ann Microbiol 2009; 59: 801-806.

7. Massari P, Ram S, Macleod H. The role of proteins in neisserial pathogenesis and immunity. Trend Microbiol 2003; 11: 87-93.

8. Pollard AJ, Frasch C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. Vaccine 2001; 19: 1327-46.

9. Arigita C, Jiskoot W, West dijk J, van Ingen C, Hennink WE, Crommelin DJ, et al. Stability of mono and trivalent meningococcal outer membrane vesicle vaccines. Vaccine 2004; 22: 629-42.

10. Vermot C, Dobelsteen G. *Neisseria meningitidis* serogroup B: Laboratory Correlates of Protection. FEMS Immun Med Microbiol 2002; 24: 89-96.

11. Swaminathan B, Matar GM, Reeves MW, Graves LM, Ajello G, Bibb WF et al. Producion, characterization and control of *Neisseria meningitidis* serogroup B: Comparsion of 5methods. J Clinc Microbiol 1996; 34(6):1468_1473

12. Siadat SD, Behzadiannejad Q, Tabaraie B, Najar-Peerayeh S, Ahmadi H, Nejati M. Extraction and molecular evaluation of *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane vesicle containing PorA. Scientific-Research Journal of Shahed University, Daneshvar Medicine 2006; 14: 32-37. [In Persian]

13. Siadat SD, Behzadiannejad Q, Tabaraie B, Ahmadi H, Norouziuan D, Najar-Peerayeh S, et al. Evaluation of serum bactericidal activity specific for *Neisseria meningitidis* serogroup A and B: effect of Immunization with *Neisseria meningitidis* serogroupA polysaccharide and serogroup B outer membrane vesicle conjugate as a bivalent *Meningococcus* vaccine candidate. Res J Microbiol 2007; 2: 436-44.

14. Siadat SD, Tabaraie B, Behzadiannejad Q, Norouziuan D, Ahmadi H, Najar-Peerayeh S, et al. Bactericidal activity of outer membrane vesicle of *Neisseria meningitidis* serogroup B as a vaccine candidate in animal model. Iranian Journal of Infectious Disease and Tropical Medicine 2007; 12: 11-17. [In Persian]

15. Jansen C, Wiese A, Reubsaet L. Biochemical and biophysical charactrization, invitro folded outer membrane protein PorA of *Neisseria meningitidis*. FEMS Immun Med Microb 2000; 27: 227-33.

16. Rezaee A, Ghanizadeh Gh, Behzadiyannejad Gh, Yazdanbakhsh A, Siadat SD. Adsorption of endotoxin from aqueous solution using bone char. Bull Environ Contam Toxicol 2009; 82: 732-37.

17. Sharifat Salmani A, Siadat SD, Norouzian D, Izadi Mobarakeh J, Kheirandish M, Zangeneh M, et al. Outer membrane vesicle of *Neisseria meningitidis* serogroup B as an adjuvant to induce specific antibody response against the lipopolysaccharide of *Brucella abortus* S99. Ann Microbiol 2009; 59: 145-49.

18. Lesinski GB, Wesderink M. Vaccine against polysaccharide antigens. Curr Drug Targets Infect Disord 2001; 47: 225-34.