مجله دانش و تندرستی، دوره ۱۱، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.22100/jkh.v11i4.1434

مقاله پژوهشی

ارزیابی دو روش کونژوگاسیون کپسول پلی‌ساکاریدی هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b با وزیکول غشاء خارجی نیسریا منتژیتیدیس سر و گروه B

پریچهر حناچی*[۱]، راحله احسانی[۲]، سید داور سیادت[۳]، شهره خاتمی[۴]

۱- دانشگاه الزهرا- دانشکده علوم زیستی- گروه بیوتکنولوژی- دانشیار.
۲- دانشگاه الزهرا- دانشکده علوم زیستی- گروه بیوتکنولوژی- کارشناسی ارشد.
۳- انستیتو پاستور ایران- گروه میکروبیولوژی- دانشیار.
۴- انستیتو پاستور ایران- گروه بیوشیمی- دانشیار.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۴، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۵/۸/۳

چکیده

مقدمه: *هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b (Hib) یکی از علل اصلی منتژیت در نوزادان و کودکان در کشورهای در حال توسعه است و هر ساله حداقل ۳ میلیون مورد بیماری ناشی از Hib در سراسر جهان ایجاد می‌شود. کپسول Hib، عامل اصلی بیماری‌زایی می‌باشد. کپسول پلی‌ساکارید کونژوگه شده به پروتئین حامل در پیشگیری از عفونت‌ها مؤثر است. واکسیناسیون علیه Hib تاکنون در برنامه واکسیناسیون معمول کشور قرار نگرفته است. هدف از این مطالعه، دستیابی به یک روش کارآمد جهت تولید واکسن کونژوگه علیه منتژیت ناشی از هموفیلوس آنفلوانزا است.*

مواد و روش‌ها: *در این تحقیق، مشتق پلی‌ساکارید Hib (PRP) در حضور ۱-اتیل-۳-(۳-دی متیل آمینو پروپیل) کربودی‌ایمید (EDAC) با وزیکول غشاء خارجی (OMV) نیسریا منتژیتیدیس گروه B کونژوگه شد. دو روش با واسطه آدیپیک اسید دی‌هیدرازید (ADH) به‌عنوان فاصله‌گذار به‌کار برده شد. پلی‌ساکارید به‌صورت جداگانه با سیانوژن بروماید (CNBr) و EDAC فعال شد. در روش اول، ADH به PRP فعال شده با CNBr متصل و مشتق PRPCNBr AH تشکیل شد. در روش دوم، ADH به PRP فعال شده توسط EDAC متصل و PRPEDAC AH تشکیل شد. دو مشتق ایجاد شده توسط EDAC به OMV کونژوگه شدند و PRPCNBr AH-OMV، PRPEDAC AH-OMV تشکیل شدند.*

نتایج: *این تحقیق نشان داد که بازده کونژوگه PRPCNBr AH-OMV بر حسب پروتئین متصل شده به پلی‌ساکارید ۶۳/۳٪ و برای PRPEDAC AH-OMV ۴۷٪.*

نتیجه‌گیری: *متوسط بازده کونژوگاسیون توسط سیانوژن بروماید فعال‌کننده بیشتر از فعال‌کننده دیگری است. با این حال به مطالعه بیشتر در مورد روش‌های دیگر و مقایسه آنها با یکدیگر برای دستیابی به یک واکسن کونژوگه مؤثر، نیاز است.*

واژه‌های کلیدی: کونژوگه، هموفیلوس آنفلوانزا، پلی‌ساکارید، واکسن.

***نویسنده مسئول:** تهران- دانشگاه الزهرا- دانشکده علوم زیستی- دپارتمان بیوتکنولوژی- بخش بیوشیمی، **تلفن:** ۸۸۰۴۴۰۴۰-۰۲۱، **نمابر:** ۸۸۰۵۸۹۱۲-۰۲۱، **Email:** Hanachi_wrc@yahoo.com

ارجاع: حناچی پریچهر، احسانی راحله، سیادت سید داور، خاتمی شهره. ارزیابی دو روش کونژوگاسیون کپسول پلی‌ساکاریدی هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b با وزیکول غشاء خارجی نیسریا منتژیتیدیس سر و گروه B. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۵؛۱۱(۴):۱-۸.

مقدمه

هموفیلوس آنفلوانزا از خانواده پاستورلاسه، کوکوباسیل گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری است و پاتوژن انسان می‌باشد (۱ و ۲) که براساس حضور کپسول پلی‌ساکاریدی به دو فرم کپسول‌دار و بدون کپسول تقسیم می‌شود. سویه‌های کپسول‌دار آن براساس خاصیت آنتی‌ژنی کپسول به ۶ گروه a تا f تقسیم می‌شوند. از بین ۶ تیپ کپسول‌دار، تیپ b هموفیلوس آنفلوانزا مهمترین پاتوژن این گروه است به‌طوری‌که در ۹۰ درصد موارد ابتلا، اصلی‌ترین عامل مننژیت باکتریایی در کودکان زیر ۲ سال می‌باشد (۵-۳).

کپسول، عامل بیماری‌زایی اصلی و اساسی در باکتری می‌باشد، هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b توسط کپسول پلی‌ساکاریدی از جنس قند پنج کربنه (پنتوز) که پلیمری از واحدهای تکراری پلی ریبوزیل ریبیتول فسفات (PRP) می‌باشد، از فاگوسیتوز توسط ماکروفاژها محافظت می‌گردد. PRP که نقش اصلی در بیماریزایی این باکتری دارد باعث مقاومت باکتری در برابر بیگانه‌خواری و مهار فعالیت‌های باکتریسیدال می‌شود و در برابر عملکرد سیستم کمپلمان مقاومت می‌کند (۶ و ۷).

مهمترین بیماری عفونی ناشی از هموفیلوس آنفلوانزا، مننژیت است که در آن التهاب مننژ رخ می‌دهد (۸). مننژیت باکتریال یکی از مهمترین علل مرگ و میر کودکان محسوب می‌گردد. سالیانه حدود ۹۵٪ موارد مرگ و میر کودکان به علت مننژیت در کشورهای در حال توسعه به وقوع می‌پیوندد (۹). آمارهای سازمان بهداشت جهانی نشان می‌دهد که در منطقه مدیترانه شرقی (که کشور ما در این محدوده قرار دارد) هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b شایع‌ترین عامل مننژیت باکتریایی است (۱۰).

هموفیلوس آنفلوانزا سروتیپ b تا پیش از معرفی واکسن علیه آن، به‌عنوان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر نوزادان در سراسر جهان به‌شمار می‌رفت. طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت، هرساله باکتری Hib باعث حداقل ۳ میلیون بیماری و بین ۴۰۰۰۰۰ و ۷۰۰۰۰۰ مرگ در نوزادان جهان می‌شد (۱۱).

واکسن‌های پلی‌ساکاریدی در نوزادان زیر ۲ سال (گروه سنی مستعد به بیماری‌های ناشی از Hib) کارآیی ندارد چون همانند سایر پلی‌ساکاریدها، PRP کپسول Hib یک آنتی‌ژن غیروابسته به لنفوسیت T است که موجب، پاسخ ایمنی ضعیفی در نوزادان می‌شود و تیتر کمی از آنتی‌بادی را القاء می‌کند و درصد زیادی از آنتی‌بادی ایجاد شده از نوع IgM می‌باشد همچنین پاسخ خاطره‌ای (Memory response) القاء نمی‌گردد (۱۲ و ۱۳).

برای غلبه برایمونوژنیسیتهٔ محدود واکسن‌های پلی‌ساکاریدی، نسل جدیدی از واکسن‌ها، براساس کونژوگاسیون (پیوند کووالان) پلی‌ساکارید به پروتئین حامل، در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. در مقایسه با ایمونوژنیسیتهٔ ضعیف و محدود پلی‌ساکاریدها، کونژوگه‌های پروتئین- پلی‌ساکارید، تیترهای بالای آنتی‌بادی‌های اختصاصی پلی‌ساکارید را القاء کردند، همچنین پاسخ آنتی‌بادی القاءشده پس از دزهای یادآور، افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت (۶).

در واقع، با کونژوگه کردن کپسول پلی‌ساکاریدی باکتری به پروتئین حامل، خاصیت آنتی ژنی از حالت غیر وابسته به T به فرم وابسته به T تبدیل می‌شود در نتیجه این واکسن‌های کونژوگه، قادر بودند تیتر بالایی از آنتی‌بادی‌های اختصاصی پلی‌ساکارید را در نوزادان القاء کنند و آنها را از عفونت ناشی از هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b محافظت نمایند (۶ و ۱۴).

ریسک بالای ابتلا به مننژیت باکتریایی ناشی از هموفیلوس آنفلوانزا در نوزادان و کودکان زیر ۲ سال می‌باشد. بنابراین هموفیلوس آنفلوانزا b همچنان به‌عنوان علت عفونت‌های تهاجمی شایع خصوصاً در سنین اولیه عمر مطرح می‌باشد.

ریسک بالای ابتلا به مننژیت باکتریایی ناشی از هموفیلوس آنفلوانزا در نوزادان و کودکان زیر ۲ سال می‌باشد و در ایران برای پیشگیری از ابتلا به این بیماری در برنامه واکسیناسیون به شکل واکسن پنتاوالان در برنامه کشوری گنجانده شده است.

باتوجه به اینکه چندین روش برای کونژوگه کردن و اتصال پلی‌ساکارید به پروتئین حامل وجود دارد و از سویی دیگر، واکسن‌های کونژوگه از قیمت بالایی برخودار هستند و مراحل تولید آنها متعدد بوده و هزینه بالایی دارد؛ عملیات کونژوگاسیون و مواد به‌کار رفته در این فرآیند هزینه‌بر می‌باشند؛ در نتیجه اصلاح و بهینه‌سازی هر یک از مراحل تولید واکسن کونژوگه و عملیات کونژوگاسیون می‌تواند منجر به کاهش قیمت واکسن گردد (۶).

لذا در این مطالعه، کونژوگاسیون کپسول PRP به پروتئین وزیکول غشاء خارجی (OMV) مننژیتیدیس سروگروه B به دو روش مختلف صورت گرفت و کونژوگه‌های به‌دست آمده از دو روش مورد قیاس با یکدیگر قرار گرفتند تا شاید بتوان به یک روش کارآمد و مقرون به صرفه و توسعه یک روش کلی در راستای تولید واکسن کونژوگه علیه مننژیت هموفیلوسی دست یافت.

مواد و روش‌ها

وزیکول غشاء خارجی (OMV) نیسریا مننژیتیدیس با روش سیادت و همکاران تهیه گردید (۱۵). به اختصار، نیسریا مننژیتیدیس زیرگروه B سویه استاندارد CSBPI,G-245 که در محیط فرانتز اصلاح شده، در فرمانتور به مدت ۲۴ ساعت در ۳۶°C کشت داده شده بود، از انستیتوپاستور ایران تهیه شد. وزیکول غشاء خارجی در بافر تریس ۰/۱ مولار حاوی EDTA (اتیلن دی آمین ترا کلرو استیک اسید) و دزاکسی کولات استخراج گردید و توسط سانتریفیوژ (RST 16 S)

۶۵۰۰۰RPM دقیقه تخلیص گردید. OMV تغلیظ شده در سوکروز ۳٪ حل و پس از عبور از فیلتر میلی‌پور ۰/۲۲ میکرون، لیوفیلیزه (شرکت نانو اداک) گردید.

کپسولی پلی‌ساکاریدی Hib (PRP) به‌صورت تخلیص شده از بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی‌ژن مجتمع تولیدی-تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

یک میلی‌گرم PRP در ۱ میلی‌لیتر فسفات بافر سالین (PBS)، (pH=۷/۴) حل و سپس با سیانوژن بروماید (CNBr) با غلظت نهایی ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌گرم PRP (۰/۴ mg/mg PRP) برای مدت ۶ دقیقه در pH=۱۰/۵-۱۱ واکنش داده شد. سپس ADH با غلظت نهایی ۰/۵ مولار همراه با بی‌کربنات سدیم ۰/۵ مولار به ظرف واکنش اضافه شد و pH محلول واکنش در ۸/۵ تنظیم شد. مخلوط واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C با همزن مغناطیسی همزده شد. سپس مخلوط واکنش در برابر سدیم کلرید ۰/۲ مولار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C با دو بار تعویض بافر دیالیز شد.

یک و نیم میلی‌گرم PRP در یک میلی‌لیتر فسفات بافر سالین (PBS) (pH=۷/۴) حل شد. سپس EDAC با غلظت نهایی ۰/۱ مولار و Sulfo-NHS ۰/۱ مولار و کلسیم کلراید (جهت افزایش قدرت فعالسازی و بازدهی EDAC) به محلول پلی‌ساکاریدی اضافه گردید و نیز ADH با غلظت نهایی ۰/۵ مولار به آن افزوده و به شدت تکان داده و pH محلول را با استفاده از HCl ۰/۱ نرمال بر روی ۵/۸ تنظیم کرده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C با همزن مغناطیسی همزده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن، محلول واکنش در برابر سدیم کلرید ۰/۲مولار به مدت ۲۴ ساعت با یک بار تعویض بافر در دمای ۴°C دیالیز گردید. در نهایت مشتق هیدرازیدی یعنی AH-PRP (PRP فعال شده) برای اتصال کووالان با پروتئین OMV به‌دست آمد.

Mg/ml ۱ پروتئین OMV در حضور EDAC ۰/۱ مولار و Sulfo-NHS ۰/۱ مولار با PRP فعال (مشتق هیدرازیدی، AH-PRP) ترکیب و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C انکوبه شد.

کونژوگه به‌دست آمده با استفاده از کروماتوگرافی سفارز CL-4B از غیر کونژوگه جداسازی گردید.

میزان محتوای پروتئینی ماکرومولکول کونژوگه به‌دست آمده با استفاده از روش برادفورد (۱۶) محاسبه شد.

مقدار PRP کونژوگه تهیه شده از طریق روش بیال اصلاح شده (۱۷) و با استفاده از ریبوز به‌عنوان شاخص استاندارد اندازه‌گیری شد. باتوجه به اینکه در هر ۲/۵۵ میلی‌گرم PRP حدود ۱ میلی‌گرم ریبوز وجود دارد، لذا با ضرب غلظت ریبوز محلول در ضریب ثابت ۲/۵۵، میزان PRP تعیین گردید.

جهت تأیید بر انجام کونژوگاسیون و تشکیل کونژوگه PRP-OMV از روش‌های زیر استفاده شد:

کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، از مخلوط حلال کلروفورم/متانول و معرف مخصوص کربوهیدرات (اتانول ۸۶ درصد و اسیدسولفوریک غلیظ) به‌ترتیب جهت بررسی حضور پروتئین و پلی‌ساکارید در ماکرومولکول کونژوگه استفاده گردید.

طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)، نمونه‌ها با KBr مخلوط و به‌صورت یک قرص نازک و شفاف درآورده شد. طیف مادون قرمز آنها توسط دستگاه تبدیل فوریه مدل TENSOR 27 Burker تهیه شد.

طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته (H-NMR) کونژوگه‌های تهیه شده و نیز اندازه‌گیری سایز و بار آنها انجام گرفت.

نتایج

در این مطالعه جداسازی ماکرومولکول کونژوگه از غیر کونژوگه توسط کروماتوگرافی سفارزCL-4B انجام شد. باتوجه به اینکه در کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون مولکول‌های بزرگتر، زودتر از ستون خارج می‌شوند؛ کونژوگه گلیکوپروتئینی به‌دلیل وزن مولکولی بیشتر از هریک از اجزا آن سریع‌تر از ستون خارج می‌شود و پیک اول و بلندتر نمودار شدت جذب را به خود اختصاص می‌دهد (شکل ۱).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان پروتئین در ماکرومولکول کونژوگه طبق روش برادفورد حاکی از آن است که بازده کونژوگاسیون برحسب درصد وزنی برای پروتئین، OMV در کونژوگه PRPCNBr AH-O MV ۳/۶۳٪ و برای ۴۷٪ PRPEDAC AH-OMV می‌باشد.

براساس نتایج حاصل از بیال اصلاح شده، متوسط بازده کونژوگاسیون برحسب درصد وزنی برای پلی‌ساکارید هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b، در کونژوگه ۳۴٪ PRPCNBr AH-OMV و در کونژوگه ۴/۱۹٪ PRPEDAC AH-OMV محاسبه گردید.

نتایج به‌دست آمده از TLC نشان می‌دهد؛ به‌دلیل اینکه لکه ناشی از وجود پروتئین و لکه ناشی از پلی‌ساکارید در یک نقطه از کاغذ ایجاد شده لذا می‌توان ادعا کرد که که هر دو نمونه حاوی پروتئین و پلی‌ساکارید بوده‌اند و اتصال کووالان بین آنها ایجاد شده است (شکل ۲).

همان‌طورکه در طیف مادون قرمز مولکول‌های کونژوگه مشهود است (شکل ۳)، نوارهای جذبی گروه‌های اتری و OH و CH و P=O مربوطبه پلی‌ساکارید و گروه‌های OH و NH پروتئین و نیز باند آمیدی در ناحیه‌های مربوطه ظاهر گردیده‌اند. در باند آمیدی پیک cm-1 ۴۵/۱۵۶۲ مربوطبه NH پیوند و پیک cm-1 1654 مربوطبه C=O پیوند آمیدی می‌باشد. پیک cm-1 ۶۸/۱۷۴۱ مربوطبه C=O گروه کربوکسیلیک اسید پروتئین می‌باشد.

این نتایج نشان می‌دهد که طیف IR کونژوگه‌ها، نوارهای جذبی دو جزء کونژوگه، پلی‌ساکارید و پروتئین، را به‌طور همزمان در بردارد. این تأییدی بر کونژوگه شدن پلی‌ساکارید به پروتئین می‌باشد.

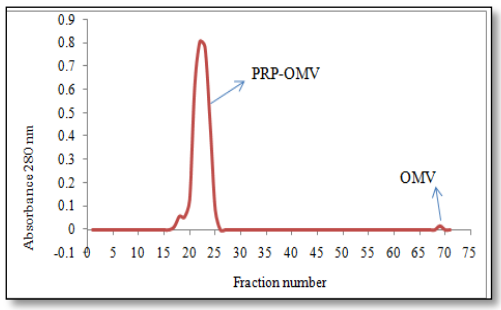
همچنین طیف FTIR دو کونژوگه تهیه شده دارای الگوی مشابه هم می‌باشند که بیانگر این است، دو کونژوگه تهیه شده مشابهند و در واقع یک نوع می‌باشند.

نتایج حاصل از طیف‌های H-NMR مولکول‌های کونژوگه شده نشان می‌دهد (شکل ۴)، ماکرومولکول‌های کونژوگه تهیه شده طیف رزونانس مغناطیسی پروتئین و پلی‌ساکارید را به‌طور همزمان دارند که کونژوگه شدن پروتئین و پلی‌ساکارید را تأیید می‌نماید. همچنین الگوی طیف رزونانس مغناطیسی دو مولکول کونژوگه مشابه هستند که نشان‌دهنده مشابه و یک نوع بودن کونژوگه‌ها می‌باشد.

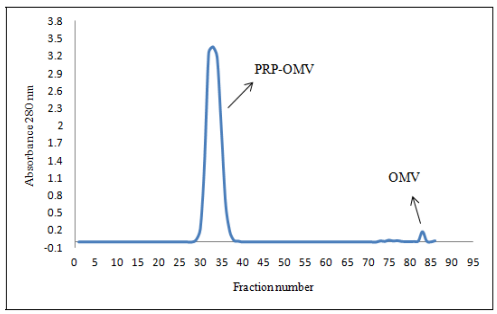
شدت پیک در طیف NMR کونژوگه PRPCNBr AH-OMV بیشتر از کونژوگه PRPEDAC AH-OMV می‌باشد که بیانگر بالا بودن راندمان کونژوگه PRPCNBr AH-OMV می‌باشد.

براساس نتایج به‌دست آمده از زتا سایزر، در هر دو مولکول کونژوگه افزایش سایز نسبت‌به اجزاء آن، وزیکول و پلی‌ساکارید، مشاهده می‌شود که دلیل بر کونژوگه شدن این دو جزء به یکدیگر می‌باشد.

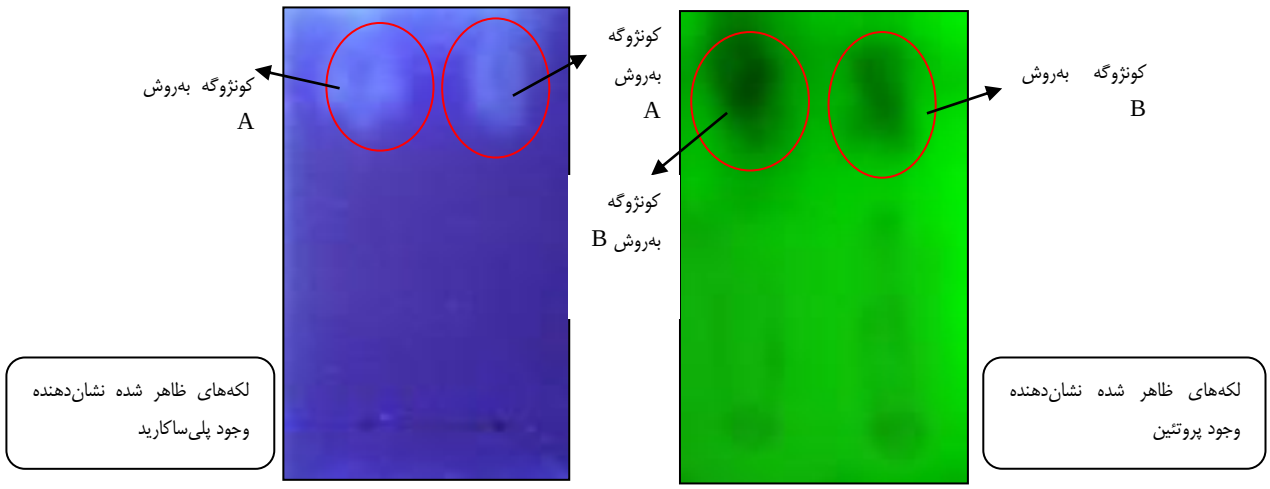
اندازه بار در کونژوگه PRPCNBr AH-OMV (روش A) بیشتر از کونژوگه PRPEDAC AH-OMV می‌باشد که این نتیجه نیز نشان‌دهنده راندمان بالای کونژوگه PRPCNBr AH-OMV نسبت‌به کونژوگه دیگری می‌باشد (جدول ۱).



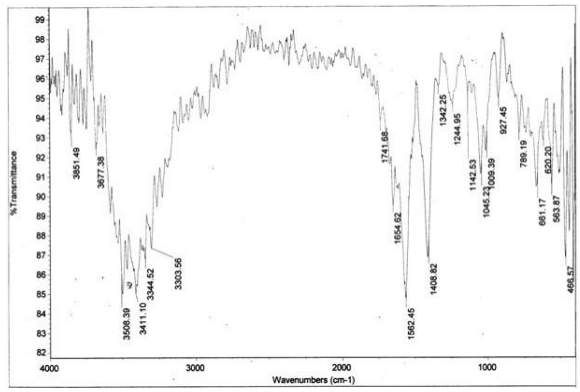
شکل ۱ الف- فرکشن‌های حاصل از ستون سفارز Cl-4B برای کونژوگه تهیه شده به‌روش A



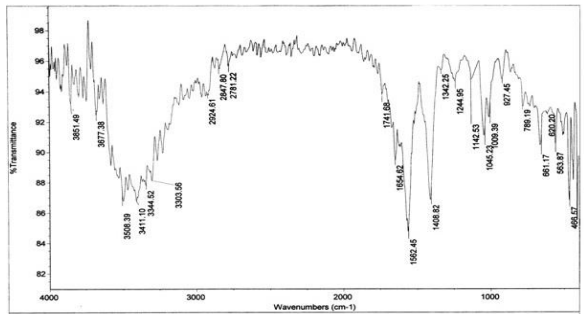
شکل ۱ب- فرکشن‌های حاصل از ستون سفارز Cl-4B برای کونژوگه تهیه شده به‌روش B



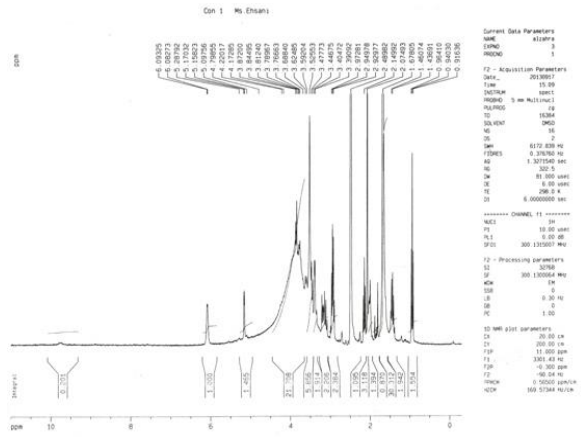
شکل ۲- لکه‌های ظاهر شده در TLC



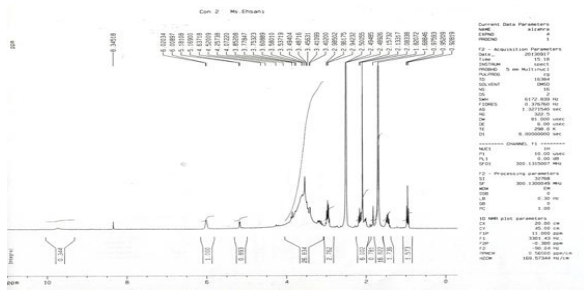
شکل ۳ الف- طیف FTIR، کونژوگه تهیه شده به‌روش A



شکل ۳ ب- طیف FTIR، کونژوگه تهیه شده به‌روش B



شکل ٤ الف- طیف H-NMR، PRPCNBr AH-OMV



شکل ٤ ب-طیف H-NMR، PRPEDAC AH-OMV

جدول ۱- اندازه و بار مولکول‌ها

مولکول	بار	اندازه (nm)
OMV	-۱۲/۶	۲۳۶/۶
PRP	-۴/۸۱	۸۴۶/۲
PRP-OMV (روش A)	-۴/۸۶	۹۸۴/۱
PRP-OMV (روش B)	-۲/۲۲	۹۶۵/۳

بحث

بیماری‌های ناشی از باکتری Hib به‌ویژه مننژیت از مشکلات مهم بهداشتی در نوزادن و کودکان در کشورهای در حال توسعه و کمتر توسعه یافته محسوب می‌شود. مننژیت باکتریال همچنان به‌عنوان یک علت مهم مرگ و میر در کودکان محسوب می‌گردد (۹ و ۱۸)

واکسن‌های پلی‌ساکاریدی پاسخ ایمنی غیروابسته به تیموس را ایجاد می‌کنند که موجب ایمنی ضعیف در نوزادان می‌شود. در واقع کپسول پلی‌ساکاریدی آنتی‌ژن غیروابسته به تیموس است که برای ایجاد پاسخ ایمنی نیازی به حضور لنفوسیت T ندارد بنابراین آنتی‌بادی القایی تمایل کمتری برای اتصال به آنتی‌ژن دارد. لذا توانایی ایجاد مصونیت در مقابل مننژیت هموفیلوسی نوزادان را نداشتند (۱۳).

استراتژی که به‌منظور برطرف کردن این معایب و افزایش ایمنی‌زایی آنتی‌ژن‌های غیر وابسته‌به T کاربرد دارد و نسل جدید واکسن یعنی واکسن کونژوگه را پدید آورد، تغییر در خاصیت آنتی‌ژنی واکسن‌های پلی‌ساکاریدی از طریق کونژوگاسیون پلی‌ساکارید با یک پروتئین حامل است. به این ترتیب آنتی‌ژن پلی‌ساکاریدی از ویژگی مستقل از تیموس به خاصیت وابسته‌به تیموس تبدیل می‌شود. در این تغییر خاصیت آنتی‌ژنی و ایجاد پاسخ ایمنی وابسته‌به T، تیتر بالایی از آنتی‌بادی تولید و نیز پاسخ خاطره‌ای ایجاد می‌شود و باعث افزایش ایمنی به‌ویژه در نوزادان می‌گردد (۱۹).

در این تحقیق، PRP به دو روش مختلف فعال‌سازی شد و سپس در حضور EDAC به OMV نایسریا مننژیتیدیس سرگروه B کونژوگه شد. در روش فعال‌سازی با سیانوژن بروماید، پس از انجام واکنش و تشکیل مشتق PRP-AH، سیانوژن بروماید به‌طور کامل حذف گردید چرا که این فعال‌کننده در هیدرولیز پروتئین نقش دارد و در صورت عدم حذف آن، ساختمان OMV تخریب و کونژوگاسیون به‌طور صحیح صورت نمی‌گیرد. سیانوژن بروماید یک گروه الکتروفیلی روی PRP ایجاد و باعث فعال‌شدن آن می‌شود.

همچنین از ADH به‌عنوان فاصله‌گذار ۶ کربنه جهت تسهیل اتصال بین پلی‌ساکارید و پروتئین استفاده شد و بازده کونژوگاسیون را بالا برده شد. در واقع ADH باعث تعامل (Interaction) بیشتر اجزاء ماکرومولکول کونژوگه با سلول‌های لنفوسیت می‌شود و در نتیجه

ایمنی‌زایی بیشتری نسبت‌به کونژوگه‌های تهیه شده با فاصله‌گذار ۲ کربنه و بدون فاصله‌گذار دارد.

کپسول پلی‌ساکاریدی پس از فعال‌سازی با ADH واکنش می‌دهد و سپس مشتق پلی‌ساکارید AH- به پروتئین متصل می‌شود چرا که با اتصال ADH به برخی پروتئین‌ها و تولید مشتق پروتئین AH مانند توکسوئید کزاز (TT) باعث می‌شود که حلالیت آنها درpH اسیدی بسیار کاهش یابد در حالی‌که pH بهینه برای واکنش کربودی ایمیدی، pH اسیدی و در حدود ۴-۶ است. همچنین پاسخ ایمنی القاء شده به پروتئین native در این روش کونژوگه کم می‌باشد (۲۰).

در این پژوهش، EDAC به‌عنوان فعال‌کننده پلی‌ساکارید و هم چنین عامل جفت‌کننده در کونژوگاسیون استفاده شد و جهت افزایش قدرت فعال‌سازی و بازدهی EDAC از N- سولفوهیدروکسی سوکسینامید (Sulfo-NHS) که موجب جلوگیری از هیدرولیز EDAC می‌شود و کلسیم کلرید که باعث حذف اثر آب می‌شود، استفاده شد. چرا که در محیط آبی راندمان EDAC کاهش و حتی احتمال دارد واکنش مربوطه انجام نگیرد.

در این مطالعه، متوسط بازده کونژوگاسیون در روشی که توسط سیانوژن بروماید فعال‌سازی PRP صورت گرفته بود بیشتر از روش دیگری بود. باتوجه به احتیاطات سازمان بهداشت جهانی در مصرف سیانوژن بروماید در واکسن‌های انسانی، چنانکه بتوان جایگزین مناسبی برای این فعال‌کننده پلی‌ساکاریدی انتخاب نمود، بر روش فوق ارجحیت دارد.

با این وجود چنین به‌نظر می‌رسد در روشی که از سیانوژن بروماید استفاده نگردید و EDAC به تنهایی هم نقش فعال‌کنندگی گروه هیدروکسیل پلی‌ساکارید و هم عامل جفت‌کنندگی پلی‌ساکارید به پروتئین را ایفا نموده است، برای مصارف انسانی ارجحیت دارد.

باتوجه به اینکه پژوهشگران بازده کونژوگاسیون را تنها عامل ارجحیت ماکرومولکول کونژوگه ندانسته و بی‌زیانی و بی‌خطری ماکرومولکول کونژوگه را در اولویت قرار داده‌اند (۶). در این تحقیق بازده روش استفاده شده از سیانوژن بروماید به مراتب بیشتر اما از لحاظ بی‌زیانی مصرف جای تأمل دارد. با این وجود کمپانی‌های بزرگ بین‌الملل از این روش برای تولیدات واکسن‌های کونژوگه استفاده می‌نمایند.

استفاده از واکسن‌های باکتریایی و ویروسی در پیشگیری از بیماری‌های عفونی در انسان‌ها و دیگر پستانداران بسیار موفقیت‌آمیز گزارش شده است (۲۱) و در آسیا پرسش‌های مربوطبه مشکلات حاصل از بیماری همو فیلوس انفولانزا تیپ b و تصمیم‌گیری در مورد معرفی این واکسن را به تعویق انداخت و مطالعات بسیاری در زمینه مشکلات این باکتری در آسیا منتشر گردیده است (۲۲).

باتوجه به نتایج کسب شده از پژوهش، می‌توان نتیجه گرفت کونژوگاسیون از طریق فعال‌سازی پلی‌ساکارید با سیانوژن بروماید متوسط بازده بالایی دارد که باتوجه به قیمت بالای واکسن‌های کونژوگه، از لحاظ اقتصادی و تجاری مقرون به‌صرفه می‌باشد ولی از لحاظ ملاحظات بی‌زیانی و ایمنی باید با احتیاط مورد مصرف قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از همکاری دانشگاه الزهرا و بخش‌های میکروبیولوژی، بیوشیمی و واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی‌ژن انستیوپاستور ایران که امکانات انجام این پژوهش را فراهم آوردند سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Evans NM, Smith DD, Wicken AJ. Haemin and nicotinamide adenine dinucleotide requirements of Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae. J Med Microbiol 1974;7:359-65. doi: 10.1099/00222615-7-3-359
2. Hedegaard J, Okkels H, Bruun B, Kilian M, Mortensen KK, Norskov-Lauritsen N. Phylogeny of the genus Haemophilus as determined by comparison of partial infB sequences. Microbiology 2001;147:2599-609. doi: 10.1099/00221287-147-9-2599
3. Singleton R, Hammitt L, Hennessy T, Bulkow L, Debyle C, Parkinson A, et al. The Alaska Haemophilus influenza type b experience: in controlling a vaccine- preventable disease. Pediatrics 2006;118:e421-9. doi: 10.1542/peds.2006-0287
4. Turk DC. The pathogenicity of Haemophilus influenza. J Med Microbiol 1984;18:1-16. doi: 10.1099/00222615-18-1-1
5. Jin Z, Romero-Steiner S, Carlone GM, Robbins J, Schneerson R. Haemophilus influenzae type a infection and its prevention. Infect Immun 2007;75:2650-4. doi: 10.1128/IAI.01774-06
6. Siadat SD, Norouzian D, Tabaraie B, Ahmadi H, Behzadiyannejad Q, Najar Pirayeeh SN, et al. Comparative studies of conjugated capsular polysaccharide of neisseria meningitidis serogroup A with outer membrane vesicle of neisseria meningitidis serogroup B. Research Journal of Microbiology 2007;2:337-45. doi: 10.3923/jm.2007.337.345
7. Dagan R, Poolmanb J, Siegrist C. Glycoconjugate vaccines and immune interference. Vaccine 2010;28:5513-23. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.06.026
8. Mashayekhi F, Rajaei F. The comparison of leukemia inhibitory factor (lif) concentration in the serum and cerebrospinal fluid of children with bacterial meningitis. Medical Laboratory Journal 2012;6:3-7.
9. Fahimzad AR, Mamaishi S, Noorbakhsh S, Siadati A, Hashemi FB,Tabatabaei SR, et al. Study of antibiotics resistance in pediatric acute bacterial meningitis with E-Test method. Iran J Pediatr 2006;16:149-156.[Persian].
10. Sasan MS, Naderi nasab M, Kafi M, Hamedi M, Kharazmi M. Haemophilus influenza meningitis in infants and children. Journal of Mashhad University of Medical Sciences 2009;52:141-6.[Persian].
11. Obonyo CO, Lau J. Efficacy of Haemophilus influenzae type b vaccination of children: a meta-analysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2006;25:90-7. doi: 10.1007/s10096-006-0092-4
12. Klouwenberg PK, Bont L. Neonatal and infantile immune responses to encapsulated bacteria and conjugate vaccines. Clin Dev Immunol 2008;17:1-10. doi: 10.1155/2008/628963

13. Mulholland K, Levine O, Nohynek H, Greenwood BM. Evaluation of vaccines for the prevention of pneumonia in children in developing countries. Epidemiol Rev 1999;21:43-55.

14. Finn A. Bacterial polysaccharide–protein conjugate vaccines. Br Med Bull 2004;70:1-14. doi: 10.1093/bmb/ldh021

15. Siadat SD, Behzadiannejad QH, Tabaraie B, Najar-Peerayeh S, Ahmadi H, Kazemnejad A, et al. Extraction and molecular evaluation of Neisseria meningitidis serogroup B outer membrane vesicle containing PorA. Scientific-Research Journal of Shahed University. Daneshvar Medicine 2006;14:23-32.

16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.

17. Fernell WR, King HK. The simultaneous determination of pentose and hexose in mixtures of sugars. Analyst 1953;78:80-3.

18. Yusefi R, Hashemi A, Shams S. Study of bacterial meningitis in children and determine antibiotic sensitivity results in Hamedan. Lorestan University of Medical Sciences Journal 2003;5:31-9.[Persian].

19. Shakerian-Rostami S; Moradi-Lakeh M; Esteghamat A. Vaccine Efficacy against haemophilus influenzae type b in under-5 children; systematic review and meta-analysis. Journal of Isfahan Medical School 2010;109:437-48.[Persian].

20. Chiayung Ch, Schneerson R, Robbins J, Rastogi S. Further studies on the immunogenicity of haemophilus influenzae type b and pneumococcal type 6A polysaccharide-protein conjugates. Infect Immun 1983;40:245-56.

21. Weiser JN, Merion Pa. Opacity associated proteins, DNA encoding the same, and methods of use there of. Philadelphia: Children's Hospital of Philadelphia;1998;501-50.

22. Shetty S, Cohen AL, Edmond K, Ojo L, Loo J, O'Loughlin R, et al. A systematic review and critical evaluation of invasive Haemophilus influenzae type B disease burden studies in Asia from the last decade: Lessons learned for invasive bacterial disease surveillance. Pediatr Infect Dis J 2010;29:653-61. doi: 10.1097/INF.0b013e3181d3ce19

Journal of Knowledge & Health 2017; Vol 11, No 4
Shahroud University of Medical Sciences

DOI: 10.22100/jkh.v11i4.1434
Original Article

Evaluation of Conjugation of Haemophilus Influenzae Type b Capsular Polysaccharide with Neisseria Meningitides Serogroup B Outer Membrane Vesicle

Parichehr Hanachi (Ph.D.)[1*], Raheleh Ehsani (Ph.D.)[1], Sayed Davar Siadat (M.Sc.)[2], Shohreh Khatami (Ph.D.)[3]

1- Dept. of Biotechnology, School of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran.
2- Dept. of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3- Dept. of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Received: 14 March 2016**, Accepted:** 24 October 2016

Abstract:

Introduction: *The Haemophilus influenzae type b (Hib) infection is a leading cause of meningitis in infants and children in the developing countries, estimated that at least three million serious cases of disease worldwide are caused by Hib each year. The capsular of Hib, is the most important cause of its virulence. The capsular polysaccharide conjugated to a carrier protein is effective in the prevention of such infections. The routine vaccination against Hib has not been defined in the national immunization program of Iran. The aim of this study was to achieve an efficient method for producing vaccines against meningitis caused by haemophilus influenzae.*

Methods: *In this study, a derivative of Hib Polysaccharide (PRP) was conjugated to outer membrane vesicle (OMV) of Niesseria meningitides group B by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC). Two methods, involving adipic acid dihydrazide (ADH) as a linker, were used. The polysaccharide activated with cyanogen bromide (CNBr) and EDAC separately. The first, ADH was bounded to PRP activated with CNBr to form PRPCNBr AH, second ADH was bounded to PRP activated with EDAC to form PRPEDAC AH. These derivatives were bound to OMV by EDAC to form PRPCNBr AH-OMV and PRPEDAC AH-OMV.*

Results: *On the basis of the bounded protein to polysaccharide, the yield of conjugated PRPCNBr AH-OMV and PRPEDAC AH-OMV were calculated 63.3% and 47%, respectively.*

Conclusion: *The results indicated that average yield of conjugation with CNBr activator was higher than other activators, however more study required to other methods and comparing them together to achieve an effective conjugated vaccine.*

Keyword: Conjugate, Haemophilus influenzae, Polysaccharide, Vaccine.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** P. Hanachi**, Email:** Hanachi_wrc@yahoo.com*

Citation: Hanachi P, Ehsani R, Siadat SD, Khatami Sh. Evaluation of conjugation of haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide with neisseria meningitides serogroup b outer membrane vesicle. Journal of Knowledge & Health 2017;11(4):1-8.