

## فعالیت باکتریسیدالی وزیکول غشاء خارجی نیسریا مننژیتیدیس سروگروه B بعنوان کاندیدای واکسن مننگوکوکی در مدل حیوانی

سید داور سیادت<sup>۱\*</sup>، بهمن تبرایی<sup>۱</sup>، قربان بهزادبان نژاد<sup>۲</sup>، داریوش نوروزیان<sup>۳</sup>، حجت احمدی<sup>۱</sup>، شهین نجار پیرایه<sup>۴</sup>، اشرف محبتی مبارز<sup>۴</sup>، مهدی نجاتی<sup>۵</sup>، محمد حسین هدایتی<sup>۶</sup>

۱. استادیار بخش واکسن های باکتریایی و تهیه آنتی ژن انستیتو پاستور ایران
۲. دانشیار گروه میکروپزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳. دانشیار بخش واکسن های باکتریایی و تهیه آنتی ژن انستیتو پاستور ایران
۴. استادیار گروه میکروپزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۵. عضو هیئت علمی بخش واکسن های باکتریایی و تهیه آنتی ژن انستیتو پاستور ایران
۶. رئیس آزمایشگاه کنترل کیفی ۲ انستیتو پاستور ایران

نشانی برای مکاتبه: کیلومتر ۲۵ آزاد راه تهران - کرج مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران - بخش واکسن های باکتریایی و تهیه آنتی ژن،

تلفن: ۰۲۶۱۶۱۰۲۹۹۹، فاکس: ۰۲۶۱۶۱۰۲۹۰۰، [sd\\_siadat@yahoo.com](mailto: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 عمده ترین عوامل سببی مننژیت باکتریایی در انسان، از معضلات بهداشتی در سراسر جهان است. بررسی فعالیت باکتریسیدالی آنتی بادیهای تولید شده بر علیه مننگوکوک 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 بعنوان آزمایش استاندارد طلایی در بررسی واکسنهای تولیدی بر علیه سروگروه های مختلف نیسریا مننژیتیدیس ارائه و اعلام نمود.

**روش کار:** در تحقیق توصیفی-اکتشافی حاضر گونه استاندارد CSBPI, G245 نیسریا مننژیتیدیس سروگروه B ابتدا در یک شرایط کنترل شده کشت غوطه ور فرماتور در ۴۰ لیتر 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 - اولتراسانتریفوژ افرافی استخراج وخالص گردید و در فسفات بافر سالین حاوی سوکروز و تیومرسال هموزنیزه شد و با روش اولتراسوند آماده انجام بررسی های فیزیکوشیمیایی گردید. بدنبال ایمنونیزاسیون خرگوش ها با OMV در تزریقات یادآور ۱۴ و ۲۸ و ۴۲ روز بعد از اولین تزریق، خونگیری از حیوان در دوره های 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 ارزیابی های ایمنولوژیکی واکسن های مننگوکوکی است، آزمایش فوق به صورت کمی روی نمونه های سرمی حیوانات ایمن شده با OMV، بر علیه سویه استاندارد CSBPI, G-245 نیسریا مننژیتیدیس سروگروه B انجام گرفت.

**یافته ها:** نتایج نشان می دهد که OMV توانایی القاء سنتز آنتی بادی 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 آنتی بادی باکتریسیدال در حیوان ایمن شده بر علیه سروگروه B مننگوکوک می گردد. چنانکه مجموع میانگین عیار آنتی بادی باکتریسیدال در این گروه بر علیه سروگروه B مننگوکوک بسیار بالاتر از گروه کنترل است.

**نتیجه گیری:** بررسی داده های حاصله از تحقیقات فوق نشان می دهد که در مراحل مختلف فرایند تخلیص، OMV نه تنها شکل فضایی و طبیعی خود را کاملاً حفظ نموده است بلکه فاقد ناخالصی بوده و توان القاء سنتز سطح بالایی از آنتی بادی باکتریسیدالی را بر علیه نیسریا مننژیتیدیس سروگروه B دارد. بنابراین ساختمان اپی توپ های آنتی ژنیک مؤثر در القاء این آنتی بادی در مراحل مختلف فرایند خالص سازی OMV بخوبی حفظ شده و سالم مانده اند. بدین دلیل OMV را می توان بعنوان یک کاندیدای بالقوه برای ایجاد ایمنی مفید و مؤثر بر علیه عفونت های مننگوکوکی سروگروه B مطرح نمود.

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

## مقدمه

مننژیت باکتریایی از دیرباز یکی از معضلات سازمان های بهداشتی- درمانی و مراکز تحقیقاتی بوده و بر اساس پژوهش ها روند رو به افزایشی را در جهان به خود اختصاص داده است. در دهه اخیر شایعترین عامل سبب مننژیت باکتریایی، نیسریا مننژیتیدیس بوده که با عوارض متعدد و میزان مرگ و میر بالا در مبتلایان همراه است (۱). سال ها است که کپسول پلی ساکاریدی این باکتری بطور گسترده برای ایجاد ایمنی مورد استفاده قرار می گیرد. تفاوت های آنتی ژنی در کپسول پلی ساکاریدی، نیسریا مننژیتیدیس را به حداقل ۱۳ سرگروه طبقه بندی می نماید. بیش از ۹۹ درصد از عفونتهای مننگوکوکی توسط سویه های سرگروه های A, B, C, 29E, W135, Y ایجاد می شوند. استفاده وسیع از واکسن مفید دو ظرفیتی پلی ساکارید کپسولی مننگوکوک (A+C) و در برخی مناطق چهار ظرفیتی (A+C+Y+W135) سبب گردیده تا در خلال ۳۰ سال گذشته سرگروه B نیسریا مننژیتیدیس شایع ترین عامل سببی مننژیت اپیدمیک به ویژه در کشورهای توسعه یافته گردد. چنانکه امروزه بیش از ۹۰ درصد از مننژیت مننگوکوکی در آمریکا به علت این سرگروه است. برخلاف کپسول پلی ساکاریدی سرگروه های A و C و Y و W135، کپسول سرگروه B در انسان ایمنوژنیک نبوده و پاسخ های ناخواسته ای را به همراه دارد (۲-۵). تشابه زنجیره کوتاه اسیدسیالیک در سیالوگانگلیوزیدها و اسفنگولیپیدها (اسفنگومیلین ها) عامل ایجاد تورلانس ایمنولوژیکی نسبت به پلی ساکارید کپسولی سرگروه B بوده و در صورت القاء سنتر آنتی بادی، واکنش مقطعی با ساختار فوق را در انسان سبب می گردد (۶، ۷). با توجه به مشکلات بیان شده امروزه تمرکز کارهای تحقیقاتی روی سایر اجزاء دیواره سلولی و ترکیبات باکتریایی از جمله پروتئین های عمده غشاء خارجی معطوف گردیده است (۸-۱۰). پژوهش های سالهای اخیر حاکی از آن است که می توان از مجموعه پروتئین های غشاء خارجی (OMPC) یا به تعبیر دقیق تر وزیکول غشاء خارجی سرگروه B مننگوکوک به عنوان یک واکسن پروتئینی مفید و مؤثر برای پیشگیری از عفونت های ناشی از این سرگروه استفاده نمود (۱۰ و ۱۱).

از آنجاییکه برای ایجاد عفونت مننگوکوکی مدل حیوانی در دسترس نیست، بررسی فعالیت باکتریسیدالی آنتی بادیهای تولید شده بر علیه مننگوکوک مهمترین و دقیق ترین 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 گلدشایدنر، گوتچلی و آرتن استین بر می گردد. اما نقش آنتی بادی 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 به عنوان آزمایش استاندارد طلایی در بررسی واکسنهای تولیدی بر علیه سرگروه های مختلف نیسریا مننژیتیدیس ارائه و اعلام نمود. از آن پس تاکنون SBA با تغییرات اندک در روش انجام تست و بهینه سازی نحوه اجراء هنوز به عنوان اصلی ترین آزمون در ارزیابی اثرات حفاظتی واکسنهای مننگوکوکی مطرح است (۱۵-۱۲).

این آزمون به بررسی خاصیت کشندگی آنتی بادیهای ایجاد شده با واسطه فاکتورهای کمپلمان در شرایط خارج بدن می پردازد. آنتی بادیهای باکتریسیدالی با فعال کردن مسیر آبشاری کمپلمان، کمپلکس تهاجم غشایی ایجاد نموده و در نهایت باعث لیز باکتری می شوند. طبق گزارشات

پژوهشگران، استاندارد طلایی در ارزیابی ایمنولوژیکی واکسن های تولیدی بر علیه بیماریهای ناشی از نیسریا مننژیتیدیس آزمون SBA است (۱۷ و ۱۸). بنابر این با توجه به اینکه مهمترین استراتژی در طراحی و ساخت واکسن های مننگوکوکی، القاء سنتر 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 بالقوه واکسن در مدل حیوانی استفاده نموده ایم.

## روش کار

جهت استخراج وزیکول غشاء خارجی (OMV)، از سویه استاندارد G245 CSBPI نیسریا مننژیتیدیس سرگروه 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 توده سلولی، استخراج OMV توسط روش دزاکسی کولات- اولتراسانتیفرز 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 میلی بار پس از ۲۰ ساعت، لیوفیلیزه گردید (۲۲-۱۹).

درجه خلوص و پایداری شکل طبیعی و فضایی OMV (در مراحل مختلف فرآیند خالص سازی) 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 (۱۹ و ۲۱). میزان پروتئین OMV طبق روش پیترسن (۱۹۷۹) اندازه گیری شد (۲۱ و ۲۲).

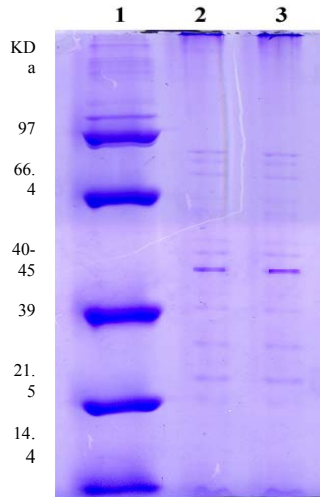
بی زبانی مصرف OMV در حیوان آزمایشگاهی با انجام دو آزمون پیروژنی در خرگوش و ایجاد سمیت غیر نرمال در موش سوری و خوکچه هندی تایید گردید (۲۴).

به یک گروه پنج تایی از خرگوش سفید نیوزلندی با وزن ۱/۵ الی ۲ کیلوگرم ۱۱ ۵۰۰ از OMV تخلیص شده از نیسریا مننژیتیدیس سرگروه B سویه CSBPI.G245 را همراه ادجوانت کامل فروند به صورت داخل عضلانی در روزهای صفر، ۲۸، ۵۸ و ۱۴۸ تزریق گردید. سپس در زمانهای ۱۴۰، ۲۸۰، ۴۲۰ و ۵۶۰ روز پس از اولین تزریق خون هر یک از خرگوش ها از طریق قلب جمع آوری شده و سرم ها بعد از جداسازی در ۲۰ °C نگهداری شدند (۲۵).

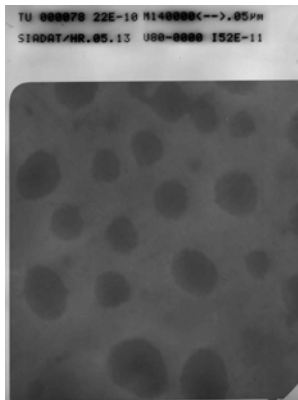
واکنش رسوبی آنتی سرم هیپرایمونیوم OMV خالص و آنتی سرم جسم سلولی سرگروه B طبق روش ژل ایمنودیفیوژن اجترلونی در آگاروز مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۵ و ۲۶) و از سویه استاندارد نیسریا مننژیتیدیس سرگروه B (CSBPI, G-245) سوسپانسیونی تازه در محیط مولر هینتون برات (MHB) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول با رقت CFU/ml ۱۰۵ تهیه شد (۱۳).

برای غیرفعال شدن اثرات کمپلمان، سرم حیوان هیپرایمونیوم در ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت نیم ساعت در حمام آب گرم حرارت داده شد (۱۳ و ۲۷) و برای منبع کمپلمان خارجی در آزمایش از سرم خون نوزاد خرگوش ۳ هفته ای استفاده شد (۲۸). در این آزمون از میکروپلیت های پلی استریل ۹۶ خانه ای با انتهای U شکل استفاده گردید.

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: الگوی SDS-PAGE الکتروفورز از OMV نیسریا مننژیتیدیس سرو گروه B سروتیپ CSBPI, G-245 در ژل ۱۰٪  
- ستون ۱: مارکرهاي استاندارد باوزن ملکولي پایین  
- سته ۱، ۲ و ۳: به ترتیب ۲، ۴ و ۱ میکده گاه



شکل ۲: میکروگراف الکترونی وزیکول‌های تهیه شده از



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

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 ۳۶±۱°C و فشار اتمسفری ۵ درصد CO<sub>2</sub> انکوبه شدند (T0). میکروپلیت حاوی ۴۰ میکرولیتر از مخلوط باقی مانده (باکتری، کمپلمان و سرم) به مدت یک ساعت در ۳۶±۱°C با فشار اتمسفری ۵ درصد CO<sub>2</sub> 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 کاهش یافته برابر یا بیشتر از ۵۰ درصدی را نشان دهد بود. کلیه سرم‌ها با سویه استاندارد CSBPI, G-245 سروگروه B نیسریا مننژیتیدیس به همراه کنترل، با تکرار سه بار مورد آزمون قرار گرفته و نتایج بررسی و ثبت شدند (۱۳ و ۱۴ و ۲۷ و ۲۹ و ۳۰).

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 Least LCD (Significant Difference) انجام گردید. در نهایت رسم نمودارها به‌وسیله نرم‌افزار Microsoft Word 11.0 صورت گرفت (۲۹).

### یافته‌ها

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 به‌دست حاصل گردید.

لگوی حرکتی OMV در SDS-PAGE الکتروفورز ۱۰ درصد با مقایسه با مارکرهاي 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 شماره ۲ ملاحظه

## بحث

در تحقیق حاضر با بهره‌گیری از تجارب سایر محققان فن و بهینه‌سازی سنتتیک رشد در کشت غوطه‌ور، امکان تولید OMV خالص زیرگونه استاندارد نیسیرامنتزیتیدیس سروگروه (CSBPI: G-245) B در ایران مورد ارزیابی قرار گرفت. چنانکه از کشت ۴۰ لیتر محیط فرانتز اصلاح شده در شرایط کنترل شده ایتیمم در فرمانتور ۷۵۰ میلی‌گرم OMV خالص به‌دست آمد که نسبت به روش کلاسن و همکاران ۱۰ درصد افزایش تولید را نشان می‌دهد (۲۰۱۹ و ۲۰۲۰). 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 (۲۰۱۹ و ۲۰۲۰). چنانچه در شکل شماره ۱ مشاهده شد الگوی حرکت الکتروفوریتیک OMV در SDS-PAGE (ژل ۱۰٪) در جایگاه ۴۵-۴۰ کیلو دالتون به‌صورت یک باند ضخیم قرار گرفته که این نتیجه با یافته‌های سایر محققان از جمله پیتیر و همکاران (۱۹۹۹) و کلاسن و همکاران (۱۹۹۶) به‌طور کامل مطابقت دارد (۲۰۱۹ و ۲۰۲۰).

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 (۱۹۹۷). معینا 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 خوکیه 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 خوکیه 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 شماره ۳ و ۲ و چاهک شماره ۱ (مرکزی) باند رسوبی پررنگی مشاهده می‌گردد.

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 خوکیه 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 خوکیه 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 شماره ۲ محتوی آنتی‌سرم 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 نیسیرامنتزیتیدیس سروگروه B (چاهک شماره ۳) و OMV (چاهک شماره ۱) نه تنها هویت اختصاصی OMV در شناسایی ایمنوگلوبولین‌هایی 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 نیسیرا منتزیتیدیس 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 ( $P \leq 0.001$ ). برای ارزیابی اختلاف گروه‌ها با یکدیگر، از آزمون Tukey استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار وزیکول‌های عشای خارجی مننگوکوک سروگروه B بر زمان‌های مختلف تیمار.

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

کلاس بیان می‌کند که بالا بودن عیار آنتی‌بادی باکتریسیدال القاشده با OMV بر علیه نیسریا مننژیتیدیس سروگروه B، علاوه بر اینکه نشان‌دهنده اثرات ایمنوژنیسیته مفید و مؤثر OMV بر علیه عفونتهای مننگوکوکی 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 مننژیتیدیس سروگروه B، با نتایج کلاس سازگاری دارد (۳۶ و ۳۱ و ۳۰ و ۳۱ و ۳۲ و ۳۶). 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 ایمونوژن مفید و مؤثر علیه عفونت ناشی از نیسریامننژیتیدیس سروگروه B به‌کار گرفت. در مجموع نتایج این آزمون با سویه استاندارد G-245 CSBPI، نیسریا مننژیتیدیس سروگروه B، حاکی از معنادار بودن میانگین عیار آنتی‌بادی باکتریسیدال در حیوانات ایمن‌شده در مقایسه با گروه کنترل است.

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 زیرکلاس‌های 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 عفونت‌های مننگوکوکی 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 ارزش‌ترین آزمون در ارزیابی ایمنولوژیکی عفونتهای مننگوکوکی، آزمون SBA است، در این تحقیق آزمون SBA بر اساس استانداردهای پروتکل سازمان بهداشت جهانی انجام گرفت (۱۵ و ۲۰ و ۲۷ و ۳۴ و ۳۵ و ۳۶). در نتایج آزمون SBA با نیسریا مننژیتیدیس 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 آنتی‌بادی باکتریسیدال در این گروه در تمام دوره‌های زمانی تفاوت با ارزشی داشته و اختلاف معناداری دارد (P=008).

## 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 meningitidis. Vaccine, 2001; 19: 1327-1346.
5. Bjune G., Hoiby E.A., Gronnesby J.K., et al. 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.

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., Frascch 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 meningitidis* 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 the XXIX 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 8<sup>th</sup> Iranian Congress of Biochemistry & 1<sup>th</sup> International of Molecular Biology. 2005. Sep 11: Tehran, Iran.
23. Peterson G.L. (1977). A simplification 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.

25. Ouchterlony 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 Bienen 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. et al. 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.