فعالیت باکتریسیدالی وزیکول غشاء خارجی نیسریا مننژیتیدیس سروگروهB بعنوان کاندیدای واکسن منینگوکوکی در مدل حیوانی

سید داور سیادت[1*]، بهمن تبرایی[1]، قربان بهزادیان‌نژاد[2]، داریوش نوروزیان[3]، حجت احمدی[1]، شهین نجار پیرایه[4]، اشرف محبتی مبارز[4]، مهدی نجاتی[5]، محمد حسین هدایتی[6]

۱. استادیار بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی‌ژن انستیتو پاستور ایران
۲. دانشیار گروه میکروب‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳. دانشیار بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی‌ژن انستیتو پاستور ایران
۴. استادیار گروه میکروب‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۵. عضو هیئت علمی بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی‌ژن انستیتو پاستور ایران
۶. رئیس آزمایشگاه کنترل کیفی ۲ انستیتوپاستور ایران

نشانی برای مکاتبه: کیلومتر ۲۵ آزاد راه تهران- کرج مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتوپاستور ایران – بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیهٔ آنتی ژن،
تلفن : ۰۲۶۱۶۱۰۲۹۹۹، فاکس: ۰۲۶۱۶۱۰۲۹۰۰ ، sd_siadat@yahoo.com

دریافت مقاله: مهر ماه هشتاد و پنج پذیرش برای چاپ: دی ماه هشتاد و پنج

چکیده

سابقه و هدف: *نیسریا مننژیتیدیس عمده‌ترین عوامل سببی مننژیت باکتریایی در انسان، از معضلات بهداشتی در سراسر جهان است . بررسی فعالیت باکتریسیدالی آنتی‌بادیهای تولید شده بر علیه منینگوکوک مهمترین آزمون در ارزیابی ایمنولوژیکی عفونتهای ناشی از این باکتری در طی سیر ابتلاء به بیماری و یا پس از انجام واکسیناسیون است. بطوریکه سازمان جهانی بهداشت پروتکل ارزیابی فعالیت باکتریسیدالی سرم را به‌عنوان آزمایش استاندارد طلایی در بررسی واکسنهای تولیدی برعلیه سروگروه‌های مختلف نیسریا مننژیتیدیس ارائه و اعلام نمود .*

روش کار: *در تحقیق توصیفی- اکتشافی حاضر گونه استاندارد G245، CSBPI نیسریا مننژیتیدیس سروگروه B ابتدا در یک شرایط کنترل شده کشت غوطه‌ور فرمانتور در ۴۰لیتر محیط فرانتز اصلاح شده کشت داده شد و سپس در انتهای فاز لگاریتمی رشد بیوماس سلولی برداشت گردید. وزیکول غشاء خارجی(OMV) به روش دزاکسی کولات ـ اولتراسانتریفوژ افتراقی استخراج وخالص گردید و در فسفات بافر سالین حاوی سوکروز و تیومرسال هموژنیزه شد و با روش اولتراسوند آمادهٔ انجام بررسی‌های فیزیکوشیمیایی گردید. بدنبال ایمیونیزاسیون خرگوش‌ها با OMV در تزریقات یادآور ۱۴ و ۲۸ و ۴۲ روز بعد از اولین تزریق، خونگیری از حیوان در دوره‌های زمانی ۰ و ۱۴ و ۲۸ و ۴۲ روز بعد از تزریق اولیه انجام گردید. از آنجایی که بررسی فعالیت باکتریسیدالی سرم مهمترین آزمون در ارزیابی‌های ایمنولوژیکی واکسن‌های منینگوکوکی است، آزمایش فوق به‌صورت کمی روی نمونه‌های سرمی حیوانات ایمن شده با OMV ، بر علیه سویه استاندارد CSBPI, G-245 نیسریا مننژیتیدیس سروگروه B انجام گرفت.*

یافته‌ها: *نتایج نشان می‌دهد که OMV توانایی القاء سنتز آنتی‌بادی باکتریسیدالی را در حیوان ایمن شده بعد از اولین تزریق دارد و تزریق یادآور دوم و سوم و چهارم در پریودهای زمانی ۱۴ روزه باعث القاء سنتز سطح بالایی از آنتی‌بادی باکتریسیدال در حیوان ایمن شده بر علیه سروگروه B منینگوکوک می‌گردد. چنانکه مجموع میانگین عیار آنتی‌بادی باکتریسیدال در این گروه بر علیه سروگروه B منینگوکوک بسیار بالاتر از گروه کنترل است.*

نتیجه‌گیری: *بررسی داده های حاصله از تحقیقات فوق نشان می دهد که در مراحل مختلف فرایند تخلیص ،OMV نه تنها شکل فضایی وطبیعی خود راکاملا" حفظ نموده است بلکه فاقد ناخالصی بوده و توان القاء سنتز سطح بالایی از آنتی‌بادی باکتریسیدالی را بر علیه نیسریا مننژیتیدیس سروگروه B دارد. بنابراین ساختمان اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیک مؤثر در القاء این آنتی‌بادی در مراحل مختلف فرایند خالص‌سازی OMV بخوبی حفظ شده و سالم مانده‌اند. بدین دلیل OMV را می‌توان بعنوان یک کاندیدای بالقوه برای ایجاد ایمنی مفید و مؤثر بر علیه عفونت‌های منینگوکوکی سروگروه B مطرح نمود.*

واژگان کلیدی: ***وزیکول غشاء خارجی ، نیسریا مننژیتیدیس سروگروه B ، فعالیت باکتریسیدالی***

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

منتژیت باکتریایی از دیرباز یکی از معضلات سازمان‌های بهداشتی- درمانی و مراکز تحقیقاتی بوده و بر اساس پـژوهش‌هـا رونـد رو بـه افزایشـی را در جهان به خود اختصاص داده است. در دهـهٔ اخیـر شـایعترین عامـل سـبب منتژیت باکتریایی، نیسریا منتژیتیدیس بوده که با عوارض متعـدد و میـزان مرگ و میر بالا در مبتلایـان همـراه اسـت(۱).سـال‌هـا اسـت کـه کپسـول پلی‌ساکاریدی این باکتری بطور گسترده برای ایجاد ایمنـی مـورد اسـتفاده قرار می‌گیـرد. تفاوتهـای آنتـی ژنـی در کپسـول پلـی‌سـاکاریدی، نیسـریا منتژیتیدیس را به حداقل ۱۳ سروگروه طبقه بنـدی مـی نمایـد. بـیش از ۹۹درصـد از عفونتهـای مننگوکـوکی توسـط سـویه هـای سـروگروه‌هـای A,B,C,29E,W135,Yایجاد می شوند. استفاده وسیع از واکسن مفیـد دو ظرفیتی پلی‌ساکارید کپسولی مننگوکوک (A+C) و در برخـی منـاطق چهار ظرفیتی (A+C+Y+W135) سبب گردیده تا در خـلال ۳۰ سـال گذشته سروگروه B نیسریا منتژیتیدیس شایع‌ترین عامـل سـببی منتژیـت اپیدمیک به‌ویژه در کشورهای توسعه یافته گردد. چنانکـه امـروزه بـیش از ۹۰ درصد از منتژیت مننگوکوکی در آمریکا به علت ایـن سـروگروه اسـت. برخلاف کپسول پلـی‌سـاکاریدی سـروگروه‌هـای A و C و Y و W135 ، کپسول سروگروه B در انسان ایمنوژنیک نبوده و پاسخ‌های ناخواسـته‌ای را بـــه همـــراه دارد(۵-۲). تشـــابه زنجیـــره کوتـــاه اسیدســـیالیک در سیالوگانگلیوزیدها و اسفنگولیپیدها(اسفنگومیلین‌ها) عامل ایجـاد تـولرانس ایمنولوژیکی نسبت به پلی‌ساکارید کپسولی سروگروه B بوده و در صـورت القاء سنتز آنتی‌بادی، واکنش متقاطعی با ساختار فـوق را در انسـان سـبب می‌گردد(۶و۷). با توجه بـه مشـکلات بیـان شـده امـروزه تمرکـز کارهـای تحقیقـاتی روی سـایر اجـزاء دیوارهٔسـلولی و ترکیبـات باکتریـایی ازجملـه پروتئین‌های عمدهٔ غشاء خارجی معطوف گردیده است(۱۰-۸).

پژوهش های سالهای اخیر حـاکی از آن اسـت کـه مـی تـوان از مجموعـهٔ پروتئین های غشاء خارجی(OMPc)یا به تعبیر دقیق تـر وزیکـول غشـاء خارجی سروگروه B مننگوکوک به عنوان یـک واکسـن پروتئینـی مفیـد و مـؤثر بـرای پیشـگیری از عفونـت هـای ناشـی از ایـن سـروگروه اسـتفاده نمود(۱۰و۱۱).

از آنجاییکه برای ایجاد عفونت مننگوکوکی مدل حیوانی در دسترس نیست، بررسی فعالیت باکتریسیدالی آنتی‌بادیهای تولید شده بر علیه مننگوکوک مهمترین و دقیق‌ترین آزمون در ارزیابی ایمنولوژیکی عفونتهای ناشی از این باکتری در سیر ابتلاء به بیماری و یا پس از انجام واکسیناسیون است. تاریخچه این آزمون به اواخر دهه ۱۹۶۰ و به گزارشات گلدشنایدر ، گوتچلی و آرتن استین بر می گردد. اما نقش آنتی‌بادی و کمپلمان در حفاظت از عفونتهای مننگوکوکی در دهه ۱۹۰۰ به اثبات رسید. سپس در سال ۱۹۷۶ سازمان جهانی بهداشت پروتکل ارزیابی فعالیت باکتریسیدالی سرم را به‌عنوان آزمایش استاندارد طلایی در بررسی واکسنهای تولیدی برعلیه سروگروه‌های مختلف نیسریا منتژیتیدیس ارائه و اعلام نمود. از آن پس تاکنون SBA با تغییرات اندک در روش انجام تست و بهینه‌سازی نحوه اجراء هنوز به‌عنوان اصلی‌ترین آزمون در ارزیابی اثرات حفاظتی واکسنهای مننگوکوکی مطرح است(۱۵-۱۲).

این آزمون به بررسی خاصیت کشندگی آنتی‌بادیهای ایجاد شده با واسطه فاکتورهای کمپلمان در شرایط خارج بدن می‌پردازد. آنتی‌بادیهای باکتریسیدالی با فعال کردن مسیر آبشاری کمپلمان، کمپلکس تهاجم غشایی ایجاد نموده و در نهایت باعث لیز باکتری می‌شوند. طبق گزارشات پژوهشگران، استاندارد طلایی در ارزیابی ایمنولوژیکی واکسن‌های تولیدی بر علیه بیماریهای ناشی از نیسریا منتژیتیدیس آزمون SBA است(۱۷و۱۸). بنابر این با توجه به اینکه مهمترین استراتژی در طراحی و ساخت واکسن های مننگوکوکی، القاء سنتز آنتی بادی های باکتریسیدالی است، در این تحقیق از آزمون بررسی فعالیت باکتریسیدالی آنتی بادی های سرم جهت ارزیابی توان ایمنی زایی وزیکول غشاء خارجی به عنوان کاندیدای بالقوهٔ واکسن در مدل حیوانی استفاده نموده ایم.

روش کار

جهت استخراج وزیکول غشاء خارجی (OMV)، از سویه استاندارد G245 ,CSBPI نیسریا منتژیتیدیس سروگروه B استفاده شد. ابتدا بیوماس سلولی از کشت انبوه باکتری در فرمانتور Contact – Flow b.v.Bilthoven unit حاوی ۴۰ لیتر محیط کشت فرانتز اصلاح شده تهیه گردید . پس از تعیین وزن مرطوب تودهٔ سلولی، استخراج OMV توسط روش دزاکسی کولات- اولتراسانتریفرژ افتراقی (کلاسن و همکاران ۱۹۹۶) انجام شد و در نهایت با استفاده از دستگاه USIFROID مدل SMH-50 (ساخت فرانسه) تحت شرایط خلاء ۲-۱۰×۶/۲ میلی‌بار پس از ۲۰ ساعت، لیوفیلیزه گردید(۲۲-۱۹).

درجهٔ خلوص و پایداری شکل طبیعی و فضایی OMV (در مراحل مختلف فرآیند خالص‌سازی) توسط میکروسکوپ الکترونی و وزن مولکولی آن طبق روش SDS-PAGE لامیلا (۱۹۷۰) در ژل ۱۰ درصد، با مقایسه مارکرهای استاندارد (سیگما) محاسبه و مورد سنجش قرار گرفت (۱۹و۲۱). میزان پروتئین OMV طبق روش پیترسن (۱۹۷۹) اندازه گیری شد(۲۱و۲۳).

بی زیانی مصرف OMV در حیوان آزمایشگاهی با انجام دو آزمون پیروژنی در خرگوش و ایجاد سمیت غیر نرمال در موش سوری و خوکچه هندی تایید گردید(۲۴).

به یک گروه پنج تایی از خرگوش سفید نیوزلندی با وزن ۱/۵ الی ۲ کیلوگرم ۵۰۰ µ از OMV تخلیص شده از نیسریا منتژیتیدیس سروگروه B سویه CSBPI.G۲۴۵ را همراه ادجوانت کامل فروند به‌صورت داخل عضلانی در روزهای صفر، ۲۸، ۵۸ و۱۴۸ تزریق گردید. سپس در زمانهای ۰و۱۴و۲۸و۴۲و۵۶روز پس از اولین تزریق خون هر یک از خرگوش‌ها از طریق قلب جمع‌آوری شده و سرم‌ها بعد از جداسازی در C ° ۲۰- نگهداری شدند (۲۵).

واکنش رسوبی آنتی‌سرم هیپرایمیون OMV خالص وآنتی‌سرم جسم‌سلولی سروگروهB طبق روش ژل ایمنودیفیوژن اجترلونی در آگاروز مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۵و۲۶) و از سویه استاندارد نیسریا منتژیتیدیس سروگروه B (CSBPI, G-245) سوسپانسیونی تازه در محیط مولر هینتون برات (MHB) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول با رقت CFU/ml ۱۰۵ تهیه شد (۱۳).

برای غیرفعال شدن اثرات کمپلمان، سرم حیوان هیپرایمیون در ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت در حمام آب گرم حرارت داده شد(۱۳و۱۴و۲۷) و برای منبع کمپلمان خارجی در آزمایش از سرم خون نوزاد خرگوش ۳ هفته‌ای استفاده شد (۲۸). در این آزمون از میکروپلیت‌های پلی استری استریل ۹۶ خانه‌ای با انتهایU شکل استفاده گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

سرم‌ها بعد از آماده‌سازی با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل در رقتهای مختلف به‌صورت سریالی داخل میکروپلیت پلی‌استری توزیع شد. به‌طوری که در هر خانه میکروپلیت ۲۵ میکرولیتر سرم (یا سرم‌های رقیق شده) قرار داده شد. به هر چاهک حاوی سرم، ۱۲/۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی حاوی CFU/ml ۱۰۵ و ۱۲/۵ میکرولیتر سرم نوزاد خرگوش (به‌عنوان منبع کمپلمان خارجی) افزوده شد. بعد از اضافه نمودن سرم حیوان هیپرایمیون، سوسپانسیون باکتری CFU/ml ۱۰۵ و منبع کمپلمان خارجی (حجم کل ۵۰ میکرولیتر) به هر ویال میکروپلیت و مخلوط نمودن کامل آنها، ۱۰ میکرولیتر از هر چاهک به پلیت‌های مولر هینتون آگار منتقل و به مدت ۱۸ ساعت در دمای$36\pm1^{\circ}C$ و فشار اتمسفری ۵ درصد CO2 انکوبه شدند (T0) . میکروپلیت حاوی ۴۰ میکرولیتر از مخلوط باقی مانده (باکتری، کمپلمان و سرم) به مدت یک ساعت در $36\pm1^{\circ}C$ با فشار اتمسفری ۵ درصد CO2 انکوبه گردید. پس از یک ساعت ۱۰ میکرولیتر از هر ویال به پلیت مولر هینتون آگار منتقل شد و تحت شرایط یکسان با پلیت‌های T0 ، به مدت ۱۸ ساعت انکوبه شدند(T1). پس از اتمام زمان انکوباسیون ۱۸ ساعته پلیت‌های T0 و T1 کلنی کانت شده و تعداد باکتری رشد یافته در T1 با T0 مقایسه گردید.

عیار ما در هر سری، برابر با رقتی از سرم که تعداد کلنی‌های رشد یافته در زمان T1 کاهشی برابر یا بیشتر از ۵۰ درصدی را نشان دهد بود. کلیه سرم‌ها با سویه استاندارد CSBPI, G-245 سروگروه B نیسریا منژیتیدیس به همراه کنترل، با تکرار سه بار مورد آزمون قرار گرفته و نتایج بررسی و ثبت شدند(۱۳و۱۴و۲۷و۲۹و۳۰).

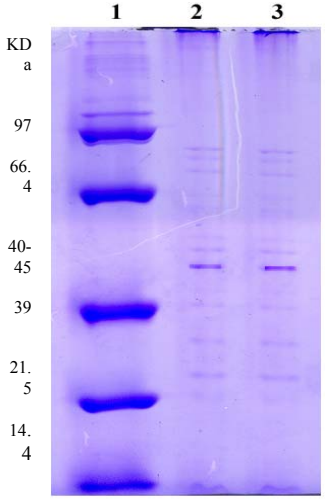
داده‌ها پس از جمع‌آوری و دسته‌بندی با نرم‌افزار SPSS 11.0 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. بدین منظور از روشهای آماری آنالیز واریانس با تکرار Repeated ANOVA برای بررسی اثر زمان در ایجاد عیار آنتی‌بادی باکتریسیدال به نحو مقتضی استفاده شد. برای مقایسه دو به دوی زمان‌ها، آزمون تعقیبی (Post Hoc) به روش LCD (Least Significant Difference) انجام گردید. در نهایت رسم نمودارها به‌وسیله نرم‌افزار Microsoft Word 11.0 صورت گرفت(۲۹).

یافته ها

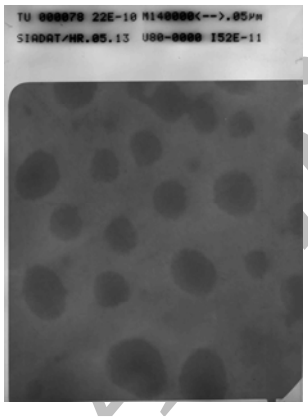
در تحقیق توصیفی-اکتشافی حاضر پس از تلقیح بذر مورد نظر به ۴۰ لیتر محیط فرانتز اصلاح شده، تا انتهای فاز لگاریتمی رشد کلیه پارامترهای تخمیری در شرایط کاملاً کنترل شده و اپتیمم کشت غوطه‌ور به صورتی در فرمانتور تنظیم گردیدند تا سلول‌ها به حداکثر تکثیر خود برسند. در این شرایط از ۴۰ لیتر برات(Broth)تخمیری حدود ۲۰/۵۲ گرم وزن مرطوب سلولی به‌دست آمد. میزان پروتئین طبق روش اصلاح شده لوری که توسط پترسن ارائه گردید اندازه‌گیری شد. چنانکه از کل توده زنده سلولی (Biomass)، ۷۳۰ میلی‌گرم پروتئین وزیکول غشاء خارجی بدست حاصل گردید..

لگوی حرکتیOMV در SDS-PAG الکتروفورز ۱۰ درصد با مقایسه با مارکرهای پروتئینی استاندارد به‌صورت باند های نسبتاً قوی در محدوده کلاس های پروتئینی غشاء منگوکوک مشاهده شد(شکل ۱).

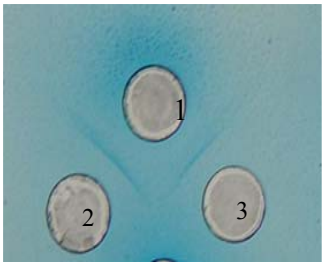
خصوصیات مرفولوژیکی OMV پس از گذر از مراحل مختلف فرایند استخراج و تخلیص توسط رنگ‌آمیز کنتراست منفی در میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. به‌طوری که در شکل شمارهٔ ۲ ملاحظه می‌گردد نه تنها اندازه وزیکول‌ها بین ۵۰ الی ۱۵۰ نانومتر می‌باشد بلکه بیش از ۷۰ تا ۹۰ درصد آنها شکل فضایی و طبیعی خود را کاملاً حفظ نموده‌اند. همچنین در میکروگراف مربوطه ناخالصی پروتئینی در بین وزیکول‌ها نیز مشاهده نمی‌گردد.



شکل ۱: الگوي SDS-PAGE الکتروفورز از OMV نیسریامننژیتیدیس سرو گروه B سروتیپ CSBPI,G-245 در ژل ۱۰%
ـ ستون ۱: مارکرهاي استاندارد باوزن ملکولي پایین
ـ ستون ۲ و ۳: به ترتیب ۲ و ٤ میکروگرم



شکل۲:میکروگراف الکترونی وزیکولهای تهیه شده از



شکل ۳آزمون ژل ایمنودیفیوژن
چاهک شماره ۱: OMV خالص
چاهک شماره ۲ : Anti OMV Ab
چاهک شماره ۳ Anti Neisseria meningitidis serogroup B Ab :

Archive of SID
www.SID.ir

بر اساس روش پیشنهادی سازمان بهداشت جهانی (۱۹۶۷)، بی‌زیانی مصرف OMV خالص با انجام آزمون پیروژنی در خرگوش که احتمال وجود ناخالصی بیش از حد مجاز عوامل تب‌زا نظیر LPS در نمونه را مشخص می‌نماید، به اثبات رسید. در ادامه با انجام آزمون سمیت غیر نرمال در خوکچهٔ هندی و موش سوری نیز عدم وجود هر نوع عامل سمی در نمونه به اثبات رسید. به‌طوری که تزریق داخل جلدی ۱۰۰ میکروگرم از OMV خالص به ازای یک کیلوگرم وزن خرگوش، افزایشی در میانگین دمای طبیعی بدن حیوان ایجاد نکرد. به‌علاوه تزریق داخل صفاقی ۵۰۰ میکروگرم OMV خالص به یک گروه پنج تایی خوکچهٔ هندی و تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میکروگرم از همان وزیکول به یک گروه پنج تایی موش سوری، طی ۷۲ ساعت نگهداری در شرایط مناسب، نه تنها سبب مرگ‌ومیر و یا کاهش وزن بدن حیوانات نگردید بلکه پس از اتوپسی نیز هیچگونه آسیب نسجی در محل تزریق و یا اعضاء داخلی بدن حیوانات مشاهده نشد.

بین چاهک شماره ۱ حاوی OMV خالص و چاهک شمارهٔ۲ محتوی آنتی سرم هیپرایمیون خرگوش علیه OMV واکنش رسوبی مشخصی در ژل آگاروز ایجاد شد. این پدیده توان القایی OMV در سنتز آنتی‌بادی هم‌ولگ قابل اندازه‌گیری در بدن حیوان را به‌خوبی مشخص می‌نماید. به‌علاوه ایجاد واکنش رسوبی بین آنتی‌بادی القاء شده علیه جسم سلولی نیسریامننژیتیدیس سروگروه B (چاهک شمارهٔ ۳) و OMV (چاهک شماره ۱) نه تنها هویت اختصاصیOMV در شناسایی ایمنوگلبولین‌هایی که علیه شاخص‌های آنتی‌ژنیک خود سنتز گردیده است را به اثبات رساند بلکه بیانگر مقاومت و پایداری خواص آنتی‌ژنیک وزیکول‌ها در مراحل مختلف فرایند استخراج و روند خالص‌سازی بود.

از آنجایی که بررسی فعالیت باکتریسیدالی سرم مهمترین آزمون در ارزیابی‌های ایمنولوژیکی واکسن‌های مننگوکوکی است، آزمایش فوق به‌صورت کمی روی نمونه‌های سرمی حیوانات ایمن شده با OMV ، بر علیه سویه استاندارد CSBPI, G-245 سروگروه B نیسریا مننژیتیدیس انجام گرفت. در نهایت آزمون SBA با سروگروه B در گروه چهارم، افزایش صعودی در عیار آنتی‌بادی، پیرو تزریقات یادآور را نشان داد. آزمون تعقیبی LSD (Post Hoc) جهت بررسی تفاوت معنی‌دار دوره‌های زمانی با هم، انجام شد. نتایج این آزمون نشان داد که تمام دوره‌های زمانی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری، از نظر عیار آنتی‌بادی باکتریسیدالی تولید شده، دارند ($P \leq ۰/۰۰۱$). برای ارزیابی اختلاف گروه‌ها با یکدیگر، از آزمون Tukey استفاده شد(جدول ۱).

جدول۱.میانگین و انحراف معیار وزیکول های عشای خارجی مننگوکوک سروگروه ب بر زمان های مختلف تیمار.

محصول / زمان (روز)	OMV	
	میانگین	انحراف‌معیار
۰	۰/۰۰	۰/۰۰
۱۴	۶/۶۷	۲/۳۱
۲۸	۲۶/۶۷	۹/۲۴
۴۲	۵۳/۳۳	۱۸/۴۸
۵۶	۴۲۶/۶۷	۱۴۷/۸۰
میانگین کل	۱۰۲/۶۷	۱۷۷/۹۶

بحث

در تحقیق حاضر با بهره‌گیری از تجارب سایر محققان فن و بهینه‌سازی سنتیک رشد در کشت غوطه‌ور، امکان تولید OMV خالص زیرگونه استاندارد نیسریامننژیتیدیس سروگروه B (CSBPI: G-245) در ایران مورد ارزیابی قرار گرفت. چنانکه از کشت ۴۰ لیتر محیط فرانتز اصلاح شده در شرایط کنترل شده اپتیمم در فرمانتور ۷۵۰ میلی‌گرم OMV خالص به‌دست آمد که نسبت به روش کلاسن و همکاران ۱۰ درصد افزایش تولید را نشان می‌دهد (۱۹و۲۰و۲۲). بررسی میکروگراف الکترونی نیز نشان می‌دهد که بیش از ۶۰ تا ۸۵ درصد وزیکول‌ها شکل فضایی طبیعی خود را حفظ نموده و در مراحل مختلف فرایند خالص‌سازی، سالم مانده‌اند که این میزان نیز در مقایسه با گزارشات سایر محققان از جمله کلاسن و همکاران افزایش ۲۰ درصدی را نشان می‌دهد(۹و۲۲). چنانچه در شکل شمارهٔ ۱ مشاهده شد الگوی حرکت الکتروفورتیک OMV در SDS-PAGE (ژل ۱۰٪) در جایگاه ۴۵ـ۴۰ کیلو دالتون به‌صورت یک باند ضخیم قرار گرفته که این نتیجه با یافته‌های سایر محققان از جمله پیتر و همکاران (۱۹۹۹) و کلاسن و همکاران (۱۹۹۶) به‌طور کامل مطابقت دارد (۱۹و۲۲و۳۱).

یکی دیگر از مزایای فرایند تخلیصی که در این پژوهش به‌کار رفته است، پایین بودن نسبت ناخالصی LPS در OMV است. زیرا میزان قابل توجهی از دزاکسی کولات جایگزین LPS متصل به OMV می‌شود. این امر سبب می‌گردد تا میزان LPS موجود در OMV تا سطح محدوده پذیرش برای تزریق کاهش یابد. بنابراین وزیکول‌های خالص کاملاً عاری از LPS نخواهد شد. اگرچه LPS ماکرومولکولی سمی است، اما میزان کم آن در ثبات و پایداری وزیکول‌ها بسیار مؤثر است. همچنین LPS خود به‌عنوان آدجوانتی فعال که متصل به وزیکول می‌باشد، عمل می‌کند(۷و۱۹). معهذا انجام آزمون پیروژنی در خرگوش، فقدان خواص پیروژنیک OMV-PorA استخراج شده به روش انتخابی از سروتایپ CSBPI, G-245 را به اثبات می‌رساند. به‌طوری که تزریق داخل جلدی ۱۰۰ میکروگرم از OMV به‌ازای یک کیلوگرم وزن خرگوش سبب افزایش دمای نرمال بدن حیوان نگردید .

در ادامه مطالعات حاضر، بی‌زیانی مصرف OMV توسط آزمون ایجاد سمیت غیرنرمال در خوکچهٔ هندی و موش سوری مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۴). چنانکه با تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میکروگرم OMV خالص به گروه ۵ تایی موش و ۵۰۰ میکروگرم به گروه ۵ تایی خوکچهٔ هندی هیچ‌گونه ضایعه‌ای در محل تزریق و اعضاء داخلی حیوان پس از اتوپسی ایجاد نگردید به‌علاوه ۷ روز بعد از تزریق نیز کاهش وزن و یا مرگ و میر در بین حیوانات مشاهده نشد.

توان OMV در القاء سنتز آنتی‌بادی‌های اختصاصی با استفاده از آنتی‌سرم هیپرایمیون خرگوش توسط آزمون ژل دابل دیفیوژن به اثبات رسید به‌طوری که مابین چاهک شمارهٔ ۳ و ۲ و چاهک شماره ۱ (مرکزی) باند رسوبی پررنگی مشاهده می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

واکسن‌های موفق بر علیه پاتوژنهای خارج سلولی سبب القاء زیرکلاس‌های متعدد IgG در مقابل اپی‌توپهای سطحی و قابل دسترس باکتری می‌شوند. اما در مورد باکتریهای داخل سلولی همه زیرکلاس‌هاس IgG خاصیت حفاظتی در برابر عفونت ناشی از این باکتری‌ها را نداشته و توانایی کشندگی وابسته به کمپلمان را ندارند. به همین دلیل تست ارزیابی فعالیت باکتریسیدالی سرم در این گروه از اهمیت زیادی برخوردار است. ایمنی در برابر عفونت های منننگوکوکی بعد از انجام واکسیناسیون و همچنین در خلال سیر طبیعی عفونت با این باکتری، به القاء سنتز آنتی‌بادی‌های باکتریسیدال و حضور آنها در خون بستگی دارد. به‌همین دلیل مهمترین و با ارزش‌ترین آزمون در ارزیابی ایمنولوژیکی عفونتهای منننگوکوکی، آزمون SBA است، در این تحقیق آزمون SBA بر اساس استانداردهای پروتکل سازمان بهداشت جهانی انجام گرفت(۸و۱۵و۲۰و۲۷و۳۴و۳۵و۳۶).

در نتایج آزمون SBA با نیسریا منننژیتدیس سروگروه B، اختلاف میانگین عیار آنتی‌بادی باکتریسیدال گروه حیوانات ایمن‌شده با گروه کنترل از دیدگاه بالینی با ارزش و در بررسیهای آماری معنادار است (P=000). به عبارت دیگر عیار صعودی آنتی بادی بااکتریسیدال در این گروه در تمام دوره‌های زمانی تفاوت با ارزشی داشته و اختلاف معنا داری دارد (P=008)

کلاسن بیان می‌کند که بالا بودن عیار آنتی‌بادی باکتربسیدال القاشده با OMV بر علیه نیسریا منننژیتدیس سروگروه B، علاوه بر اینکه نشان‌دهندهٔ اثرات ایمنوژنیسیته مفید و مؤثر OMV بر علیه عفونتهای منننگوکوکی تیپ B است از حضور بالای کلاس یک پروتئین غشای خارجی (PorA) در آن حکایت می‌کند، زیرا قویترین محرک تولید این آنتی‌بادی PorA است. در تحقیق ما نیز عیار آنتی‌بادی باکتریسیدالی القاشده با OMV بر علیه نیسریا منننژیتدیس سروگروه B، با نتایج کلاسن سازگاری دارد (۱۹و۳۰و۳۱و۳۲و۳۶). با توجه به بررسی داده‌های کسب شده از آزمون‌های پژوهش حاضر چنین می‌توان نتیجه گرفت که OMV استخراج شده از سروگروه B نیسریامننژیتیدیس را می‌توان به‌تنهایی و یا کونژوگه با واکسن‌های زیرواحد دیگر، به‌عنوان یک ایمنوژن مفید و مؤثر علیه عفونت ناشی از نیسریامننژیتیدیس سروگروه B به‌کار گرفت. در مجموع نتایج این آزمون با سویهٔ استاندارد G- 245 ،CSBPI نیسریا منننژیتدیس سروگروه B، حاکی از معنادار بودن میانگین عیار آنتی‌بادی باکتریسیدال در حیوانات ایمن‌شده در مقابسه با گروه کنترل است.

REFERENCES

1. Ala'Aldeen D.A.A. and Cartwright K.A.V. Neisseria meningitidis: vaccines and vaccine candidates. J. Infect., 1996; 33: 153-157.

2. Jodar L. Feavers I.M., Granoff D.M. Development of vaccines against meningococcal disease. Lancet, 2002; 359: 1499-1508.

3. Jones D.M., Kaczmarski E.B. Meningococcal infection in England and wales: 1994. Public Health Laboratory Service, 1995; 5(9): 1350-1366.

4. Pollard A.J, Frasch C. Development of natural immunity to Neisseria meningtidis. Vaccine, 2001; 1327-1346.

5. Bjune G., Hoiby E.A., Gronnesby J.K., etal. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. The lancet. 1991; 338: 1093-1096.

6. Morley S.L., Pollard A.J. Vaccine prevention of meningococcal disease, Coming soon?. Vaccine. 2002; 20: 666-687.

7. Mrcpch P.A.J. and Frepch L.M. Vaccines for prevention of meningococcal disease. Pediatr. Infect. Dis., 2000; 19(4): 333-345.

8. Romero J.D., outschoorn I.M. Current status of meningococcal group B vaccine candidates: Capsular or noncapsular?. Clin Microb Rev. 1994; 7(4): 559-575

9. Craven D.E. and Frasch C.E. Protection against group B meningococcal disease: Evaluation of serotype 2 protein vaccines in a mouse bacteremia model. Infect. Immuno., 1979; 26(1): 110-117.

10. Massari P., Ram S., Macleod H. The role of proteins in neisserial pathogenesis and immunity. Trend in Microbiology, 2003; 11(2): 87-93.

Archive of SID
www.SID.ir

11. Arigita C., Jiskoot W., Westdijk J. Stability of mono and trivalent meningococcal outer membrane vesicle vaccines. Vaccine, 2004; 22: 629-642

12. Cartwright K, Morris R, Rümke H., Fox A., Borrow R., Begg N., Richmond P. & Poolman J. Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (PorA) outer membrane protein. Vaccine,1999; 17: 2612-2619.

13. Borrow R., Andrews N., Goldblatt D. & Miller E. Serological basis for use of meningococcal serogroups C conjugate vaccines in the United Kingdom: reevaluation of correlates of protection. Infect Immun, 2001; 69: 1568-1573.

14. Maslanka SE, Gheesling LL, Libutti DE, Donaldson K.B.J., Haraksh H.S., Dykes J.K., Arhin F.F., Devi S.J.N., Frasch C.E., Huang J.C., Kuzemenska P., Lemmon R.D. Lorange M., Peeters C.C.A.M., Quataert S., Tai J.Y. & Carlone G.M. Standardization and a multilaboratory comparison of Neisseria meningitidis serogroup A and C serum bactericidal assays. Clin Diag Lab Immunol , 1997; 4(2): 156-167.

15. World Health Organization. Standardization and validation of serological assay for the evaluation of immune responses to Neisseria meningitidis serogroup A/C vaccines. Department of vaccines and biologicals.1999; Geneva: World Health Organization.

16. Dalseg R., Wedege E., Holst J., Haugen I.L., Hoiby E.A. & Haneberg B. Outer membrane vesicles from group B meningococci are strongly immunogenic when given intranasally to mice. Vaccine, 1999; 17: 2336-2345.

17. Vermont C. & Dobbelsteen G. Neisseria meningitidis serogroup B: laboratory correlates of protection. FEMS Immunol Med Microbiol, 2001; 34: 89-96.

18. Borrow R., Andrews N., Goldblatt D. & Miller E. Serological basis for use of meningococcal serogroups C conjugate vaccines in the United Kingdom: reevaluation of correlates of protection. Infect Immun, 2001; 69: 1568-1573.

19. Claassen I., Meylis J., Ley P., Peeters C., Brons H., Robert J., Borsboom D., Ark A., Straaten I., Roholl P., Kuipers B.& Poolman J. Production, characterization and control of Neisseria meningitidis hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicles vaccine. Vaccine, 1996; 14: 1001-1008.

20. Siadat SD. Behzadian-Nejad Q. Tabaraie B. Najar-Peerayeh SH. Ahmadi H. Kazemnejad A. etal. Production, Extraction and Evaluation of Neisseria meningitides Serogroup B Outer Membrane Vesicle Containing PorA. Proceeding of the 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2005. Apr 2: Copenhagen, Denmark.

21. Siadat SD. Behzadian-Nejad Q. Tabaraie B. Najar-Peerayeh SH. Ahmadi H. Nejati M. Extraction and Molecular Evaluation of Neisseria meningitidis Serogroup B Outer Membrane Vesicle Containing PorA. Proceeding of theXXIX national Congress of Indian Association of Medical Microbiologist. 2005. Oct 22: Chennai, India.

22. Siadat SD. Behzadian-Nejad Q. Tabaraie B. Najar-Peerayeh SH. Ahmadi H. Nejati M. etal. Optimization in down stream process of large scale production of Neisseria meningitidis class 1 outer membrane vesicles. Proceeding of the 8th Iranian Congress of Biochemistry & 1th International of Molecular Biology. 2005. Sep 11: Tehran,Iran.

23. Peterson G.L. (1977). A simpilification of the protein assay of Lowry et al. Which is more generally applicable. Anal Biochem 83: 346-356.

24. Pyrogen test, In: United states pharmacopoeia 23rd,(1995)Revision, U.S. pharmacopoeial convention Inc., Rockville, M.D., D.1718.

Archive of SID

www.SID.ir

25. Ouctherlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Allergy, 1962; 6: 30-39.

26. Jennings H.J. & Lugowski C. Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide tetanus toxoid conjugates. J Immunol, 1981; 27(3): 1011-1018.

27. Schmidt S., Zhu D., Barniak V., Mason K., Zahang Y., Arumugham R. & Metcalf T. Passive immunization with Neisseria meningitidis PorA specific immune sera reduces nasopharyngeal colonization of group B meningococcus in an infant rat nasal challenge model. Vaccine, 2001;19: 4851-4858.

28. Santos GF, Randall deck R, Donnelly J., Blackwelder W. & Garnoff D.M. Importance of complement source in measuring meningococcal bactericidal titers. Clin Diag Lab Immunol, 2001; 8(3): 616-623.

29. Jin Z., Chu C., Robbins J.B., & Schneerson R. Preparation and characterization of group A meningococcal capsular polysaccharide conjugates and evaluation of their immunogenicity in mice. Infect Immun, 2003; 71: 5115-5120.

30. Fukasawa L.O., Gorla M.C., Schekman R.P., Garcia L.R., Carneiro S.M., Raw I. &Tanizaki M.M. Neisseria meningitidis serogroup C polysaccharide and serogroup B outer membrane vesicle conjugate as a bivalent meningococcus vaccine candidate. Vaccine, 1999; 17: 2951-2958.

31. Peeters C., Claassen I., Schuller M., Kersten G.F.A., Van Der Voort & Poolman J. Immunogenicity of various presentation forms of PorA outer membrane protein of Neisseria meningitidis in mice. Vaccine, 1999; 17: 2702-2712.

32. Jensen C., Kuipers B., Van Der Bienzen J., Cock H., Van Der Ley P. & Tommassen J. Immunogenicity of in vitro folded outer membrane protein PorA of Neisseria meningitidis. FEMS Immuno and Med Microbiol, 2000; 27:227-233.

33. Milagres L.G., Gorla M.C.A., Sacchi C.T. (1998). Specificity of bactericidal antibody response to serogroup B meningococcal strains in Brazilian children after immunization with a outer membrane vaccine. Infect Immun 66: 4755-4761.

34. Zollinger W.D., Maron E.E., Devi S.J. & Frasch C.E. Bactericidal antibody responses of juvenile rhesus monkeys immunized with group B Neisseria meningitidis capsular polysaccharide-protein conjugate vaccines. Infect Immun, 1997; 65: 1053-1060.

35. Balmer P. & Borrow R. Serologic correlates of protection for evaluating the response to meningococcal vaccine. Expert Rev Vaccines, 2004; 3, 77-87.

36. Siadat SD. Behzadian-Nejad Q.Tabaraie B. Ahmadi H. Najar-Peerayeh SH.Norouzian D. etal. Immunological evaluation of Neisseria meningitidis serogroup B outer membrane vesicle containing PorA conjugated with Neisseria meningitidis serogroup A capsular polysaccharide in rabbit. Proceeding of the 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2006. Apr 1: Nice, France.

Archive of SID

www.SID.ir