

## Evaluation of BALB/c Mice Antibody Responses to Two Variant Forms of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen-1 Recombinant Protein as a Malaria Vaccine Candidate

Maryam Salavatifar<sup>1</sup>, Sedigheh Zakeri<sup>2\*</sup>, Nasim Hayati Roodbari<sup>3</sup>,  
Navid Dinparast Djadid<sup>2</sup>

1- Ph.D., Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Professor, Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

\*Corresponding Address: Postal Code: 1316943551, Malaria and Vector Research Group (MVRG), Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran  
Email: zakerimvrg@gmail.com

Received: 11/May/2015, Accepted: 06/Oct/2015

### Abstract

**Objective:** Apical membrane antigen-1 (AMA-1) is one of the most promising blood-stage candidate antigens for production of a malaria vaccine against the *Plasmodium* parasite. Genetic diversity in protective antigens, which is a common phenomenon in a complex pathogen such as the *Plasmodium* parasite, is responsible for problems with the development of an effective malaria vaccine. This phenomenon will increase the parasite's ability to evade immune responses. Therefore, malaria vaccine development requires the evaluation of immune responses to different allelic forms of the vaccine candidate antigens.

**Methods:** In this investigation, the two variant forms of PvAMA-1 (PvAMA-1A and B) were expressed in an *Escherichia coli* M15-pQE30 system using genomic DNA from Iranian individuals with patent *Plasmodium vivax* infection. The IgG responses of two antigens were evaluated in BALB/c mice with the purified protein emulsified in Freund's adjuvant. In addition, the correct conformation of the recombinant proteins was evaluated by the indirect immunofluorescence antibody test (IFA).

**Results:** The evaluation of immunogenic responses of two variant forms of PvAMA-1 showed the presence of IgG responses in mice after three immunizations. Cross-reactions were observed. Monitoring of IgG responses showed the persistence up to one year after the last immunization. The antibodies raised against recombinant PvAMA-1s in injected mice recognized the native protein (PvAMA-1) localized on *Plasmodium vivax* merozoites.

**Conclusion:** The present outcomes confirmed the presence of common epitopes in recombinant forms of the protein that corresponded to native proteins. These emulsified proteins in Freund's adjuvant were immunogenic in BALB/c mice and IgG responses persisted for up to one year. The IgG responses to two PvAMA-1 variants did not differ significantly. The presence of cross-reactive antibodies has implied that one of these two forms of protein could be used in a universal blood-stage vaccine based on the PvAMA-1 antigen.

**Keywords:** Malaria, *Plasmodium vivax*, Apical Membrane Antigen-1, Polymorphism, Vaccine

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No.3, Pages: 27-43

# ارزیابی پاسخ‌های آنتی‌بادی موش Balb/c نسبت به دو فرم آلی پروتئین نو ترکیب آنتی‌ژن رأسی غشا-۱ پلاسمودیوم ویواکس به‌عنوان کاندید واکسن مالاریا

مریم صلواتی فر<sup>۱</sup>، صدیقه ذاکری<sup>۲\*</sup>، نسیم حیاتی رودباری<sup>۲</sup>، نوید دین پرست جدید<sup>۲</sup>

- ۱- دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران  
۲- استادیار، گروه تحقیقات مالاریا و ناقلین، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران  
۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران

\*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه تحقیقات مالاریا و ناقلین  
Email: zakerimvrg@gmail.com

پذیرش مقاله: ۹۴/۰۷/۱۴

دریافت مقاله: ۹۴/۰۲/۲۱

## چکیده

هدف: آنتی‌ژن رأسی غشا-۱ یکی از آنتی‌ژن‌های امید بخش کاندید مرحله خونی برای توسعه واکسن مالاریا علیه انگل پلاسمودیوم است. تنوع ژنتیکی در آنتی‌ژن‌های حفاظتی که پدیده‌ای معمول در یک انگل پیچیده مانند انگل پلاسمودیوم است، باعث ایجاد چالش در توسعه واکسنی مؤثر علیه مالاریا شده که این پدیده، توانایی انگل برای فرار از پاسخ‌های ایمنی را افزایش خواهد داد. از این رو توسعه واکسن مالاریا، نیازمند ارزیابی پاسخ‌های ایمنی به فرم‌های مختلف آلی آنتی‌ژن‌های کاندید واکسن است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، دو فرم آلی آنتی‌ژن رأسی غشا-۱A و ۱B پلاسمودیوم ویواکس و در سیستم اشریشیا کلی M15-pQE30 با استفاده از DNA ژنومی جدا شده از افراد ایرانی با عفونت آشکار پلاسمودیوم ویواکس، بیان شد. پاسخ‌های IgG نسبت به هر دو آنتی‌ژن، در موش‌های BALB/c با پروتئین خالص امولسیون شده در ادجوانت فروند بررسی شد. علاوه بر این؛ تاخوردگی صحیح پروتئین‌های نو ترکیب توسط آزمون IFA ارزیابی شد.

نتایج: ارزیابی پاسخ‌های ایمنی نسبت به دو فرم آلی پروتئین نو ترکیب آنتی‌ژن رأسی غشا-۱ پلاسمودیوم ویواکس، نشان داد که پاسخ‌های IgG پس از سه بار ایمن‌سازی در موش‌ها برانگیخته شده و واکنش متقاطع، مشاهده شد. پایش پاسخ‌ها نشان داد که IgG حداقل تا یک سال پس از آخرین تزریق پایدار باقی مانده است. همچنین آنتی‌بادی‌های برانگیخته شده علیه هر دو فرم آلی پروتئین نو ترکیب آنتی‌ژن سطحی اپیکال-۱ پلاسمودیوم ویواکس تزریق شده به موش‌ها، قادر به شناسایی فرم طبیعی آنتی‌ژن رأسی غشا-۱ پلاسمودیوم ویواکس روی سطح مروژوئیت پلاسمودیوم ویواکس بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاضر نشان دادند که پروتئین‌های نو ترکیب آنتی‌ژن رأسی غشا-۱ پلاسمودیوم ویواکس دارای اپی‌توپ‌های مشترکی با پروتئین طبیعی در سطح انگل است. همچنین این دو پروتئین به همراه ادجوانت فروند در موش‌های Balb/c ایمنی‌زا هستند و پاسخ‌های IgG پایداری را برانگیخته کردند که این پاسخ‌ها علیه دو فرم آلی آنتی‌ژن رأسی غشا-۱ پلاسمودیوم ویواکس، تفاوت معنی‌داری نداشت. بنابراین واکنش متقاطع نشان داد که حضور چند ریختی در این آنتی‌ژن کاندید واکسن، چالشی برای توسعه واکسن مرحله خونی بر اساس آنتی‌ژن رأسی غشا-۱ در پلاسمودیوم ویواکس نیست.

کلیدواژگان: مالاریا، پلاسمودیوم ویواکس، آنتی‌ژن رأسی غشا-۱، چندریختی، واکسن

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴، صفحات: ۲۷-۳۳

## مقدمه

مالاریا (Malaria) یکی از کشنده‌ترین بیماری‌های انگلی انسان است که سالانه در حدود یک میلیون نفر در جهان، جان خود را در اثر این بیماری از دست می‌دهند [۱]. پلاسمودیوم ویواکس (*Plasmodium vivax*) دومین انگل شایع ایجاد کننده مالاریای انسانی و عامل اصلی مرگ و میر در آمریکای لاتین، پاپوا گینه نو، برخی مناطق آفریقا، خاورمیانه و آسیا است [۲، ۳]. با وجود این که پلاسمودیوم ویواکس نسبت به پلاسمودیوم فالسیپاروم (*Plasmodium falciparum*) مرگ و میر کمتری را موجب می‌شود؛ اما به دلیل پدیده عود و ناتوانی در اثر این انگل، تأثیر اقتصادی اجتماعی بالایی بر جوامع دارد [۴-۶]. در سال‌های اخیر، باز پدیدگی پلاسمودیوم ویواکس در نواحی پاک شده، ظهور سویه‌های مقاوم به دارو [۷] و بیماری شدید و مرگ در اثر این انگل [۸، ۹]، نشان دهنده اهمیت مبارزه با آن در برنامه‌های کنترل و حذف مالاریا است. با توجه به برنامه‌های سازمان بهداشت جهانی (WHO) در حذف و ریشه کنی مالاریا، توافق شده است که ریشه کنی مالاریا با ابزارهای رایج امکان‌پذیر نبوده و توسعه استراتژی‌های نوین برای مهار بیماری، از جمله واکسن‌ها در دستور کار قرار گرفته است [۱۰].

اغلب تحقیقات انجام پذیرفته در زمینه توسعه واکسن مالاریا، بر کاهش علائم و بروز بیماری و به خصوص بر گونه فالسیپاروم متمرکز شده است. اما با توجه به برنامه جهانی ریشه کنی مالاریا، نیاز است که سایر گونه‌های انگل پلاسمودیوم به‌ویژه ویواکس نیز هدف قرار گیرند. همچنین تلاش در زمینه توسعه واکسن‌هایی باشد که مانع کننده انتقال مالاریا است (Vaccines that interrupt malaria transmission: VIMT). بنابراین؛ علاوه بر تمرکز بر سایر گونه‌ها، بررسی آنتی‌ژن‌های کاندید واکسن برای هر یک از مراحل جنسی و غیر جنسی انگل و آنتی‌ژن‌های پشه، لازمه طراحی واکسن‌های VIMT در راستای اهداف ریشه کنی مالاریا است (www.ploscollections.org/ malERA2011) این دسته واکسن‌ها ممکن است شامل

## ارزیابی پاسخ‌های آنتی‌بادی موش

آنتی‌ژن‌های متعدد از چرخه زندگی انگل پلاسمودیوم باشد. از طرفی VIMT می‌تواند شامل واکسن‌های کلاسیک ممانعت کننده چرخه انتقال باشد که آنتی‌ژن‌های مراحل جنسی انگل و آنتی‌ژن‌های پشه را هدف قرار می‌دهد، و یا به همراه آنتی‌ژن‌های کاندید و مؤثر مرحله پیش‌اریتروسیستی و اریتروسیستی باشد که به ترتیب میزان شیوع مرحله غیر جنسی و جنسی انگل را کاهش می‌دهد و بر کاهش انتقال مالاریا تأثیر دارد (www.ploscollections.org/malERA2011). از این رو تولید و ارزیابی پروتئین‌های کاندید واکسن VIMT و ارزیابی فعالیت ایمنی‌زایی آن‌ها در طراحی واکسن مناسب، لازم الاجرا است.

مرحله خونی (غیر جنسی) از چرخه زندگی انگل پلاسمودیوم، مسئول ایجاد علائم بالینی مرتبط با این عفونت است و واکسن علیه این مرحله ممکن است بار بالینی بیماری و میزان انگل را کاهش دهد. از این رو، آنتی‌ژن‌های مرحله غیر جنسی، اهداف مناسبی برای واکسن کارآمد علیه این انگل هستند [۱۱-۱۴]. این آنتی‌ژن‌ها، در فرم مروزوئیت (Merozoite) انگل بیان می‌شود و نقش حیاتی را در زمان تهاجم به گلبول‌های قرمز، بر عهده دارد. AMA-1 (Apical Membrane Antigen-1) یکی از کاندیدهای واکسن مرحله خونی غیر جنسی است که در تمام گونه‌های پلاسمودیوم وجود دارد و در دو مرحله کلیدی چرخه زندگی انگل یعنی اسپروزوئیت (Sporozoite) و مروزوئیت بیان می‌شود [۱۵، ۱۶]. AMA-1 در مرحله اسپروزوئیت، برای حمله انگل به هپاتوسیت‌ها و در مرحله مروزوئیت برای حمله به گلبول‌های قرمز ضروری است [۱۷]. ژن *ama-1* روی کروموزوم ۱۱ قرار گرفته و ناحیه کد کننده آن در پلاسمودیوم ویواکس، ۱۶۸۶ جفت باز و در پلاسمودیوم فالسیپاروم، ۱۸۶۹ جفت باز طول دارد. این ژن در تمامی گونه‌های پلاسمودیوم، ساختاری محافظت شده دارد و فاقد ایترون و توالی تکراری است [۱۸-۲۰] پروتئین AMA-1 یک پروتئین تراغشایی نوع ۱ است و از مناطق مختلفی از جمله یک بخش خارج سیتوپلاسمی (Ectodomain)، یک بخش تراغشایی و یک ناحیه

این پیش‌ساز به صورت پروتئولیتیک شکسته و به دو بخش ۴۸ کیلودالتونی و ۴۴ کیلودالتونی تبدیل می‌شود [۱۶، ۲۲-۲۷]. این آنتی‌ژن همچنین دارای سه مکان N-گلیکوزیلاسیون است که در فرم طبیعی آن، این مکان‌ها گلیکوزیده نمی‌شوند. گلیکوزیلاسیون ممکن است ایمنی‌زایی پروتئین را تحت تأثیر قرار دهد [۲۸]. نقش AMA-1 به خوبی شناخته شده نیست اما اختصاصی بودن آن به مرحله و مکان خاص، نشانگر این است که این پروتئین در فرآیند حمله به اریتروسیت‌های میزبان مداخله دارد [۲۵، ۲۷].



شکل ۱، نمای شماتیک ساختار ژن AMA-1: (TM) بخش تراغشایی، (Cyt) بخش سیتوپلاسمی

IgG3 است که زیر کلاس‌های مهم و مؤثر آن IgG1 و IgG3 هستند که از انواع آنتی‌بادی‌های سایتوفیلیک (Cytophilic) محسوب می‌شوند که در این راستا نوع آنتی‌ژن نیز اهمیت دارد. آنتی‌بادی‌های سایتوفیلیک با اپسونیزه نمودن (Opsonization) اریتروسیت‌های آلوده، حساسیت آن‌ها را به فاگوسیتوز و مهار انگل از طریق سلول‌هایی مانند نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها افزایش می‌دهد [۳۹].

در توسعه واکنش‌های نوترکیب، تاخوردگی (Folding) مناسب پروتئین هدف برای تحریک یک پاسخ ایمنی کارآمد ضروری است [۴۰]. بر این اساس، ایمنی‌زایی واکنشی که بر پایه AMA-1 توسعه یافته است، به تاخوردگی صحیح اپی‌توپ‌های آن بستگی دارد [۴۱]. آنتی‌بادی‌های کارآمد علیه اپی‌توپ‌هایی که تاخوردگی مناسب خود را متعاقب تشکیل صحیح پیوندهای دی‌سولفیدی کسب کرده‌اند، ایجاد می‌شود چرا که ثابت شده ایمن‌سازی موش‌ها با فرم‌های احیا شده یا آلکیله شده AMA-1، قادر به ایجاد حفاظت علیه پلاسمودیوم چابودی (*P. chabaudi*) نبوده است [۴۲].

سیتوپلاسمی کوچک در بخش انتهایی کربوکسی تشکیل شده است (شکل ۱) [۲۱]. این آنتی‌ژن در بخش اکتودومین دارای ۱۶ زیر واحد سیستمین محافظت شده است که تشکیل ۸ پیوند دی‌سولفیدی را می‌دهند. الگوی باندهای دی‌سولفیدی، ساختار اولیه این پروتئین را به سه ناحیه مجزا به نام‌های دومین I، دومین II و دومین III تقسیم می‌کند [۲۱]. پروتئین AMA-1 ابتدا به صورت یک پیش‌ساز ۸۳ کیلودالتونی (kDa) بیان می‌شود [۱۵، ۱۶، ۲۲] و قبل از انتقال به سطح مروزوئیت یا اسپروزوئیت، در زمان تهاجم،

مطالعه در جوندگان و پریمات‌های غیر انسانی نشان داده که PvAMA-1 (*P. vivax* AMA-1) هدف مناسبی برای پاسخ‌های سیستم ایمنی اکتسابی است [۲۹-۳۱]. علاوه بر این؛ شواهد قدرتمندی موجود است که آنتی‌بادی‌های علیه این مولکول، قادرند حمله انگل به هیپاتوسیت‌ها و گلبول‌های قرمز انسان را مهار کنند [۱۶، ۲۸، ۳۲]. همچنین مطالعات سرواپیدمیولوژی انجام پذیرفته در مناطق مختلفی از برزیل [۳۳-۳۶]، هند [۳۷] و سریلانکا [۳۸] نشان داده است که پاسخ‌های ایمنی اکتسابی طبیعی در انسان علیه PvAMA-1 حتی در افرادی که برخورد کوتاهی با بیماری داشته‌اند، شکل گرفته است. در افراد ساکن در مناطق آندمیک مالاریا، این انگل سبب القای پاسخ ایمنی هومورال می‌شود که پاسخ‌ها اغلب از نوع IgG و IgM است. مطالعات نشان داده‌است که آنتی‌بادی‌های IgG تولید شده علیه این انگل، نقش محافظت‌کنندگی دارند به نحوی که انتقال IgG از افراد ایمن به بیماران غیر ایمن، سبب کاهش میزان انگل در خون و علائم بیماری می‌شود [۳۹]. آنتی‌بادی‌های محافظت‌کننده علیه مالاریا از نوع

## مواد و روش‌ها

### انتخاب فرم آلی ژن *pvama-1* برای بیان

در دیگر مطالعه انجام پذیرفته در گروه تحقیقات مالاریا و ناقلین انستیتو پاستور ایران، تجزیه و تحلیل ژن *pvama-1* انجام شده و ۳۷ نمونه تعیین توالی شده‌اند [۵۰]. در میان نمونه‌های تعیین توالی شده، ۲۹ هاپلوتایپ با فراوانی‌های مختلف (۱۰/۸ درصد - ۲/۷ درصد) شناسایی و تغییرات تک‌بازی (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) در این ژن نسبت به سویه مرجع Sal-1 (GenBank accession no. AF063138) تعیین شدند. تنها ۳ مورد از SNPها در منطقه اپی‌توپ‌های سلول B قرار گرفته بودند. در این تحقیق دو هاپلوتایپ برای بیان انجام مراحل بعدی پروژه انتخاب شدند: PvAMA-1A (GenBank accession no. JX624741) ۵/۴ درصد و PvAMA-1B (GenBank accession no. JX624758). همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، هاپلوتایپ PvAMA-1A حاوی ۱۳ SNP است که ۲ مورد از آن‌ها در ناحیه اپی‌توپ سلول B قرار دارد در حالی که PvAMA-1B دارای ۹ SNP است که ۳ مورد آن در ناحیه اپی‌توپ سلول B قرار گرفته است (جدول ۱). لازم به ذکر است که هر دو فرم آلی انتخاب شده شیوع منطقه‌ای داشت و از بیماران افغانی و پاکستانی نیز جدا شد و همچنین در سایر مناطق آندمیک مالاریا از جمله هند (EF025196) [۵۱] و سریلانکا (EF218694, EF218696) و (EF218700) [۴۵] نیز گزارش شده‌اند.

از دیگر چالش‌های توسعه واکنش‌های مالاریایی، تنوع ژنتیکی در آنتی‌ژن‌های حفاظتی انگل پلاسمودیوم است که موجب افزایش توانایی آن برای فرار از پاسخ‌های ایمنی میزبان می‌شود. چندریختی (Polymorphism) ژنتیکی محدودی در ژن *pvama-1* در جدایه‌های مناطق مختلف گزارش شده است [۲۲، ۴۳-۴۸]. در نتیجه، این چندریختی می‌تواند ویژگی آنتی‌ژنی پروتئین را تغییر دهد [۴۹، ۵۰] که ممکن است مانع توسعه واکنش بر اساس PvAMA-1 به دلیل پاسخ‌های مختص سویه شود. بنابراین؛ توسعه واکنش مالاریا، نیازمند ارزیابی تأثیر تنوع آنتی‌ژنی برای فرم‌های مختلف آلی آنتی‌ژن‌های کاندید واکنش است.

پلاسمودیوم ویواکس گونه غالب مالاریا در ایران است و سالانه بیش از ۸۸ درصد موارد بالینی مالاریا را به خود اختصاص می‌دهد [وزارت بهداشت ایران، ۲۰۱۳]. علاوه بر این؛ به این علت که پلاسمودیوم ویواکس، اغلب موارد مالاریا در کشورهای همسایه (افغانستان و پاکستان) را نیز به خود اختصاص می‌دهد، توسعه ابزارهای نوین مانند واکنش‌ها علیه این گونه چالش برانگیز، ضروری است. بنابراین در مطالعه حاضر، به منظور بررسی تأثیر چندریختی مشخص شده آلی در ژن *pvama-1* [۵۰]، پتانسیل ایمنی‌زایی دو فرم آلی آن را در موش‌های Balb/c برای توسعه واکنشی حفاظت بخش و ایمن علیه مالاریای ویواکس، ارزیابی و مقایسه شد. همچنین در این تحقیق، پایداری پاسخ‌های ایمنی برانگیخته شده در موش‌ها علیه این پروتئین، به فاصله ۶ ماه و ۱ سال پس از آخرین تزریق، بررسی شد.

جدول ۱ چندریختی هاپلوتایپ‌های انتخاب شده PvAMA-1 (PvAMA-1A و PvAMA-1B) در مقایسه با سویه مرجع Sal-1

سویه‌ها	دومین‌ها																
	دومین I						دومین II			دومین III							
Sal I	D	R	K	N	N	L	A	E	E	K	P	E	K	L	E	K	R
AMA-1A	A	T	R	K	D	.	E	A	K	Q	.	.	.	R	D	R	H
AMA-1B	.	K	R	.	.	I	.	A	.	.	S	K	I	P	.	.	H

\* اسید آمینه‌های تغییر یافته در اثر تغییر نوکلئوتیدها که در مکان اپی‌توپ‌های سلول B قرار گرفته، نمایش داده شده است. نقاط، نشان‌دهنده اسید آمینه‌های یکسان با سویه مرجع است.

## بیان و تخلیص دو فرم آلی پروتئین نو ترکیب

### PvAMA-1

در این تحقیق دو پروتئین نو ترکیب PvAMA-1A و PvAMA-1B بر اساس روشی که در مطالعه قبلی توضیح داده شد، بیان و تخلیص شد [۵۲]. روش بیان به اختصار به این صورت بود که دو پروتئین در میزبان *Escherichia coli* M15 (pREP4) (Qiagen، آلمان) به صورت متصل شده با دنباله پلی هیستیدین (6-His) در انتهای آمین خود بیان شد و سپس با استفاده از رزین آگارز  $Ni^{2+}$  نیتروتری استیک اسید (Ni-NTA) (Agarose) (Qiagen، آلمان)، خالص سازی شدند. در انتها محلول های حاصل به کمک ستون های Econo-Pac 10DG (BioRad، آمریکا) طبق دستورالعمل شرکت سازنده نمک زدایی و توسط دستگاه تغلیظ کننده (Eppendorf، آلمان) تغلیظ شدند. تمامی محلول های محتوی پروتئین نو ترکیب، روی ژل ۱۲ درصد به روش SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) تحت شرایط احیا و غیر احیا (در غیاب ۲- مرکاپتواتانل و جوشاندن) بررسی و غلظت پروتئین ها با استفاده از معرف برادفورد (Bradford) و دستگاه اسپکتروفوتومتر (Eppendorf، آلمان) تعیین شد. بیان پروتئین ها با استفاده از روش وسترن بلاتینگ (Western Blotting) با آنتی بادی Anti-His و سرم بیماران مبتلا به پلاسمودیوم و یواکس در شرایط احیا و غیر احیا تأیید نهایی شد [۵۲].

## آزمایش اندوتوکسین

اندوتوکسین های دیواره سلولی باکتری های گرم منفی ترکیباتی است که پاسخ های التهابی را به شدت تحریک می نماید و سبب بیماری های حاد و مزمن می شود. تزریق اندوتوکسین می تواند سبب لرز حاد، تب، نارسایی اندام ها و مرگ شود. بنابراین اغلب داروها و ترکیبات زیستی نیازمند انجام آزمون های دقیق برای تعیین میزان اندوتوکسین هستند

[۵۳]. در این تحقیق سطوح اندوتوکسین باکتریایی با استفاده از کیت کروموزنیک LAL (Lonza، آمریکا)، در واحد کنترل کیفی تولید پروتئین های نو ترکیب انستیتو پاستور ایران تعیین شد.

## تولید آنتی بادی پلی کلونال (Polyclonal) علیه

### پروتئین نو ترکیب PvAMA-1 در موش

به منظور تحریک تولید آنتی بادی علیه دو فرم آلی پروتئین نو ترکیب PvAMA-1، موش های Balb/c ماده ۶-۸ هفته از انستیتو پاستور ایران خریداری و به چهار گروه ۱۰ تایی تقسیم بندی شد. گروه اول موش ها با پروتئین نو ترکیب PvAMA-1A به همراه ادجوانت فروند (Freund's adjuvant) (Sigma، آمریکا)، گروه دوم با پروتئین نو ترکیب PvAMA-1B به همراه ادجوانت فروند، گروه سوم با PBS (Phosphate-buffered saline) به همراه ادجوانت فروند و گروه چهارم با PBS به تنهایی تزریق شدند. در تزریق اول از ادجوانت کامل فروند و در دو تزریق یاد آور، از ادجوانت ناقص استفاده شد. میزان تزریق پروتئین نو ترکیب ۴۰ میکروگرم به ازای هر موش بود که به نسبت ۱:۱ با ادجوانت، در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به کار گرفته شد. روش تزریق به صورت زیر جلدی در قاعده دم بوده و تزریق ها سه بار، به فاصله دو هفته انجام شد. به منظور ارزیابی پاسخ های ایمنی، دو هفته پس از آخرین تزریق و به منظور بررسی پایداری آنتی بادی، ۶ ماه و ۱ سال پس از آخرین تزریق (هفته های ۳۰ و ۵۶) از موش ها خون گیری انجام و سرم های هر گروه به صورت مخلوط شده تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

## انجام آزمون IFA

در این تحقیق، به منظور بررسی توانایی سرم های حاوی آنتی بادی های ضد PvAMA-1 از موش های ایمن شده برای شناسایی فرم طبیعی آنتی ژن PvAMA-1 بر سطح مروزوئیت و همچنین تعیین تشابه میان اپی توپ های فرم های نو ترکیب با

## ارزیابی پاسخ‌های آنتی‌بادی موش

PBS (Sigma, peroxidase, آمریکا) با رقت ۱:۲۵۰۰۰ در ۱۹ استفاده شد. افزوده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. بعد از شستشو، TMB (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine) (جهان الکل، ایران) به عنوان سوبسترا به هر چاهک اضافه شد و پس از ظهور رنگ آبی، واکنش توسط اسید سولفوریک ۲ نرمال متوقف شد. در انتها، شدت رنگ ایجاد شده (Optical density: OD) در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA Reader (Biotech, آمریکا) ثبت شد.

## تجزیه و تحلیل آماری نتایج توسط نرم افزار SPSS

در این مرحله از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده شد. ابتدا با توجه به OD سرم موش‌های طبیعی (هیچ گونه تزریقی نداشته‌اند)، Cut-off برای IgG، طبق فرمول زیر محاسبه شد:  $Cut\ off = 3\ SD + \text{میانگین}\ OD\ ۴۵۰\ \text{نانومتر}$  میانگین و SD (Standard Deviation) توسط نرم افزار SPSS (نسخه ۲۰) قابل محاسبه بود.

تفاوت در سطوح پاسخ‌های آنتی‌بادی IgG برای هر یک از دو فرم آلی پروتئین نوترکیب PvAMA-1 بین گروه‌های مختلف اصلی و کنترل با آزمون آنوای یک طرفه (One-Way Analysis of Variance: ANOVA) تجزیه و تحلیل شد. همچنین در زمان‌های مختلف ۶، ۳۰ و ۵۶ هفته پس از اولین تزریق، تفاوت سطوح مختلف آنتی‌بادی نسبت به هر یک از پروتئین‌های PvAMA-1A و PvAMA-1B با آزمون t با نمونه‌های جفت شده (Paired sample t-test) تجزیه و تحلیل شد. در تمام آزمون‌ها  $P\ value < ۰/۰۵$  نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمون و کنترل در نظر گرفته شد.

## نتایج

تولید پروتئین‌های نوترکیب و ایمن‌سازی موش‌ها پس از انتخاب دو فرم آلی PvAMA-1A و PvAMA-1B.

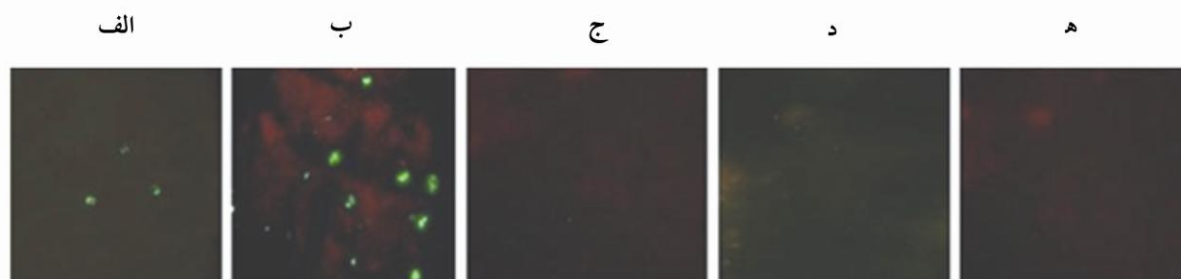
فرم‌های طبیعی پروتئین، از روش ایمنو فلورسینس IFA (Indirect immunofluorescence antibody test) استفاده شد. بدین منظور، اسلایدهای چند خانه‌ای از انگل بیماران آلوده به پلاسمودیوم ویواکس آماده و پس از خشک شدن در هوا، با استن سرد به مدت ۱۰ دقیقه، روی لام تثبیت شد. سپس سرم رقیق شده موش‌های ایمن شده (۱:۵۱۲۰۰-۱:۱۰) در محلول PBS 1X (pH=۷/۴) حاوی ۰/۰۵ درصد تویین (Tween)، به چاهک‌ها اضافه و در اتاقک مرطوب به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. پس از سه مرتبه شستشو با PBS، هر چاهک با ۲۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی ثانویه شامل AntiMouse Immunoglobulin-conjugated with FITC با رقت ۱:۴۰ و Evans blue با رقت ۱:۱۰۰ در PBS 1X به مدت ۴۵ دقیقه مجاور شد و پس از شستشو با PBS 1X، چاهک‌ها با میکروسکوپ فلورسنت (Nikon E200، ژاپن) بررسی شد.

## ارزیابی پاسخ‌های آنتی‌بادی توسط آزمون الیزا

سرم موش‌های ایمن شده برای حضور آنتی‌بادی‌های IgG اختصاصی علیه دو فرم آلی پروتئین نوترکیب PvAMA-1 از طریق آزمون الیزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) ارزیابی شد. به طور خلاصه؛ میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای (Greiner Labortechnik, آلمان) با ۲۵۰ نانوگرم از هر یک از پروتئین‌های نوترکیب در بافر کربنات بی‌کربنات (pH=۹/۶) انکوبه و یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از شستشوی چاهک‌های پلیت با محلول شستشو (PBS 1X, pH= 7.4) حاوی ۰/۰۵ درصد Tween)، چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر PBS 1X حاوی ۲/۵ درصد (pH=۷/۴) BSA در دمای اتاق به مدت ۱/۵ ساعت بلوکه شد. پس از انجام شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر سرم موش‌های ایمن شده که به میزان ۱:۲۰۰ در محلول شستشو حاوی ۰/۵ درصد BSA رقیق شده بود، به چاهک‌ها اضافه و ۱/۵ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. پس از شستشوی مجدد، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ثانویه (goat anti-mouse IgG horseradish)

پروتئین‌های نوترکیب PvAMA-1A و PvAMA-1B، به ترتیب ۱/۵۶ واحد اندوتوکسین/ میلی‌لیتر و ۱/۴۱ واحد اندوتوکسین/ میلی‌لیتر بود. بنابراین تزریق ۴۰ میکروگرم از پروتئین نوترکیب به ازای هر موش، مقادیر قابل قبولی از اندوتوکسین (به ترتیب ۰/۰۶۲ و ۰/۰۵۶ واحد اندوتوکسین) را به هر یک از آن‌ها وارد می‌نمود.

هر دو پروتئین طبق روندی که در مطالعه قبلی توضیح داده شد، به صورت نوترکیب در *E. coli* M15-pQE30 بیان شده و بعد از تأیید توسط SDS-PAGE و وسترن بلات، با استفاده از رزین آگارز  $Ni^{2+}$  نیتریلوتری استیک اسید تخلیص شدند [۵۲]. در مرحله بعد نمک‌زدایی و تعیین غلظت پروتئین‌ها انجام و میزان اندوتوکسین تعیین شد. غلظت اندوتوکسین



شکل ۲ شناسایی شکل طبیعی پروتئین PvAMA-1 در سطح مروزوئیت انگل پلاسمودیوم ویواکس توسط پلی‌کلونال آنتی‌بادی تولید شده علیه دو فرم آلی پروتئین نوترکیب PvAMA-1 در موش‌های ایمن شده با استفاده از روش IFA؛ الف) سرم موش‌های تزریق شده با PvAMA-1A به همراه ادجوانت فروند، ب) سرم موش‌های تزریق شده با PvAMA-1B به همراه ادجوانت فروند، ج) سرم موش‌های تزریق شده با PBS به همراه ادجوانت فروند، د) سرم موش‌های تزریق شده با PBS، ه) سرم موش‌های غیر آلوده قبل از تزریق (Preimmune sera)

اپی‌توپ‌هایی همانند اپی‌توپ‌های طبیعی پروتئین اصلی بوده است. بنابراین توانسته است آنتی‌بادی‌هایی را تحریک نماید که فرم طبیعی پروتئین در سطح انگل را شناسایی می‌نمایند. چنین واکنش مثبتی بین سرم موش‌های گروه کنترل و طبیعی با فرم طبیعی پروتئین در سطح انگل مشاهده نشد (شکل ۲).

### بررسی پاسخ‌های ایمنی هومورال در موش‌های ایمن شده

به منظور تعیین پاسخ‌های ایمنی هومورال نسبت به پروتئین‌های نوترکیب، پاسخ‌های IgG به کمک آزمون ELISA ارزیابی شد. نتایج نشان داد که در هفته ۶ پس از اولین تزریق، موش‌ها سطوح بالایی از آنتی‌بادی‌های IgG علیه پروتئین‌های نوترکیب PvAMA-1A و PvAMA-1B را تولید نموده‌اند (میانگین جذب نوری  $450 = 3/15$  برای

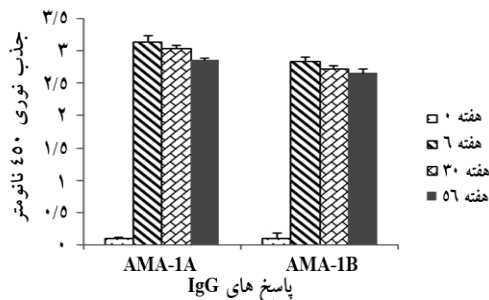
### بررسی توانایی اتصال آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده علیه پروتئین‌های نوترکیب PvAMA-1A و PvAMA-1B در موش‌ها به پروتئین طبیعی PvAMA-1 در سطح مروزوئیت انگل پلاسمودیوم ویواکس

در این بررسی، آزمون IFA انجام شد که در این روش، آنتی‌بادی‌های متصل شده به رنگ‌های فلورسنت، برای شناسایی آنتی‌ژن به کار می‌رود. در این آزمون مشاهده نقاط فلورسنت سبز رنگ در زمینه تاریک میکروسکوپ فلورسنت در گروه‌های اصلی تزریق شده با آنتی‌ژن، نشان داد که آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه پروتئین نوترکیب قادر به شناسایی فرم طبیعی پروتئین در سطح انگل هستند، به عبارت دیگر؛ پروتئین نوترکیب تاخوردگی صحیحی داشته و دارای



## ارزیابی پاسخ‌های آنتی‌بادی موش

( $P > 0/05$ , آزمون One-Way ANOVA). علاوه بر این؛ در زمان‌های مختلف پس از تزریق اول (هفته‌های ۶، ۳۰ و ۵۶) میان پاسخ‌های آنتی‌بادی IgG نسبت به هر یک از پروتئین‌های PvAMA-1A و PvAMA-1B، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0/05$ , آزمون t با نمونه‌های جفت شده، شکل ۴).

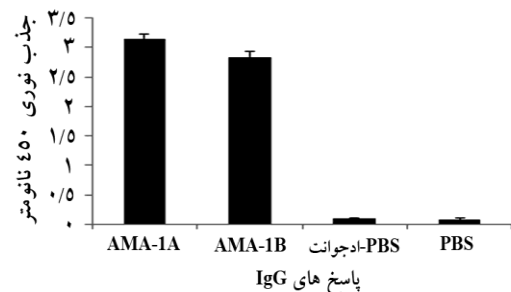


شکل ۴ میانگین میزان جذب نوری سرم موش‌ها در آزمون ELISA به‌منظور ارزیابی پایداری آنتی‌بادی IgG تولید شده در موش‌ها علیه پروتئین‌های نوترکیب PvAMA-1A و PvAMA-1B در هفته‌های ۰، ۶، ۳۰ و ۵۶ پس از آخرین تزریق؛ (AMA-1A) گروه تزریق شده با پروتئین نوترکیب AMA-1A به همراه ادجوانت فروند، (AMA-1B) گروه تزریق شده با پروتئین نوترکیب AMA-1B به همراه ادجوانت فروند.

## بررسی وجود واکنش متقاطع میان دو فرم آلی

به‌منظور بررسی این‌که آیا پاسخ‌های آنتی‌بادی علیه دو فرم آلی پروتئین PvAMA-1 مختص سویه هستند یا خیر، سطوح آنتی‌بادی IgG گروه‌های موشی تزریق شده با هر یک از دو پروتئین نوترکیب، نسبت به هر دو سویه پروتئین ارزیابی شد. به عبارت دیگر؛ واکنش متقاطع (Cross-reaction) میان دو فرم آلی، در یک آزمون ELISA آزمایش شد. به این ترتیب که از پروتئین‌های نوترکیب PvAMA-1A و PvAMA-1B به‌طور مجزا در دو پلیت به‌عنوان آنتی‌ژن و از سرم موش‌های تزریق شده با فرم آلی دیگر به‌عنوان آنتی‌بادی اولیه استفاده شد. نتایج حاصل نشان‌دهنده وجود واکنش متقاطع بالا میان دو پروتئین نوترکیب بود به نحوی که هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری میان پاسخ‌های آنتی‌بادی IgG تحریک شده در

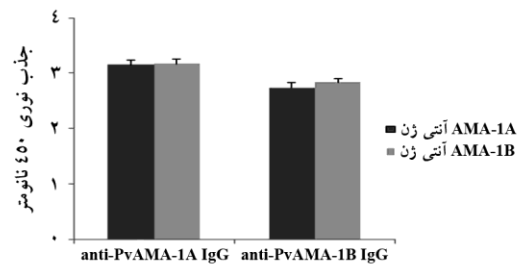
PvAMA-1A و میانگین جذب نوری  $450 \text{ nm}$  برای PvAMA-1B =  $450 \text{ nm}$  در طول موج  $450 \text{ nm}$  در مقایسه با موش‌های ایمن شده، هیچ‌گونه IgG- در موش‌های گروه‌های کنترل مشاهده نشد ( $P < 0/05$ , one-way ANOVA، شکل ۳). علاوه بر این؛ اختلاف معنی‌داری میان پاسخ‌های IgG علیه پروتئین‌های نوترکیب PvAMA-1A و PvAMA-1B وجود نداشت [ $P > 0/05$ , آزمون t با نمونه‌های مستقل (Independent-sample t-test)].



شکل ۳ میانگین میزان جذب نوری سرم موش‌ها در آزمون ELISA علیه دو فرم آلی پروتئین نوترکیب PvAMA-1 در دو هفته پس از آخرین تزریق (هفته ۶؛ (AMA-1A) گروه تزریق شده با پروتئین نوترکیب AMA-1A به همراه ادجوانت فروند، (AMA-1B) گروه تزریق شده با پروتئین نوترکیب AMA-1B به همراه ادجوانت فروند، (PBS-ادجوانت) گروه تزریق شده با PBS به همراه ادجوانت فروند، (PBS) گروه تزریق شده با PBS به تنهایی.

به‌منظور بررسی پایداری پاسخ‌های ایمنی علیه پروتئین‌های نوترکیب PvAMA-1A و PvAMA-1B در موش‌های ایمن شده، در زمان‌های ۶ ماه و ۱ سال پس از آخرین تزریق (هفته‌های ۳۰ و ۵۶ بعد از اولین تزریق)، خون‌گیری انجام و پس از جداسازی سرم‌ها و مخلوط نمودن آن‌ها، آزمون ELISA انجام شد. نتایج نشان دادند که سطوح آنتی‌بادی IgG علیه هر دو پروتئین نوترکیب PvAMA-1A و PvAMA-1B در هفته ششم پس از اولین تزریق به‌طور معنی‌داری افزایش یافته و حداقل تا ۵۶ هفته از تزریق اول پایدار باقی مانده است.

گروه‌های موشی تزریق شده با PvAMA-1A و PvAMA-1B نسبت به هر دو فرم آلی وجود نداشت ( $P > 0.05$ )،  $X^2$  test، شکل ۵).



شکل ۵ میانگین میزان جذب نوری سرم موش‌ها در آزمون ELISA برای ارزیابی واکنش متقاطع پاسخ‌های آنتی‌بادی IgG موشی علیه دو فرم آلی پروتئین نوترکیب PvAMA-1 (anti-PvAMA-1A IgG) پاسخ‌های IgG در گروه تزریق شده با پروتئین نوترکیب AMA-1A به همراه ادجوانت فروند، (anti-PvAMA-1B IgG) پاسخ‌های IgG در گروه تزریق شده با پروتئین نوترکیب AMA-1B به همراه ادجوانت فروند

## بحث

حذف و ریشه کنی بیماری مالاریا، یکی از اهداف نهایی WHO است. با این حال، ابزارها و درمان‌های موجود برای دست یابی به این هدف، پاسخ‌گو نبوده و از این رو، توسعه یک واکسن کارآمد و استفاده از آن در کنار سایر روش‌های کنترلی، بسیار ضروری است [۵۴]. اغلب کاندیدهای واکسن مالاریا، پروتئین‌های سطحی چندریختی هستند که پاسخ‌های ایمنی اختصاصی به سویه را برمی‌انگیزند [۵۵-۶۱]. این تنوع آنتی‌ژنی یکی از مواردی است که در توسعه واکسن ایجاد چالش نموده است و توانایی انگل برای فرار از پاسخ‌های ایمنی را افزایش خواهد داد. بنابراین محققان سعی در غلبه کردن بر این پدیده را دارند و پیشنهاد شده است که بهترین راه کار، استفاده از تمامی سویه‌های متفاوت در حال گردش در مناطق آندمیک مالاریایی در طراحی واکسن است که قطعاً هزینه توسعه و ساخت واکسن را افزایش خواهد داد. با این حال، یک روش جایگزین و مقرون به صرفه، می‌تواند طراحی واکسنی بر اساس مکان‌های حفاظت شده یا مشترک آنتی‌ژن‌های هدف، برای القای

حفاظت علیه طیف گسترده‌ای از سویه‌ها باشد [۶۲ و ۶۳]. برای نیل این هدف، درک مکانیسم تنوع آلی در آنتی‌ژن کاندید واکسن و پاسخ‌های ایمنی نسبت به فرم‌های مختلف آن، ممکن است در طراحی واکسن کارگشا باشد. بنابراین هدف مطالعه حاضر، ارزیابی و مقایسه پاسخ‌های IgG موشی نسبت به دو فرم آلی مختلف آنتی‌ژن کاندید واکسن PvAMA-1 است، به عبارت دیگر؛ باید بررسی شود که آیا پاسخ‌های ایجاد شده در موش‌ها مختص سویه هستند یا خیر که ممکن است نتایج حاصل، در توسعه واکسن بر اساس PvAMA-1، تأثیر گذار باشد و صرفه اقتصادی به همراه داشته باشد.

آنتی‌ژن‌های متعددی از پلاسمودیوم، کاندید توسعه واکسن علیه این انگل است. در میان آن‌ها، AMA-1 یکی از آنتی‌ژن‌های مهم برای یک واکسن مرحله خونی مالاریا است. با توجه به فقدان سیستم‌های کشت آزمایشگاهی برای پلاسمودیوم و یواکس، سیستم تولید آنتی‌ژن‌های نوترکیب، برای طراحی واکسن مالاریا، به کار گرفته شده است [۶۴]. علاوه بر این؛ ثابت شده است که صحیح بودن تاخوردگی پروتئین نوترکیب برای تحریک پاسخ‌های ایمنی کارآمد، اهمیت فراوانی دارد [۴۰، ۴۲، ۵۲، ۶۵-۶۷]. مطالعاتی که در مورد علت تنوع ژنتیکی موجود در پروتئین‌های سطحی انگل پلاسمودیوم [۶۸] صورت پذیرفته است نشان می‌دهد که انتخاب طبیعی موجب تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های انگل پلاسمودیوم در هر منطقه آندمیک می‌شود [۶۹]. تعامل پویا بین انسان و این انگل، منجر به تأثیر انتخاب طبیعی روی مولکول‌های مسئول حمله انگل به انسان، مانند آنتی‌ژن AMA-1 شده تا با ایجاد تنوع در آن‌ها، موجب فرار انگل از سیستم ایمنی میزبان شوند [۷۰]. بنابراین؛ اگر چنانچه واکسنی بر اساس آلی‌های موجود در یک منطقه آندمیک طراحی شود، ممکن است فقط علیه سویه‌های همان منطقه مؤثر واقع شود. علاوه بر آن؛ در صورت حضور آلی‌های مختلف در یک منطقه و طراحی واکسن تنها علیه یک فرم آلی، ممکن است به دلیل محدود شدن پاسخ ایمنی میزبان به یک آلی، برنامه تولید و توسعه واکسن کارآمد را به دلیل افزایش دیگر فرم‌های آلی در منطقه، با شکست روبه‌رو نماید.

## ارزیابی پاسخ‌های آنتی‌بادی موش

تولید پلی‌کلونال آنتی‌بادی‌هایی را تحریک نموده‌اند که قادر به شناسایی شکل طبیعی این پروتئین در سطح انگل پلاسمودیوم ویواکس هستند. به عبارت دیگر؛ مشخص شد که پروتئین‌های نوترکیب بیان شده، اپی‌توپ‌های القاکننده آنتی‌بادی، مشابه پروتئین‌های طبیعی در سطح انگل را داشته‌اند. با توجه به قابلیت القای تولید آنتی‌بادی توسط پروتئین‌های نوترکیب و تشابه اپی‌توپ‌های آن‌ها با اپی‌توپ‌های موجود در پروتئین‌های طبیعی موجود در سطح انگل‌ها، می‌توان نتیجه گرفت که دو پروتئین نوترکیب PvAMA-1A و PvAMA-1B، مانند پروتئین طبیعی عمل می‌نمایند و در نتیجه می‌توانند در طراحی واکسن مالاریا علیه گونه پلاسمودیوم ویواکس استفاده شوند.

با توجه به نقش محافظت‌کنندگی آنتی‌بادی IgG علیه مرحله خونی انگل مالاریا، این نوع پاسخ‌ها در موش‌های ایمن شده بررسی شد. یافته‌ها نشان داد که هر دو آنتی‌ژن نوترکیب PvAMA-1A و PvAMA-1B، قادرند پاسخ‌های IgG قدرتمند، مشابه و پایداری را تحریک نمایند. در واقع عدم تفاوت پاسخ‌های تحریک شده در گروه‌های موشی تزریق شده با دو فرم آلی پروتئین نوترکیب و به عبارتی وجود واکنش متقاطع، نشان‌دهنده عدم تأثیر چندریختی ژن *pvama-1* در نوع پاسخ‌های ایمنی است. از این رو به نظر می‌رسد اغلب پاسخ‌های آنتی‌بادی، علیه اپی‌توپ‌های سلول B مشترک و حفاظت شده ایجاد شده‌است که این موضوع می‌تواند تنوع آلی PvAMA-1 را به‌عنوان مهم‌ترین چالش در طراحی واکسن مرتفع نماید. بنابراین با توجه به این نتایج مشخص شد که یکی از فرم‌های آلی این پروتئین می‌تواند برای تحریک سیستم ایمنی کفایت کند و در طراحی واکسن منطقه‌ای در ایران، در کنار سایر کاندیدهای واکسن، به کار رود که این مسئله صرفه اقتصادی زیادی به همراه خواهد داشت.

## تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از رساله دکتری زیست‌شناسی سلولی مولکولی و قسمتی از طرح تحقیقاتی سرکار خانم دکتر صدیقه

از طرف دیگر؛ به کار گرفتن تعداد زیادی هاپلوتیپ در واکسن، از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نخواهد بود. بنابراین در مطالعه حاضر، برای اولین بار در دنیا، به‌منظور ارزیابی آنتی‌ژن AMA-1 گونه پلاسمودیوم ویواکس به‌عنوان کاندید واکسن و بررسی تأثیر چندریختی آن، اقدام به بیان دو فرم آلی شایع‌تر این پروتئین نوترکیب و ایمن‌سازی موش‌ها با این دو فرم شد.

فرم‌های آلی پروتئین PvAMA-1 در مطالعه قبلی تعیین شده بود [۵۰] و در این مطالعه دو فرم آلی شایع‌تر این ژن، *pvama-1A* و *pvama-1B* که فراوانی بالاتری داشت و تعداد تک نوکلئوتیدهای چندریختی بیشتری را پوشش می‌داد، همچنین در میان بیماران ایرانی، افغانی و پاکستانی نیز مشترک بود، انتخاب شد؛ چرا که تردهای کنترل نشده میان ایران در مرزهای شرقی با دو کشور آندمیک و پرخطر برای این بیماری، امکان بازگشت بیماری را به همراه دارد و سبب شکست برنامه‌های مبارزه با مالاریا در کشورمان خواهد شد. لازم به ذکر است که این دو هاپلوتیپ انتخاب شده، در هند و سریلانکا نیز گزارش شده است [۴۵، ۵۱]. این وجه مشترک بیان‌گر این مطلب است که اگر واکنسی علیه این هاپلوتیپ طراحی شود، ممکن است در مناطق مذکور نیز کارایی داشته باشد که این مورد، علاوه بر صرفه اقتصادی، موجب نزدیک شدن به حذف منطقه‌ای بیماری که از اهداف سازمان جهانی بهداشت است خواهد شد.

مطالعات گذشته نشان داده است که آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (monoclonal) علیه AMA-1، که قادر است مانع حمله انگل به اریتروسیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی شود، تنها اپی‌توپ‌های صحیح این آنتی‌ژن که در اثر پیوندهای دی‌سولفیدی مناسب ایجاد می‌شود را شناسایی می‌نمایند [۴۰، ۴۲، ۷۱-۷۳]. به عبارت دیگر؛ تاخوردگی صحیح پروتئین نوترکیب در مسیر توسعه واکسن دارای اهمیت فراوان است. بنابراین در این مطالعه، به‌منظور تأیید این تاخوردگی صحیح، آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه PvAMA-1 تحریک شده در موش، توسط آزمون IFA ارزیابی شد. مشخص شد که آنتی‌ژن‌های نوترکیب PvAMA-1A و PvAMA-1B،

## منابع

- [1] WHO. World Malaria Report 2013. Geneva, Switzerland: WHO Press; Available at: [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2013/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/).
- [2] Sharma VP. Re-emergence of malaria in India. *Indian J Med Res* 1996; 103: 26-45.
- [3] Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64(1-2 Suppl): 97-106.
- [4] Kochar DK, Das A, Kochar SK, Saxena V, Sirohi P, Garg S, Kochar A, Khatri MP, Gupta V. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80(2): 194-8.
- [5] Sharma A, Khanduri U. How benign is benign tertian malaria? *J Vector Borne Dis* 2009; 46(2): 141-4.
- [6] Lacerda MV, Hipólito JR, Passos LN. Chronic *Plasmodium vivax* infection in a patient with splenomegaly and severe thrombocytopenia. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41(5): 522-3.
- [7] Baird JK. Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(3): 508-34.
- [8] Price RN, Douglas NM, Anstey NM. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Curr Opin Infect Dis* 2009; 22(5): 430-5.
- [9] Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, Lampah DA, Price RN. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med* 2008; 5(6): e128.
- [10] Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Matsuda S, Han ET, Otsuki H, Kaneko O, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Torii M, Endo Y. Wheat germ cell-free system-based production of malaria proteins for discovery of novel vaccine candidates. *Infect Immun* 2008; 76(4): 1702-8.
- [11] O'Donnell RA, de Koning-Ward TF, Burt RA, Bockarie M, Reeder JC, Cowman AF, Crabb BS. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria *J Exp Med* 2001; 193(12): 1403-12.
- [12] Richie TL, Saul A. Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature* 2002; 415(6872): 694-701.
- [13] Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature* 2002; 415(6872): 680-5.
- [14] Dutta S, Haynes JD, Moch JK, Barbosa A, Lanar DE. Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum* merozoites. *PNAS* 2003; 100(21): 12295-300.
- [15] Healer J, Crawford S, Ralph S, McFadden G, Cowman AF. Independent translocation of two

- miconemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites. *Infect Immun* 2002; 70(10): 5751-8.
- [16]Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, Rubinstein E, Hannoun L, Charoenvit Y, Kocken CH, Thomas AW, Van Gemert GJ, Sauerwein RW, Blackman MJ, Anders RF, Pluschke G, Mazier D. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem* 2004; 279(10): 9490-6.
- [17]Bai T, Becker M, Gupta A, Strike P, Murphy VJ, Anders RF, Batchelor AH. Structure of AMA1 from *Plasmodium falciparum* reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(36): 12736-41.
- [18]Genton B, Reed ZH. Asexual blood-stage malaria vaccine development: facing the challenges. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20(5): 467-75.
- [19]Silvie O, Franetich JF, Rénia L, Mazier D. Malaria sporozoite: migrating for a living. *Trends Mol Med* 2004; 10(3): 97-100.
- [20]Hodder AN, Crewther PE, Matthew ML, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Anders RF. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *J Biol Chem* 1996; 271(46): 29446-52.
- [21]Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJ, Krettli AU, Braga EM. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75(4): 582-7.
- [22]Rodrigues MH, Rodrigues KM, Oliveira TR, Cômodo AN, Rodrigues MM, Kocken CH, Thomas AW, Soares IS. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int J Parasitol* 2005; 35(2): 185-92.
- [23]Peterson MG, Marshall VM, Smythe JA, Crewther PE, Lew A, Silva A, Anders RF, Kemp DJ. Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol* 1989; 9(7): 3151-4.
- [24]Narum DL, Thomas AW. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 67(1): 59-68.
- [25]Triglia T, Healer J, Caruana SR, Hodder AN, Anders RF, Crabb BS, Cowman AF. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Mol Microbiol* 2000; 38(4): 706-18.
- [26]Fraser TS, Kappe SH, Narum DL, VanBuskirk KM, Adams JH. Erythrocyte-binding activity of *Plasmodium yoelii* apical membrane antigen-1 expressed on the surface of transfected COS-7 cells. *Mol Biochem Parasitol* 2001; 117(1): 49-59.
- [27]Mitchell GH, Thomas AW, Margos G, Dluzewski AR, Bannister LH. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect Immun* 2004; 72(1): 154-8.
- [28]Remarque EJ, Faber BW, Kocken CH, Thomas AW. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitol* 2008; 24(2): 74-84.
- [29]Kocken CH, Dubbeld MA, Van Der Wel A,

- Pronk JT, Waters AP, Langermans JA, Thomas AW. High-level expression of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in *Macaca mulatta* immunized with *P. vivax* AMA-1 and adjuvant SBAS2. *Infect Immun*. 1999; 67(1): 43-9.
- [30] Narum DL, Ogun SA, Thomas AW, Holder AA. Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii* yoelii YM blood-stage infection. *Infect Immun* 2000; 68(5): 2899-906.
- [31] Stowers AW, Kennedy MC, Keegan BP, Saul A, Long CA, Miller LH. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. *Infect Immun* 2002; 70(12): 6961-7.
- [32] Kennedy MC, Wang J, Zhang Y, Miles AP, Chitsaz F, Saul A, Long CA, Miller LH, Stowers AW. In vitro studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. *Infect Immun* 2002; 70(12): 6948-60.
- [33] Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJ, Krettli AU, Braga EM. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75(4): 582-7.
- [34] Barbedo MB, Ricci R, Jimenez MC, Cunha MG, Yazdani SS, Chitnis CE, Rodrigues MM, Soares IS. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(3): 335-9.
- [35] Múfalo BC, Gentil F, Bargieri DY, Costa FT, Rodrigues MM, Soares IS. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. *Microbes Infect* 2008; 10(12-13): 1266-73.
- [36] Bueno LL, Lobo FP, Morais CG, Mourão LC, de Ávila RA, Soares IS, Fontes CJ, Lacerda MV, Chavez Olórtegui C, Bartholomeu DC, Fujiwara RT, Braga EM. Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1). *PLoS One* 2011; 6(6): e21289.
- [37] Seth RK, Bhat AA, Rao DN, Biswas S. Acquired immune response to defined *Plasmodium vivax* antigens in individuals residing in northern India. *Microbes Infect* 2010; 12(3): 199-206.
- [38] Wickramarachchi T, Premaratne PH, Perera KL, Bandara S, Kocken CH, Thomas AW, Handunnetti SM, Udagama-Randeniya PV. Natural human antibody responses to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. *Infect Immun* 2006; 74(1): 798-801.
- [39] Perlmann P, Troye-Blomberg M. Malaria and the immune system in humans. *Chem Immunol* 2002; 80: 229-42.
- [40] Anders RF, Crewther PE, Edwards S, Margetts

- M, Matthew ML, Pollock B, Pye D. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine* 1998; 16(2-3): 240-7.
- [41] Pizarro JC, Vulliez-Le Normand B, Chesne-Seck ML, Collins CR, Withers-Martinez C, Hackett F, Blackman MJ, Faber BW, Remarque EJ, Kocken CH, Thomas AW, Bentley GA. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science* 2005; 308(5720): 408-11.
- [42] Crewther PE, Matthew ML, Flegg RH, Anders RF. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. *Infect Immun* 1996; 64(8): 3310-7.
- [43] Cheng Q, Saul A. Sequence analysis of the apical membrane antigen I (AMA-1) of *Plasmodium vivax*. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 65(1): 183-7.
- [44] Figtree M, Pasay CJ, Slade R, Cheng Q, Cloonan N, Walker J, Saul A. *Plasmodium vivax* synonymous substitution frequencies, evolution and population structure deduced from diversity in AMA 1 and MSP 1 genes. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 108(1): 53-66.
- [45] Gunasekera AM, Wickramarachchi T, Neafsey DE, Ganguli I, Perera L, Premaratne PH, Hartl D, Handunnetti SM, Udagama-Randeniya PV, Wirth DF. Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population. *Mol Biol Evol* 2007; 24(4): 939-47.
- [46] Ord RL, Tami A, Sutherland CJ. *ama1* genes of sympatric *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* from Venezuela differ significantly in genetic diversity and recombination frequency. *PLoS One* 2008; 3(10): e3366.
- [47] Thakur A, Alam MT, Bora H, Kaur P, Sharma YD. *Plasmodium vivax*: sequence polymorphism and effect of natural selection at apical membrane antigen 1 (PvAMA1) among Indian population. *Gene* 2008; 419(1-2): 35-42.
- [48] Moon SU, Na BK, Kang JM, Kim JY, Cho SH, Park YK, Sohn WM, Lin K, Kim TS. Genetic polymorphism and effect of natural selection at domain I of apical membrane antigen-1 (AMA-1) in *Plasmodium vivax* isolates from Myanmar. *Acta Trop* 2010; 114(2): 71-5.
- [49] Dias S, Somarathna M, Manamperi A, Escalante AA, Gunasekera AM, Udagama PV. Evaluation of the genetic diversity of domain II of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (PvAMA-1) and the ensuing strain-specific immune responses in patients from Sri Lanka. *Vaccine* 2011; 29(43): 7491-504.
- [50] Zakeri S, Sadeghi H, Mehrizi AA, Djadid ND. Population genetic structure and polymorphism analysis of gene encoding apical membrane antigen-1 (AMA-1) of Iranian *Plasmodium vivax* wild isolates. *Acta Trop* 2013; 126(3): 269-79.
- [51] Rajesh V, Elamaran M, Vidya S, Gowrishankar M, Kochar D, Das A. *Plasmodium vivax*: genetic diversity of the apical membrane antigen-1 (AMA-1) in isolates from India. *Exp Parasitol* 2007; 116(3): 252-6.
- [52] Salavatifar M, Zakeri S, Hayati Roodbari N, Djadid ND. High-Level Expression, Purification and Characterization of A Recombinant *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1:

- Implication for vivax Malaria Vaccine Development. *Cell J* 2015; 17(3): 520-31.
- [53] Trivedi B, Valerio C, Slater JE. Endotoxin content of standardized allergen vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(4): 777-83.
- [54] Targett GA, Greenwood BM. Malaria vaccines and their potential role in the elimination of malaria. *Malar J* 2008; 7 Suppl 1: S10.
- [55] Genton B, Betuela I, Felger I, Al-Yaman F, Anders RF, Saul A, Rare L, Baisor M, Lorry K, Brown GV, Pye D, Irving DO, Smith TA, Beck HP, Alpers MP. A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. *J Infect Dis* 2002; 185(6): 820-7.
- [56] Xainli J, Cole-Tobian JL, Baisor M, Kastens W, Bockarie M, Yazdani SS, Chitnis CE, Adams JH, King CL. Epitope-specific humoral immunity to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun* 2003; 71(5): 2508-15.
- [57] Ferreira MU, da Silva Nunes M, Wunderlich G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11(6): 987-95.
- [58] VanBuskirk KM, Cole-Tobian JL, Baisor M, Sevova ES, Bockarie M, King CL, Adams JH. Antigenic drift in the ligand domain of *Plasmodium vivax* duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. *J Infect Dis* 2004; 190(9): 1556-62.
- [59] Polley SD, Tetteh KK, Lloyd JM, Akpogheneta OJ, Greenwood BM, Bojang KA, Conway DJ. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 is a target of allele-specific immunity and alleles are maintained by natural selection. *J Infect Dis* 2007; 195(2): 279-87.
- [60] Cole-Tobian JL, Michon P, Biasor M, Richards JS, Beeson JG, Mueller I, King CL. Strain-specific duffy binding protein antibodies correlate with protection against infection with homologous compared to heterologous *Plasmodium vivax* strains in Papua New Guinean children. *Infect Immun* 2009; 77(9): 4009-17.
- [61] McHenry AM, Barnes SJ, Ntumngia FB, King CL, Adams JH. Determination of the molecular basis for a limited dimorphism, N417K, in the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *PLoS One* 2011; 6(5): e20192.
- [62] Ntumngia FB, Adams JH. Design and immunogenicity of a novel synthetic antigen based on the ligand domain of the *Plasmodium vivax* duffy binding protein. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19(1): 30-6.
- [63] Siddiqui AA, Xainli J, Schloegel J, Carias L, Ntumngia F, Shoham M, Casey JL, Foley M, Adams JH, King CL. Fine specificity of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein binding engagement of the Duffy antigen on human erythrocytes. *Infect Immun* 2012; 80(8): 2920-8.
- [64] Birkett AJ. PATH Malaria Vaccine Initiative (MVI): perspectives on the status of malaria vaccine development. *Hum Vaccin* 2010; 6(1): 139-45.
- [65] Collins WE, Pye D, Crewther PE, Vandenberg KL, Galland GG, Sulzer AJ, Kemp DJ, Edwards SJ, Coppel RL, Sullivan JS, Morris CL, Anders RF. Protective immunity induced in squirrel



- monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*. Am J Trop Med Hyg 1994; 51(6): 711-9.
- [66] Narum DL, Ogun SA, Thomas AW, Holder AA. Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii* yoelii YM blood-stage infection. Infect Immun 2000; 68(5): 2899-906.
- [67] Bouillet LÉ, Dias MO, Dorigo NA, Moura AD, Russell B, Nosten F, Renia L, Braga EM, Gazzinelli RT, Rodrigues MM, Soares IS, Bruna-Romero O. Long-term humoral and cellular immune responses elicited by a heterologous *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 protein prime/adenovirus boost immunization protocol. Infect Immun 2011; 79(9): 3642-52.
- [68] Jeffares DC, Pain A, Berry A, Cox AV, Stalker J, Ingle CE, Thomas A, Quail MA, Siebenthall K, Uhlemann AC, Kyes S, Krishna S, Newbold C, Dermitzakis ET, Berriman M. Genome variation and evolution of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Nat Genet 2007; 39(1): 120-5.
- [69] Weedall GD, Polley SD, Conway DJ. Gene-specific signatures of elevated non-synonymous substitution rates correlate poorly across the *Plasmodium* genus. PLoS One 2008; 3(5): e2281.
- [70] Fumagalli M, Cagliani R, Pozzoli U, Riva S, Comi GP, Menozzi G, Bresolin N, Sironi M. Widespread balancing selection and pathogen-driven selection at blood group antigen genes. Genome Res 2009; 19(2): 199-212.
- [71] Thomas AW, Deans JA, Mitchell GH, Alderson T, Cohen S. The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. Mol Biochem Parasitol 1984; 13(2): 187-99.
- [72] Deans JA, Jean WC. Structural studies on a putative protective *Plasmodium knowlesi* merozoite antigen. Mol Biochem Parasitol 1987; 26(1-2): 155-66.
- [73] Deans JA, Knight AM, Jean WC, Waters AP, Cohen S, Mitchell GH. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. Parasite Immunol 1988; 10(5): 535-52.