مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۵۹/هفته سوم دی ماه ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۸/۲۳

تهیه‌ی کونژوگه‌ی پلی‌ساکارید کپسولی نایسریا منتژیتیدیس سروتایپ A با پروتئین ریکامبیننت هپاتیت B به عنوان یک ایمونوژن (تهیه‌ی ایمونوژن از منتژیت و هپاتیت B)

محبوبه محمدامینی[۱]، دکتر حجت احمدی[۲]، دکتر بهمن تبرایی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: پلی‌ساکارید کپسولی نایسریا منتژیتیدیس سروتایپ A (Neisseria meningitidis capsule یا NMA-CPS) واکسن خوبی برای بیماری منتژیت محسوب می‌شود؛ اما به دلیل این که پاسخ ایمنی نسبت به این پلی‌ساکارید غیر وابسته به سلول T است و سلول خاطره در پاسخ ایمنی ایجاد نمی‌گردد، دوز یادآور (Booster dose) آن تأثیری در بالا بردن سطح ایمنی ندارد. در مطالعه‌ی حاضر، پلی‌ساکارید NMA-CPS به طور کووالان به پروتئین ریکامبیننت هپاتیت B (Recombinant hepatitis B surface antigen یا rHbsAg) متصل گردید.

روش‌ها: HbsAg با روش آمیداسیون برای ایجاد یک ایمونوژن دو ظرفیتی مفید و مؤثر، به NMA-CPS کونژوگه شد. کونژوگه و پلی‌ساکارید NMA-CPS به تنهایی به تعدادی خرگوش سفید آزمایشگاهی در سه نوبت به فاصله‌ی ۱۵ روز تزریق گردید و سپس خون‌گیری و جمع‌آوری سرم و بررسی توان باکتری‌کشی سرم با استفاده از روش سرم باکتریسیدال (Serum bactericidal assay یا SBA) صورت گرفت.

یافته‌ها: تزریق اول کونژوگه و پلی‌ساکارید تنها، تیتر باکتری‌کشی خوبی را القا نمودند؛ اما کونژوگه در تزریق دوم، تیتر بالاتری را نسبت به پلی‌ساکارید تنها و تزریق اول کونژوگه ایجاد کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دهنده‌ی ایجاد سلول‌های خاطره و تأثیر دوز یادآور در بالا بردن سطح ایمنی می‌باشد؛ در حالی که تیتر باکتری‌کشی پلی‌ساکارید تنها، در تزریق دوم تغییر کمی داشت؛ این یافته به این دلیل است که پاسخ ایمنی نسبت به این پلی‌ساکارید غیر وابسته به سلول T می‌باشد و سلول خاطره‌ای در پاسخ ایمنی ایجاد نمی‌گردد.

واژگان کلیدی: پلی‌ساکارید کپسولی نایسریا منتژیتیدیس سرو تایپ A، پروتئین ریکامبیننت هپاتیت B، ایمونوژن، کونژوگه، روش SBA

ارجاع: محمدامینی محبوبه، احمدی حجت، تبرایی بهمن. **تهیه‌ی کونژوگه‌ی پلی‌ساکارید کپسولی نایسریا منتژیتیدیس سروتایپ A با پروتئین ریکامبیننت هپاتیت B به عنوان یک ایمونوژن (تهیه‌ی ایمونوژن از منتژیت و هپاتیت B)**. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۹): ۱۹۶۴-۱۹۵۵

مقدمه

نایسریا منتژیتیدیس یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده‌ی منتژیت باکتریایی محسوب می‌شود. این باکتری مانند سایر باکتری‌های گرم منفی با استفاده از یک لایه غشای خارجی حاوی لیپیدها، پروتئین‌های غشای خارجی (Outer membrane proteins یا OMPs) و لیپوپلی‌ساکارید احاطه می‌گردد. علاوه بر این، سویه‌های بیماری‌زا دارای کپسول پلی‌ساکاریدی چسبیده به غشای خارجی هستند (۸-۱). این باکتری بر اساس تفاوت در ساختار پلی‌ساکارید کپسولی خود به ۱۳ سروتایپ مختلف تقسیم می‌شود که ۵ سروتایپ A، B، C، Y و W135 جزء پاتوژن‌های اصلی انسان به شمار می‌روند. ترکیب شیمیایی کپسول پلی‌ساکاریدی سروتایپ A منگوکوک، هموپلیمری از N- استیل مانوز آمین فسفات است. کپسول پلی‌ساکاریدی یکی از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی منگوکوک‌ها به شمار می‌رود و سبب جلوگیری از فاگوسیتوز می‌گردد (۲۱-۹).

مزیت واکسن کپسولی نایسریا منتژیتیدیس سروتایپ A (Neisseria meningitidis capsule یا NMA-CPS)، فرمولاسیون

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران
۲- دانشیار، بخش تهیه واکسن‌های باکتریایی و آنتی‌ژن انستیتو پاستور، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حجت احمدی
Email: hojiahmadi@yahoo.com

مشخص و بدون عوارض بودن آن می‌باشد و می‌تواند مصونیت مفید و مؤثری علیه منتژیت ایجاد نماید، اما پاسخ ایمنی نسبت به این پلی‌ساکارید، غیر وابسته به سلول T است؛ بدین معنی که در پاسخ ایمنی سلول خاطره ایجاد نمی‌شود. از این‌رو، دوز یادآور (Booster dose) آن تأثیری در بالا بردن سطح ایمنی و تیتر آنتی‌بادی ندارد. بنابراین، در کودکان زیر ۲ سال و خردسالان ایمنی کاملی ایجاد نمی‌کند. برای از بین بردن این کمبود، از برخی پروتئین‌ها به عنوان حامل (Carrier) جهت کونژوگه نمودن پلی‌ساکارید NMA-CPS استفاده می‌شود تا هر دو پاسخ ایمنی همورال و سلولار فعال گردد و کارایی واکسن افزایش یابد. در مطالعه‌ی حاضر از پروتئین ریکامبیننت هپاتیت B (Recombinant hepatitis B surface antigen) یا rHbsAg) (۳۹-۲۲، ۵) برای این منظور استفاده شد.

امروزه مشخص شده است که مولکول حامل پروتئین سبب فعال شدن لنفوسیت‌های T (T-helper) نسبت به ساختار مولکولی (آنتی‌ژنیکی) پلی‌ساکارید بعد از ارایه‌ی مولکول کونژوگه به لنفوسیت‌های B می‌شود. با اتصال پلی‌ساکارید کپسول باکتری به یک پروتئین ناقل، پاسخ ایمنی وابسته به سلول T در میزبان ایمن شده، القا می‌گردد و خاطره‌ی ایمونولوژیک تماس با ماکرومولکول کونژوگه ایجاد می‌شود (۴۱-۴۰). بسیاری از پلی‌ساکاریدهای باکتریایی در حالت طبیعی فاقد گروه‌های شیمیایی فعال مانند گروه‌های آمینو و یا کربوکسیل هستند و به همین دلیل به طور مستقیم نمی‌توانند به یک حامل پروتئینی به صورت کووالان متصل شوند. در کونژوگاسیون به روش آمیداسیون که یکی از بهترین روش‌های موجود برای کونژوگه کردن ترکیبات پلی‌ساکاریدی به پروتئین می‌باشد، از آدیپیک اسید دی‌هیدرازید (Adipic acid dihydrazide یا ADH) به عنوان یک مولکول فاصله‌گذار ۶ کربنه و از ۱-اتیل-۳ (۳-دی‌متیل آمینوپروپیل) کربودیمید [Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodimide] 1 به عنوان عامل جفت کننده استفاده می‌شود که سبب اتصال کووالان مشتق ADH با پلی‌ساکارید به حامل پروتئینی به صورت پیوند آمیدی بین هیدرازید پلی‌ساکارید با گروه‌های کربوکسیل پروتئین می‌گردد (۵۱-۴۲).

روش‌ها

برای استخراج پلی‌ساکارید NMA-CPS، سویه‌ی استاندارد (CSBPI, G243) نایسریا منتژیتیدیس سروتایپ A از کلکسیون نگهداری باکتری‌های استاندارد بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه‌ی آنتی‌ژن مجتمع تولیدی- تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران تهیه و باکتری احیا گردید. پس از سه ساعت، کشت مجدد باکتری روی پلیت Mueller hinton agar انجام گرفت و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، از این پلیت‌ها کلنی‌های تکی انتخاب گردید و در دو لوله‌ی Mueller hinton agar کشت و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. روز بعد، یک لوله جهت کنترل سویه مورد استفاده قرار گرفت؛ به این ترتیب که از آن، لام گرم تهیه شد و گرم منفی بودن و کوکسی بودن باکتری مورد تأیید قرار گرفت. همچنین، با آنتی‌سرم مناسپسیفیک ضد NMA، آزمایش سرولوژی انجام شد و NMA با روش آگلوتیناسیون روی لام مورد تأیید قرار گرفت. با تأیید آزمایش‌هایی که روی لوله‌ی اول انجام گرفته بود، لوله‌ی دوم برای تهیه‌ی بذر جهت کشت در فرمانتور استفاده گردید.

تخلیص پلی‌ساکارید کپسولی طی مراحل مختلف شامل «تهیه‌ی محیط کشت فرانتز در یک لیتر آب مقطر، آماده‌سازی عصاره‌ی مخمر دیالیز شده، تهیه‌ی محیط کشت بذر، تهیه‌ی بذر تلقیحی، آماده‌سازی فرمانتور، کشت و تلقیح بذر به فرمانتور و سپس تخلیص نهایی پلی‌ساکارید کپسولی» در فرمانتور انجام گرفت. تخلیص نهایی پلی‌ساکارید کپسولی نیز با استخراج فنل سرد، اولتراسانتریفوژ و استخراج الکلی صورت گرفت. بعد از استخراج پلی‌ساکارید کپسولی، کونژوگاسیون NMA-CPS با HbsAg انجام شد. در ابتدای اتصال پلی‌ساکارید NMA-CPS با ADH، مشتق NMA-CPS-ADH تشکیل و EDAC [Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide-۱] باعث اتصال آمیدی بین هیدرازید این مشتق با گروه کربوکسیل پروتئین گردید (۶۵-۵۴).

در نهایت بعد از دیالیز کامل، محلول کونژوگه‌ی حاصل در داخل کیسه‌ی دیالیز و در یک ویال ریخته شد و برای خالص‌سازی مولکول‌های کونژوگه از مولکول‌های غیر کونژوگه، از ستون کروماتوگرافی سفاروز 4B-CL عبور داده شد و به این صورت فرکشن‌ها جمع‌آوری گردید. جذب نوری (Optical density یا OD) فرکشن‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت شد و لوله‌هایی که بیشترین جذب را داشتند، به عنوان فرکشن‌های حاوی مولکول کونژوگه جمع‌آوری و با هم ادغام گردید. تعدادی آزمون کنترل کیفی بر روی پلی‌ساکارید کپسولی و مولکول کونژوگه انجام گرفت. برای سنجش مقدار پلی‌ساکارید در واحد وزن محصول، O- استیل نمونه به روش Hestrin و Cabot و Mayer اندازه‌گیری شد (۵۵-۴۷).

مبنای تعیین میزان پلی‌ساکارید در کونژوگه‌ی NMA-CPS-HbsAg، سنجش میزان O- استیل اختصاصی موجود در NMA-CPS نمونه بود. با استفاده از سرم آلبومین گاوی (Bovine serum albumin یا BSA) خالص به عنوان استاندارد، آلودگی پروتئین احتمالی در پلی‌ساکارید خالص و مقدار پروتئین ماکرومولکول کونژوگه به روش Lowry اندازه‌گیری شد (۵۲-۴۹).

جهت ارزیابی ایمونولوژیک و تهیه‌ی سرم‌های ایمن شده در تحقیق حاضر نیز دو گروه دوتایی خرگوش سفید نیوزلندی با وزن ۱/۵ تا ۲ کیلوگرم انتخاب شد. تزریق آنتی‌ژن‌ها (پلی‌ساکارید کپسولی خالص و کونژوگه‌ی تهیه شده) به صورت داخل عضلانی در روزهای ۰، ۱۵ و ۳۰ صورت گرفت و خونگیری نیز در روزهای ۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ به منظور بررسی خواص ایمونوژنیسیته و انجام روش سرم باکتریسیدال (Serum bactericidal assay یا SBA) انجام شد. آزمون بررسی فعالیت باکتریسیدالی سرم حیوان ایمن شده روشی آزمایشگاهی برای ارزیابی فعالیت باکتری‌کشی سرم است. در واقع، بررسی فعالیت باکتریسیدالی آنتی‌بادی‌های تولید شده ضد منگوکوک، مهم‌ترین و دقیق‌ترین آزمون در ارزیابی ایمونولوژیک عفونت‌های ناشی از این باکتری در طی سیر ابتلا به بیماری و یا پس از انجام واکسیناسیون می‌باشد (۵۹-۵۳).

برای انجام تست SBA، ابتدا سویه‌ی استاندارد (CSBPI, G-243) باکتری NMA بر روی لوله‌ی حاوی محیط کشت Müller-Hinton agar کشت شد و بعد از رشد باکتری، لوله‌ی حاوی کلنی باکتری با بافر سالین فسفات (Phosphate buffered saline یا PBS) در pH = ۷/۲ شستشو گردید. سپس، ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون برداشته شد و با استفاده از PBS تا جایی رقیق گردید که کدورتی معادل لوله‌ی شماره‌ی ۳ McFarland (رقت $۱۰^{۹}$) حاصل شود. در مرحله‌ی بعد رقت $۱۰^{۳}$ از نمونه‌ی باکتری تهیه شد. رقت $۱۰^{۳}$ CFU/ml از نمونه‌ی باکتری، برای انجام SBA مناسب می‌باشد (۶۶-۶۰).

سرم‌ها جهت غیر فعال شدن به مدت ۳۰ دقیقه در داخل بن‌ماری با دمای ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت که این کار باعث از بین رفتن منبع کمپلمان سرم می‌شود. برای هر نمونه‌ی سرم، ۸ چاهک به صورت افقی در نظر گرفته شد و برای منبع کمپلمان خارجی در آزمون نیز از سرم خون بچه‌ی خرگوش ۳ هفته‌ای استفاده شد؛ سپس، اضافه کردن ۵۰ لاندا از تامپون Dulbecco`s phosphate buffered saline (DPBS) به همه‌ی چاهک‌ها (به جز چاهک‌های اول ردیف عمودی)، اضافه کردن ۱۰۰ لاندا از سرم‌های غیر فعال شده در چاهک‌های ردیف اول عمودی، برداشتن ۵۰ لاندا از چاهک ردیف اول عمودی و اضافه کردن به چاهک دوم و انجام رقیق‌سازی تا انتها، اضافه کردن ۵۰ لاندا تامپون DPBS و پس از آن اضافه کردن ۵۰ لاندا از سوسپانسیون باکتریایی با رقت $۱۰^{۳}$ و ۵۰ لاندا از سرم بچه‌ی خرگوش به عنوان منبع کمپلمان به همه‌ی چاهک‌ها، گذاشتن درب پلیت به مدت ۱ ساعت و قرار دادن در دمای آزمایشگاه به ترتیب انجام گرفت.

بعد از یک ساعت، ۵۰ لاندا از هر چاهک برداشته شد و به پلیت‌های حاوی Mueller hinton agar منتقل گردید و به صورت چمنی کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت یک شب در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس خارج گردید. تعداد کلنی‌های هر یک از پلیت‌ها شمارش شد و رقت سرمی پلیت‌هایی که تعداد کلنی‌های رشد یافته در آن‌ها ۵۰ درصد یا کمتر از کلنی‌های پلیت کنترل باکتریایی بود، به عنوان تیتر مثبت در نظر گرفته شد. همچنین، ۳ چاهک (کنترل منفی، کنترل مثبت و کنترل باکتریایی) در میکروپلیت به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

با انجام تست آگلوتیناسیون روی لام در مجاورت آنتی‌سرم اختصاصی NMA-CPS، باکتری NMA شناسایی و تأیید شد. همچنین، از کلنی‌های تکی ایجاد شده بر روی سطح پلیت Mueller hinton agar، لام تهیه و رنگ‌آمیزی گرم انجام گردید که کوکسی‌های گرم منفی زیر میکروسکوپ، حاکی از وجود نایسریا منتژیتیدیس بود.

پس از تلقیح بذر NMA سویه‌ی CSBPI, G-243 به ۴۰ لیتر محیط فرانتز اصلاح شده‌ی حاوی عصاره‌ی مخمر در فرمانتور، همه‌ی پارامترهای تخمیر در شرایط کنترل شده و مطلوب کشت غوطه‌ور در فرمانتور تا انتهای فاز لگاریتمی رشد تنظیم و هر ۲ ساعت یک بار کنترل شد تا این که سلول‌های باکتری به انتهای فاز لگاریتمی و حداکثر رشد و تکثیر خود رسیدند و سپس پلی‌ساکارید کپسولی نایسریا منتژیتیدیس با روش‌های ذکر شده، تخلیص گردید و کونژوگاسیون پلی‌ساکارید کپسولی و پروتئین ریکامبیننت هپاتیت B نیز طبق روش ذکر شده در قسمت‌های قبل انجام گرفت.

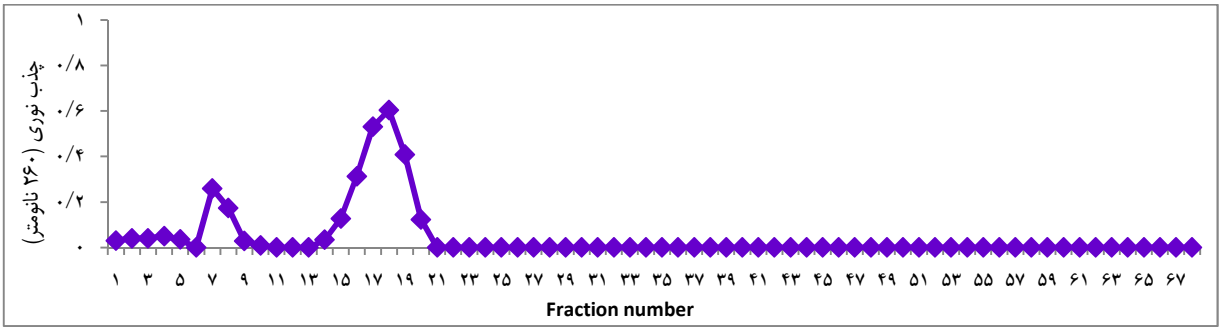
ترکیب نهایی نمونه به ستون سفاروز 4B-CL تزریق و OD فرکشن‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. فرکشن‌هایی که دارای OD بالاتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر بودند، با هم ادغام شدند. با توجه به شکل ۱ و ODهای به دست آمده از فرکشن‌های مختلف، قله‌ی اول مربوط به کونژوگه می‌باشد. در واقع مولکول کونژوگه‌ی گلیکوپروتئینی به دلیل وزن مولکولی بیشتر از هر یک از اجزای آن (پروتئین و پلی‌ساکارید)، سریع‌تر از ستون سفاروز خارج شد. مولکول کونژوگه نشان دهنده‌ی کونژوگه شدن NMA-CPS با حامل پروتئینی (پروتئین ریکامبیننت هپاتیت B) است و در ادامه، پروتئین‌های کونژوگه نشده از ستون موجود خارج شدند.

خالص میزان O- استیل در پلی‌ساکارید NMA-CPS و کونژوگه‌ی گلیکوپروتئینی به ترتیب ۲/۷ و ۱/۱۰ میکرومول در هر میلی‌گرم وزن محاسبه شد. با مقایسه‌ی میزان O- استیل اختصاصی در پلی‌ساکارید خالص قبل از انجام عملیات کونژوگاسیون و O- استیل اختصاصی پلی‌ساکارید موجود در کونژوگه‌ی گلیکوپروتئینی، کارایی

کونژوگاسیون بر حسب درصد وزنی برای کپسول NMA-CPS، ۴۰/۷ درصد به دست آمد. فرکشن‌هایی که بیشترین OD را داشتند، با هم ادغام و لیوفیلیزه شدند و میزان پروتئین آن‌ها با استفاده از تست Lowry سنجش گردید. میزان پروتئین پیک یک ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و پیک دو، ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. پیک ۱، پیک کونژوگه و نشان دهنده‌ی کونژوگه شدن NMA-CPS با حامل پروتئینی (پروتئین ریکامبینت هپاتیت B) می‌باشد.

با توجه به میزان پروتئین کونژوگه و میزان پروتئین کل، کارایی کونژوگاسیون ۱۷/۴ درصد برآورد شد و میزان ناخالصی پروتئین در پلی‌ساکارید کپسولی کمتر از ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر گرم پلی‌ساکارید بود که نتیجه قابل قبول می‌باشد. از آن‌جایی که مهم‌ترین آزمون در ارزیابی‌های ایمونولوژیک واکسن‌های منتگوکوکی، بررسی فعالیت باکتریسیدالی سرم است؛ آزمایش فوق به صورت کمی روی نمونه‌های سرمی حیوان ایمن شده با کونژوگه (NMA-CPS-HbsAg) و NMA-CPS خالص بر علیه سویه‌ی استاندارد (CSBPI, G-243) سروتایپ A و پروتئین ریکامبینت هپاتیت B انجام گرفت. نتایج جداول ۱ و ۲ و شکل ۲ نشان می‌دهد که ماکرومولکول کونژوگه توانایی القای سنتز آنتی‌بادی باکتریسیدالی را در حیوان ایمن شده بعد از اولین تزریق داشت و تزریق یادآور دوم و سوم در بازه‌های زمانی ۱۵ روزه، باعث القای سنتز سطح بالایی از آنتی‌بادی باکتریسیدال در این گروه بر علیه سروتایپ A منتگوکوک و HbsAg می‌شود.

در این تست، رقتی از سرم که در مقایسه با پلیت کنترل باکتریایی، بیش از ۵۰ درصد کلونی‌ها را کشته باشد، به عنوان تیتر مثبت در نظر گرفته می‌شود که تعداد کلونی‌ها در پلیت کنترل باکتریایی، ۱۹۰ کلونی بود. با مقایسه‌ی تیتر باکتری‌کشی سرم‌ها، مشخص شد که تیتر باکتری‌کشی NMA-CPS خالص تا تیتر ۱/۸، مثبت شد و اثر باکتری‌کشی داشت و تزریق دوز یادآور با NMA-CPS خالص هم تأثیری در افزایش تیتر باکتری‌کشی نشان نداد. میزان تیتر باکتری‌کشی کونژوگه‌ی NMA-CPS-HbsAg در تزریق اول، ۱/۶۴ به دست آمد که این میزان نه تنها بیشتر از تیتر باکتری‌کشی NMA-CPS خالص در همین تزریق بود، بلکه با تزریق دوز یادآور افزایش یافت و به حدود ۱/۱۲۸ رسید. نتایج حاصل شده نشان دهنده‌ی آن است که کونژوگه‌ی مورد نظر نه تنها ایمنی بیشتری در مرحله‌ی اول نسبت به پلی‌ساکارید تنها ایجاد نمود، بلکه در مرحله‌ی دوم، تزریق تیتر آن به نحو قابل ملاحظه‌ای بالاتر رفت که ناشی از پاسخ ایمنی وابسته به سلول T (ایمنی سلولی) می‌باشد. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که کونژوگه در دوز یادآور می‌تواند سطح ایمنی بهتری ایجاد نماید.



شکل ۱. طیف جذبی فرکشن‌های مختلف حاصل از ستون سفاروز 4B-CL در طول موج ۲۶۰ نانومتر

جدول ۱. تیتر باکتری‌کشی Immunoglobulin G (IgG) تولید شده علیه Neisseria meningitidis capsule و Neisseria meningitidis capsul-hepatitis B surface antigen در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ بر اساس تعداد کلنی

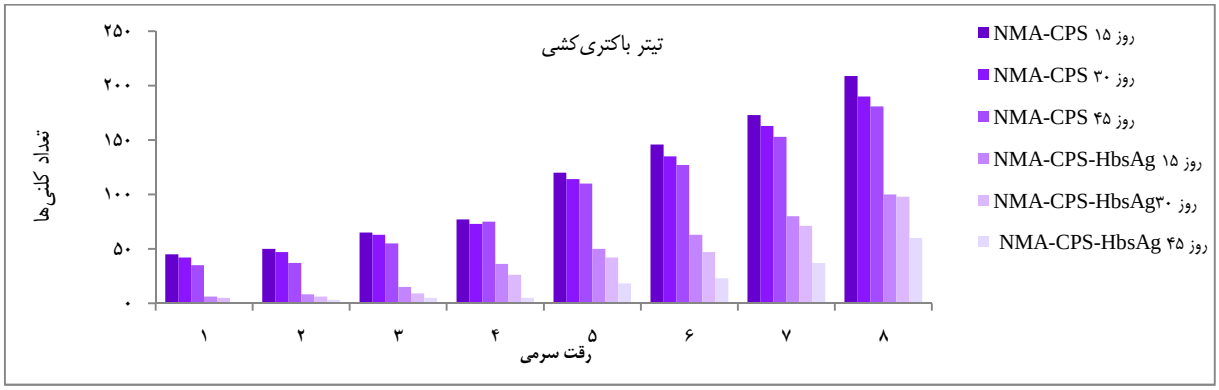
	رقت	۱	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$
تعداد کلنی‌ها	NMA-CPS روز ۱۵	۴۵	۵۰	۶۵	۷۷	۱۲۰	۱۴۶	۱۷۳	۲۰۹
	NMA-CPS روز ۳۰	۴۲	۴۷	۶۳	۷۳	۱۱۴	۱۳۵	۱۶۳	۱۹۰
	NMA-CPS روز ۴۵	۳۵	۳۷	۵۵	۷۵	۱۱۰	۱۲۷	۱۵۳	۱۸۱
	NMA-CPS-HbsAg روز ۱۵	۶	۸	۱۵	۳۶	۵۰	۶۳	۸۰	۱۰۰
	NMA-CPS-HbsAg روز ۳۰	۵	۶	۹	۲۶	۴۲	۴۷	۷۱	۹۸
	NMA-CPS-HbsAg روز ۴۵	۱	۳	۵	۵	۱۸	۲۳	۳۷	۶۰

NMA-CPS: Neisseria meningitidis capsule; NMA-CPS-HbsAg: Neisseria meningitidis capsul-hepatitis B surface antigen

جدول ۲. تیتر باکتری‌کشی Immunoglobulin G (IgG) تولید شده علیه Neisseria meningitidis capsule و Neisseria meningitidis capsul-hepatitis B surface antigen در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵

	رقت	۱	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$
تعداد کلنی‌ها	NMA-CPS روز ۱۵	+	+	+	+	–	–	–	–
	NMA-CPS روز ۳۰	+	+	+	+	–	–	–	–
	NMA-CPS روز ۴۵	+	+	+	+	–	–	–	–
	NMA-CPS-HbsAg روز ۱۵	+	+	+	+	+	+	+	–
	NMA-CPS-HbsAg روز ۳۰	+	+	+	+	+	+	+	–
	NMA-CPS-HbsAg روز ۴۵	+	+	+	+	+	+	+	+

NMA-CPS: Neisseria meningitidis capsule; NMA-CPS-HbsAg: Neisseria meningitidis capsul-hepatitis B surface antigen



شکل ۲. تیتر باکتری‌کشی Immunoglobulin G (IgG) در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ در روش SBA (Serum bactericidal assay)

رقت‌های ۱ تا ۸ به ترتیب ۱، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴ و ۱/۱۲۸

NMA-CPS: Neisseria meningitidis capsule; NMA-CPS-HbsAg: Neisseria meningitidis capsul-hepatitis B surface antigen

بحث

در دهه‌ی اخیر شایع‌ترین عامل منتژیت باکتریایی، نایسریا منتژیتیدیس بوده است که عوارض متعدد و میزان مرگ و میر بالایی را در مبتلایان به همراه دارد (۱۴، ۱۱). سروتایپ‌های شایع در بروز بیماری شامل A، B، C، Y و W135 می‌باشند. تاکنون واکسن‌های فراوانی برای پیش‌گیری از عفونت‌های منتگوکوکی سروتایپ A تولید و به بازار عرضه شده است که از آن جمله می‌توان به واکسن‌های بر پایه‌ی پلی‌ساکارید کپسولی اشاره نمود. مزیت واکسن کپسولی نایسریا منتژیتیدیس سروتایپ A، فرمولاسیون مشخص و بدون عوارض بودن آن می‌باشد و می‌تواند مصونیت مفید و مؤثری علیه منتژیت ایجاد کند، اما کپسول NMA-CPS و خیلی از باکتری‌های پاتوژن دیگر، ایمنی‌زایی ضعیفی در کودکان و بزرگ‌سالان دارند. پاسخ ایمنی نسبت به این پلی‌ساکارید غیر وابسته به سلول T است؛ یعنی در پاسخ ایمنی سلول خاطره ایجاد نمی‌شود. از این‌رو دوز یادآور آن تأثیری در بالا بردن سطح ایمنی و تیتر آنتی‌بادی ندارد. بنابراین، در کودکان زیر ۲ سال و خردسالان ایمنی کاملی ایجاد نمی‌کند. پس برای از بین بردن این کمبود، از برخی پروتئین‌ها به عنوان حامل برای کونژوگه نمودن پلی‌ساکارید NMA-CPS استفاده می‌شود تا هر دو پاسخ ایمنی همورال و سلولار فعال گردد و کارایی واکسن افزایش یابد (۷۳-۶۰).

واکسن کونژوگه با اتصال یک آنتی‌ژن به یک حامل پروتئینی ساخته می‌شود. امروزه مشخص شده است که مولکول حامل، سبب فعال شدن لنفوسیت‌های T نسبت به ساختار مولکولی (آنتیژنیکی) هاپتن (پلی‌ساکارید) بعد از ارایه‌ی مولکول کونژوگه با کمک لنفوسیت‌های B می‌گردد (۷۹-۷۴).

در تحقیق حاضر از حامل پروتئینی هپاتیت B به عنوان یک پروتئین حامل استفاده شد. همچنین، مقدار پروتئین موجود در کونژوگه‌ی تهیه شده با روش Lowry تعیین گردید و با توجه به این میزان و میزان پروتئین کل، بازده‌ی کونژوگاسیون بر حسب وزن پروتئین، ۱۷/۴ درصد محاسبه گردید. بازده‌ی کونژوگاسیون بر حسب وزن پروتئین در مطالعات van der Voort و همکاران (۳۵) و Christodoulides و همکاران (۳۶)، ۳۰ تا ۶۰ درصد تخمین زده شد. بنابراین، نتایج پژوهش حاضر با نتایج مطالعات آنان (۳۶-۳۵) تا حدودی مطابقت داشت. همچنین، با مقایسه‌ی میزان O- استیل اختصاصی در پلی‌ساکارید خالص قبل از انجام عملیات کونژوگاسیون

و O- استیل اختصاصی پلی‌ساکارید موجود در کونژوگه‌ی گلیکوپروتئینی، کارایی کونژوگاسیون بر حسب درصد وزنی برای کپسول NMA-CPS، ۴۰/۷ درصد به دست آمد و این کارایی در تحقیق Jin و همکاران (۶۳) برای پلی‌ساکارید کپسولی سروتایپ A موجود در کونژوگه حدود ۴۰ درصد بر حسب درصد وزن پلی‌ساکارید به دست آمد.

با استفاده از روش SBA مشخص شد که ماکرومولکول کونژوگه‌ی مطالعه‌ی حاضر نسبت به پلی‌ساکارید خالص تنها، تیتر بالاتری از ایمنی را القا می‌کند و می‌تواند به عنوان یک ایمونوژن دو ظرفیتی مورد بررسی و آزمایش‌های بیشتری قرار گیرد. نتایج حاکی از آن بود که کونژوگه‌ی مورد نظر نه تنها ایمنی بیشتری در مرحله‌ی اول نسبت به پلی‌ساکارید تنها ایجاد نمود، بلکه در مرحله‌ی دوم تزریق، تیتر آن به نحو قابل توجهی بالاتر رفت که ناشی از پاسخ ایمنی وابسته به سلول T (ایمنی سلولی) می‌باشد.

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که کونژوگه در دوز یادآور می‌تواند سطح ایمنی بهتری را ایجاد نماید. با اطلاعاتی که تاکنون به دست آمده است، در ایران تحقیقاتی روی کونژوگه نمودن پلی‌ساکارید کپسولی نایسریا منتژیتیدیس به حامل‌های مختلف انجام گرفته است که از آن جمله می‌توان به اقداماتی در جهت تخلیص، تولید و ارزیابی ایمونولوژیک پلی‌ساکارید NMA-CPS در بخش واکسن‌سازی باکتریایی انستیتو پاستور ایران و نیز کارهایی در جهت کونژوگه نمودن پلی‌ساکاریدهای دیگر از جمله پلی‌ساکارید کپسولی Vi سالمونلا تیفی و همچنین، پلی‌ساکارید کپسولی نایسریا منتژیتیدیس سروتایپ A و C با حامل‌های مختلف مانند اگزوتوکسین A سودوموناس آئروژینوزا و توکسوئید کزاز و... به صورت طرح‌های تحقیقاتی مختلف اشاره نمود که در آن‌ها پروتئین هپاتیت B به عنوان حامل استفاده نشده بود و اغلب حامل‌های پروتئینی مورد استفاده در کونژوگاسیون با پلی‌ساکاریدهای کپسولی، وزن مولکولی بالایی داشتند. هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی این موضوع بود که آیا کونژوگاسیون یک پلی‌ساکارید کپسولی دارای پروتئین وزن مولکولی پایین (مانند پروتئین هپاتیت B با وزن مولکولی ۲۴ کیلودالتون)، می‌تواند ایمنی‌زایی مناسبی را ایجاد کند و این کونژوگه قادر است به عنوان یک ایمونوژن دو ظرفیتی مناسب مورد استفاده قرار گیرد؟

هدف از انجام بررسی حاضر، تهیه‌ی ایمونوژن با استفاده از کونژوگه کردن پلی‌ساکارید NMA-CPS به پروتئین HbsAg با پیوند کووالان بود که این محصول بتواند پاسخ ایمنی وابسته به سلول T ایجاد کند (یعنی ایمنی کامل ایجاد نماید) و نیز در جهت ساخت واکسن‌های چند ظرفیتی مورد استفاده قرار گیرد؛ چرا که پاسخ ایمنی پلی‌ساکارید کپسولی به تنهایی غیر وابسته به سلول T است و در کودکان ایمنی ناقصی ایجاد می‌کند. با کونژوگه کردن پروتئین‌هایی از جمله پروتئین هپاتیت B به این پلی‌ساکارید، کپسولی لازم است که این عیب (یعنی وابستگی به سلول‌های T پلی‌ساکارید کپسولی خالص) را از بین ببرد و با توجه به نتایجی که با آزمون‌های انجام شده به دست آمد، این پروتئین می‌تواند یک حامل پروتئینی قابل قبول برای NMA-CPS باشد و ایمنی مناسبی ایجاد کند.

تشکر و قدردانی

از تمام کارکنان محترم بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه‌ی آنتی‌ژن مجتمع تولیدی- تحقیقاتی انستیتو پاستور کرج تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Adibfar P. Medical microbiology. 3rd ed. Tehran, Iran; Noor-e-Danesh Publications; 1982. p. 480-8. [In Persian].
2. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick, and Adelbergs medical microbiology. 25th ed. New York, NY: McGraw-Hil Publishing Company; 2010.
3. Malekzadeh F. Microbiology. Tehran, Iran: Tehran University Press; 1992. p. 173-82. [In Persian].
4. Namavar H, Zarabi M. Dorland's medical dictionary. Tehran, Iran; Yadvareh-Ketab Publications; 1993. p. 60-95. [In Persian].
5. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 6th ed. London, UK: Churchill Livingstone; 2004. p. 1079-171, 2498-513.
6. Goldman L, Ausiello D. Cecil textbook of medicine. 22nd ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2004. p. 1728-1930.
7. Schaechter M, Engleberg NC, Eisenstein BI, Medoff G. Mechanisms of microbial disease. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 1999. p. 535-49.
8. Nester EW, Roberts CE, Pearsal NN, Anderson DG, Nester MT. Microbiology: A human perspective. 2nd ed. New York, NY: McGraw-Hill; 1998. p. 626-49.
9. Collier L, Balows A, Sussman M. Topley and Wilson's, Microbiology and microbial infection: Bacterial infection. 9th. New York, NY: Oxford University Press; 1998. p. 299-318, 887-90.
10. George Ray CG, Sherris JC, Ryan KJ. Sherris medical microbiology: An introduction to infectious diseases. 4th ed. New York, NY: McGraw-Hill Medical; 2003. p. 873-80.
11. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal disease. N Engl J Med 2001; 344(18): 1378-88.
12. Quagliarello VJ, Scheld WM. Treatment of bacterial meningitis. N Engl J Med 1997; 336(10): 708-16.

13. Scheld WM, Koedel U, Nathan B, Pfister HW. Pathophysiology of bacterial meningitis: mechanism(s) of neuronal injury. J Infect Dis 2002; 186(Suppl 2): S225-S233.
14. Jodar L, Feavers IM, Salisbury D, Granoff DM. Development of vaccines against meningococcal disease. Lancet 2002; 359(9316): 1499-508.
15. Morley SL, Pollard AJ. Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? Vaccine 2001; 20(5-6): 666-87.
16. van Deuren M, Brandtzaeg P, van der Meer JW. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. Clin Microbiol Rev 2000; 13(1): 144-66, table.
17. Kyaw MH, Clarke SC, Christie P, Jones IG, Campbell H. Invasive meningococcal disease in Scotland, 1994 to 1999, with emphasis on group B meningococcal disease. J Clin Microbiol 2002; 40(5): 1834-7.
18. Cartwright K, Noah N, Peltola H. Meningococcal disease in Europe: epidemiology, mortality, and prevention with conjugate vaccines. Report of a European advisory board meeting Vienna, Austria, 6-8 October, 2000. Vaccine 2001; 19(31): 4347-56.
19. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Harrison's principles of internal medicine. 15th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2001. p. 927-30.
20. Pollard AJ, Moxon ER. The meningococcus tamed? Arch Dis Child 2002; 87(1): 13-7.
21. Winstead JM, McKinsey DS, Tasker S, de Groote MA, Baddour LM. Meningococcal pneumonia: characterization and review of cases seen over the past 25 years. Clin Infect Dis 2000; 30(1): 87-94.
22. MacLennan J, Obaro S, Deeks J, Lake D, Elie C, Carlone G, et al. Immunologic memory 5 years after meningococcal A/C conjugate vaccination in infancy. J Infect Dis 2001; 183(1): 97-104.
23. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Baliey and Scott's: Diagnostic microbiology. 11th ed. Philadelphia, PA: Mosbey; 2002. p. 502-11.
24. Macfadin JF. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2000. p. 333-48.
25. Stuart Walker T. Microbiology. Philadelphia, PA: Saunders; 1998. p. 140-3.
26. Dieckelmann M, Roddam LF, Jennings MP. Purification of post-translationally modified proteins from bacteria: homologous expression and purification of histidine-tagged pilin from Neisseria meningitidis. Protein Expr Purif 2003; 30(1): 69-77.
27. Tonjum T, Caugant DA, Dunham SA, Koomey M. Structure and function of repetitive sequence elements associated with a highly polymorphic domain of the Neisseria meningitidis PilQ protein. Mol Microbiol 1998; 29(1): 111-24.
28. Massari P, Ram S, Macleod H, Wetzler LM. The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. Trends Microbiol 2003; 11(2): 87-93.
29. van der Ley P, Heckels JE, Virji M, Hoogerhout P, Poolman JT. Topology of outer membrane porins in pathogenic Neisseria spp. Infect Immun 1991; 59(9): 2963-71.
30. Lang H. Outer membrane proteins as surface display systems. Int J Med Microbiol 2000; 290(7): 579-85.
31. Jansen C, Wiese A, Reubsaet L, Dekker N, de CH, Seydel U, et al. Biochemical and biophysical characterization of in vitro folded outer membrane porin PorA of Neisseria meningitidis. Biochim Biophys Acta 2000; 1464(2): 284-98.
32. Sacchi CT, Lemos AP, Popovic T, de Morais JC, Whitney AM, Melles CE, et al. Serosubtypes and PorA types of Neisseria meningitidis serogroup B isolated in Brazil during 1997--1998: overview and implications for vaccine development. J Clin Microbiol 2001; 39(8): 2897-903.
33. van den Elsen J, Vandeputte-Rutten L, Kroon J Gros P. Bactericidal antibody recognition of meningococcal Por A by induced fit. J Bio Chem 1999; 274(3): 1495-501.
34. Vermont CL, van Dijken HH, Kuipers AJ, van Limpt CJ, Keijzers WC, van der Ende A, et al. Cross-reactivity of antibodies against PorA after vaccination with a meningococcal B outer membrane vesicle vaccine. Infect Immun 2003; 71(4): 1650-5.
35. van der Voort ER, van DH, Kuipers B, van der Biezen J, van der Ley P, Meylis J, et al. Human B- and T-cell responses after immunization with a hexavalent PorA meningococcal outer membrane vesicle vaccine. Infect Immun 1997; 65(12): 5184-90.
36. Christodoulides M, Rattue E, Heckels JE. Effect of adjuvant composition on immune response to a multiple antigen peptide (MAP) containing a protective epitope from Neisseria meningitidis class 1 porin. Vaccine 1999; 18(1-2): 131-9.
37. Milagres LG, Gorla MC, Sacchi CT, Rodrigues MM. Specificity of bactericidal antibody response to serogroup B meningococcal strains in Brazilian children after immunization with an outer membrane vaccine. Infect Immun 1998; 66(10): 4755-61.
38. van der Voort ER, van der Ley P, van der Biezen J, George S, Tunnela O, van DH, et al. Specificity of human bactericidal antibodies against PorA P1.7,16 induced with a hexavalent meningococcal outer membrane vesicle vaccine. Infect Immun 1996; 64(7): 2745-51.
39. Peeters CC, Rumke HC, Sundermann LC, Rouppe van der Voort EM, Meulenbelt J, Schuller M, et al. Phase I clinical trial with a hexavalent PorA containing meningococcal outer membrane vesicle vaccine. Vaccine 1996; 14(10): 1009-15.
40. Wright JC, Williams JN, Christodoulides M, Heckels JE. Immunization with the recombinant PorB outer membrane protein induces a bactericidal immune response against Neisseria meningitidis. Infect Immun 2002; 70(8): 4028-34.
41. van der Ley P, Poolman JT. Construction of a multivalent meningococcal vaccine strain based on the class 1 outer membrane protein. Infect Immun 1992; 60(8): 3156-61.
42. Michaelsen TE, Aase A, Kolberg J, Wedge E, Rosenqvist E. PorB3 outer membrane protein on Neisseria meningitidis is poorly accessible for antibody binding on live bacteria. Vaccine 2001; 19(11-12): 1526-33.
43. Tappero JW, Lagos R, Ballesteros AM, Plikaytis B,

Williams D, Dykes J, et al. Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. JAMA 1999; 281(16): 1520-7.
44. Henderson B, Wilson M, McNab R, Lax AJ. Cellular microbiology: Bacteria- Host interactions in health and disease. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons; 2000. p. 191-271, 311-55.
45. Mirlashari MR, Hoiby EA, Holst J, Lyberg T. Outer membrane vesicles from Neisseria meningitidis: effects on cytokine production in human whole blood. Cytokine 2001; 13(2): 91-7.
46. Pollard AJ, Frasch C. Development of natural immunity to Neisseria meningitidis. Vaccine 2001; 19(11-12): 1327-46.
47. Al'Aldeen AA, Cartwright KA. Neisseria meningitidis: vaccines and vaccine candidates. J Infect 1996; 33(3): 153-7.
48. Rappuoli R, Normark S, Cossart PF. Cellular microbiology. Washington,DC: American Society Microbiology; 2000. p. 68-94, 291-310.
49. Fukasawa LO, Gorla MC, Lemos AP, Schenkman RP, Brandileone MC, Fox JW, et al. Immune response to native NadA from Neisseria meningitidis and its expression in clinical isolates in Brazil. J Med Microbiol 2003; 52(Pt 2): 121-5.
50. Martin D, Cadieux N, Hamel J, Brodeur BR. Highly conserved Neisseria meningitidis surface protein confers protection against experimental infection. J Exp Med 1997; 185(7): 1173-83.
51. Cadieux N, Plante M, Rioux CR, Hamel J, Brodeur BR, Martin D. Bactericidal and cross-protective activities of a monoclonal antibody directed against Neisseria meningitidis NspA outer membrane protein. Infect Immun 1999; 67(9): 4955-9.
52. Moe GR, Tan S, Granoff DM. Differences in surface expression of NspA among Neisseria meningitidis group B strains. Infect Immun 1999; 67(11): 5664-75.
53. Moe GR, Zuno-Mitchell P, Lee SS, Lucas AH, Granoff DM. Functional activity of anti-Neisserial surface protein A monoclonal antibodies against strains of Neisseria meningitidis serogroup B. Infect Immun 2001; 69(6): 3762-71.
54. Turner PC, Thomas CE, Stojiljkovic I, Elkins C, Kizel G, Ala'Aldeen DA, et al. Neisserial TonB-dependent outer-membrane proteins: detection, regulation and distribution of three putative candidates identified from the genome sequences. Microbiology 2001; 147(Pt 5): 1277-90.
55. Peak IR, Srikhanta Y, Dieckelmann M, Moxon ER, Jennings MP. Identification and characterisation of a novel conserved outer membrane protein from Neisseria meningitidis. FEMS Immunol Med Microbiol 2000; 28(4): 329-34.
56. Bhattacharjee AK, Moran EE, Ray JS, Zollinger WD. Purification and characterization of H.8 antigen from group B Neisseria meningitidis. Infect Immun 1988; 56(4): 773-8.
57. Masignani V, Comanducci M, Giuliani MM, Bambini S, Adu-Bobie J, Arico B, et al. Vaccination against Neisseria meningitidis using three variants of the lipoprotein GNA1870. J Exp Med 2003; 197(6): 789-99.
58. Welsch JA, Moe GR, Rossi R, Adu-Bobie J, Rappuoli R, Granoff DM. Antibody to Genome-Derived Neisserial Antigen 2132, a Neisseria meningitidis Candidate Vaccine, Confers Protection against Bacteremia in the Absence of Complement-Mediated Bactericidal Activity. Journal of Infectious Diseases 2003; 188(11): 1730-40.
59. Ruggeberg JU, Pollard AJ. Meningococcal vaccines. Paediatr Drugs 2004; 6(4): 251-66.
60. Robbins J B, Hill J C, Sadoff J C. Seminars in infectious diseases IV. Bacterial vaccines. New York, NY: Thieme-Stratton Corp; 1982. p. 242-75.
61. Gudlavalleti SK, Datta AK, Tzeng YL, Noble C, Carlson RW, Stephens DS. The neisseria meningitidis serogroup a capsular polysaccharide o-3 and o-4 acetyltransferase. J Biol Chem 2004; 279(41): 42765-73.
62. Jacobsson S, Issa M, Unemo M, Backman A, Molling P, Sulaiman N, et al. Molecular characterisation of group A Neisseria meningitidis isolated in Sudan 1985-2001. APMIS 2003; 111(11): 1060-6.
63. Jin Z, Chu C, Robbins JB, Schneerson R. Preparation and characterization of group A meningococcal capsular polysaccharide conjugates and evaluation of their immunogenicity in mice. Infect Immun 2003; 71(9): 5115-20.
64. Berkin A, Coxon B, Pozsgay V. Towards a synthetic glycoconjugate vaccine against Neisseria meningitidis A. Chemistry 2002; 8(19): 4424-33.
65. Boslego J, Garcia J, Cruz C, Zollinger W, Brandt B, Ruiz S, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of a meningococcal group B (15:P1.3) outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile. Chilean National Committee for Meningococcal Disease. Vaccine 1995; 13(9): 821-9.
66. Vermont C, van den Dobbelsteen G. Neisseria meningitidis serogroup B: laboratory correlates of protection. FEMS Immunol Med Microbiol 2002; 34(2): 89-96.
67. Peltola H. Meningococcal vaccines. Current status and future possibilities. Drugs 1998; 55(3): 347-66.
68. Diaz RJ, Outschoorn IM. Current status of meningococcal group B vaccine candidates: capsular or noncapsular? Clin Microbiol Rev 1994; 7(4): 559-75.
69. Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, Vaccines. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, Saunders; 2004. p. 959-87.
70. Martin SL, Borrow R, van der Ley P, Dawson M, Fox AJ, Cartwright KA. Effect of sequence variation in meningococcal PorA outer membrane protein on the effectiveness of a hexavalent PorA outer membrane vesicle vaccine. Vaccine 2000; 18(23): 2476-81.
71. Granoff DM, Kelsey SK, Bijlmer HA, van AL, Dankert J, Mandrell RE, et al. Antibody responses to the capsular polysaccharide of Neisseria meningitidis serogroup B in patients with meningococcal disease. Clin Diagn Lab Immunol 1995; 2(5): 574-82.
72. Lifely MR, Roberts SC, Shepherd WM, Esdaile J, Wang Z, Cleverly A, et al. Immunogenicity in adult males of a Neisseria meningitidis group B vaccine composed of polysaccharide complexed with outer membrane proteins. Vaccine 1991; 9(1): 60-6.

73. Shin JS, Lin JS, Anderson PW, Insel RA, Nahm MH. Monoclonal antibodies specific for Neisseria meningitidis group B polysaccharide and their peptide mimotopes. Infect Immun 2001; 69(5): 3335-42.
74. Finne J, Bitter-Suermann D, Goridis C, Finne U. An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. J Immunol 1987; 138(12): 4402-7.
75. Upreti RK, Kumar M, Shankar V. Bacterial glycoproteins: functions, biosynthesis and applications. Proteomics 2003; 3(4): 363-79.
76. Zinsser H, Joklik WJ. Zinsser microbiology. 20th ed. New York, NY: Appleton and Lange; 1988. p. 441-63
77. Rahman MM, Kolli VS, Kahler CM, Shih G, Stephens DS, Carlson RW. The membrane phospholipids of Neisseria meningitidis and Neisseria gonorrhoeae as characterized by fast atom bombardment mass spectrometry. Microbiology 2000; 146 (Pt 8): 1901-11.
78. Plested JS, Harris SL, Wright JC, Coull PA, Makepeace K, Gidney MA, et al. Highly conserved Neisseria meningitidis inner-core lipopolysaccharide epitope confers protection against experimental meningococcal bacteremia. J Infect Dis 2003; 187(8): 1223-34.
79. Schwartz B, Moore PS, Broome CV. Global epidemiology of meningococcal disease. Clin Microbiol Rev 1989; 2(Suppl): S118-S124.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 23.08.2015
Vol. 33, No. 359, 3rd Week, January 2016
Accepted: 14.11.2015

Preparation of ConjugateD Neisseria Meningitidis Type A Capsular Polysaccharide with Recombinant Protein of Hepatitis B as an Immunogen

Mahboobeh Mohamadamini MSc[1], Hojat Ahmadi MD[2], Bahman Tabaraie MD[3]

Original Article

Abstract

Background: Polysaccharide vaccines are effective in individuals from about the two years of age but, as they elicit T-cell independent immunity, they are not effective in younger children. In contrast, polysaccharide-protein conjugates are shown to be highly immunogenic in infants and induce T-cell dependent immunity.

Methods: In this study, capsular polysaccharide of Neisseria meningitidis type A (NMA-CPS) was attached to recombinant protein of hepatitis B surface antigen (rHbsAg) covalently using amidation method. Immunization was done, choosing 2 groups of rabbits. Pure NMA-CPS and conjugated molecule were injected to groups 1 and 2, with a 15-day interval, intramuscularly. The bleeding was performed at days 0, 15, 30, 45 and titers of sera were measured via serum bactericidal assay.

Findings: Polysaccharide bactericidal titer on days 15, 30 and 45 was almost identical and there was no increase in titer. But, in the first injection of the conjugate, the titer was much more (about twice of purified polysaccharide), and in the second injection, increased.

Conclusion: Results display that conjugated molecules cause more immunity than pure capsular polysaccharide, and can stimulate cellular immunity.

Keywords: Neisseria meningitidis type A, Conjugate, Immunogen, Recombinant protein, Hepatitis B, Serum bactericidal assay

Citation: Mohamadamini M, Ahmadi H, Tabaraie B. **reparation of ConjugateD Neisseria Meningitidis Type A Capsular Polysaccharide with Recombinant Protein of Hepatitis B as an Immunogen.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(359): 1955-64

1- Department of Microbiology, School of Science, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2- Associate Professor, Department of Bacterial Vaccine and Antigen Production, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Microbiology, School of Science, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
Corresponding Author: Hojat Ahmadi MD, Email: hojiahmadi@yahoo.com