مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۷۵/هفته‌ی سوم اردیبهشت ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۲۱

اندازه‌گیری آنتی‌بادی تولید شده علیه کپسول پلی ساکاریدی پلی ریبوزیل ریبیتول فسفات استخراج شده از هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b سویه‌ی محلی Atf2 با روش Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

شفق خادمی[۱]، فرهاد اسماعیلی[۲]، مهدی امینیان[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b (Haemophilus influenza b یا HIb) یک ارگانیزم کپسول‌دار و عامل اصلی مننژیت در کودکان در جهان می‌باشد. آنتی‌ژن کپسول پلی‌ساکاریدی HIb یک پلیمر تکراری از ریبوزیل ریبیتول فسفات و مهم‌ترین عامل ویرولانس و مسبب عفونت‌های بسیار در کودکان زیر ۵ سال به خصوص کودکان زیر ۲ سال می‌باشد. کپسول پلی‌ساکاریدی کانژوگه با یک حامل پروتئینی، در جلوگیری از چنین عفونت‌هایی بسیار مؤثر است.

روش‌ها: در این مطالعه، HIb سویه‌ی Atf2 جدا شده از یک کودک مبتلا به مننژیت، در فرمانتور حاوی محیط اصلاح شده‌ی Giolitti-Cantoni broth (GC broth) کشت داده شد. کشت حاصل، بعد از غیر فعال شدن با استفاده از روش‌های مختلف تخلیص و آنتی‌ژن پلی‌ساکاریدی (PRP یا Polyribosylribitol phosphate) تهیه شده بعد از عبور از فیلتر ۰/۲۵ میکرومتری با توکسوئید کزاز (TT یا Tetanus toxoid) به عنوان حامل پروتئینی کونژوگه گردید. محصول کونژوگه، پس از عبور از ژل سفارز CL-4B جداسازی شد و به عنوان محصول کونژوگه PRP-TT مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: مقدار PRP موجود در محصول کونژوگه ۴۰۲ میکروگرم از $۱۰^{۹}$ باکتری در هر میلی‌لیتر تخلیص شد. مقدار پروتئین و اسیدنوکلئیک موجود در PRP مطابق با مقدار توصیه شده توسط World Health Organization (WHO) زیر ۱ درصد بود. بازیافت PRP موجود در محصول کونژوگه بعد از استفاده از Sodium deoxycholate (DOC)، ۵۸ درصد بود که نشان دهنده‌ی مقدار بالای اتصال PRP و پروتئین اولیه بود. پاسخ آنتی‌بادی علیه محصول کونژوگه (PRP-TT) تهیه شده در نوزاد رت با نژاد ویستار با روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) غیر مستقیم اندازه‌گیری و بالاترین تیتر برای محصول کونژوگه نسبت به PRP استخراج شده در آزمایشگاه و PRP استاندارد خریداری شده از مؤسسه‌ی بین‌المللی استانداردهای بیولوژی در لندن (National Institute for Biological Standards and Control یا NIBSC) به دست آمد. در تیتر آنتی‌بادی به دست آمده برای PRP تخلیص شده و خریداری شده از NIBSC در غلظت برابر آنتی‌ژن و رقت ۱/۲۰۰ آنتی‌بادی شباهت زیادی دیده شد که این نشانگر خلوص PRP تهیه شده در آزمایشگاه می‌باشد.

نتیجه‌گیری: روش تخلیص PRP، کونژوگاسیون و ایمنی‌زایی محصول کونژوگه در مدل حیوانی نوزاد رت روشی مقرون به صرفه و عملی با خلوص بالا است که می‌توان از آن درتولید واکسن HIb با حجم بالا (Scale up) استفاده کرد.

واژگان کلیدی: هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b، پلی‌ریبوزیل ریبیتول فسفات، کونژوگاسیون، Enzyme-linked immunosorbent assay

ارجاع: خادمی شفق، اسماعیلی فرهاد، امینیان مهدی. **اندازه‌گیری آنتی‌بادی تولید شده علیه کپسول پلی ساکاریدی پلی ریبوزیل ریبیتول فسفات استخراج شده از هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b سویه‌ی محلی Atf2 با روش Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۷۵): ۲۴۴-۲۳۸

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران
۲- دانشیار، مسؤول طرح ساخت واکسن Hib، بخش واکسن‌های انسانی (Diphtheria، Pertussis و Tetanus یا DTP)، مؤسسه‌ی واکسن و سرم‌سازی رازی، حصارک، کرج، ایران
۳- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: فرهاد اسماعیلی
Email: fesmaily@yahoo.com

مقدمه

هموفیلوس آنفلوانزا (HI یا Haemophilus influenza)، یک باکتری گرم منفی و کوکو باسیل با خاصیت پلی‌مورفیسم (چند شکلی) است (۲-۱) که گاهی به صورت باسیل‌های بلند در کشت‌های قدیمی ظاهر می‌گردد و برای رشد، نیاز به ۲ عامل x (Hemin) و v (Nicotinamide adenine dinucleotide یا NAD) دارد (۴-۳). برخی گونه‌های این باکتری‌ها دارای کپسول هستند که بر اساس نوع کپسولشان به ۶ سروتیپ a تا f تقسیم می‌شوند (۵). این در حالی است که اکثر سویه‌های مهاجم و بیماری‌زای جدا شده از بیماران، دارای کپسول تیپ b هستند که جنس کپسول پلی‌ساکاریدی آن از قند ۵ کربنه‌ی پنتوز می‌باشد (۶) و از واحدهای ریبوریل ریبیتول فسفات تشکیل شده است. این باکتری، یکی از شایع‌ترین عوامل مننژیت و پنومونی در کودکان ۵-۲ سال در جهان است (۷).

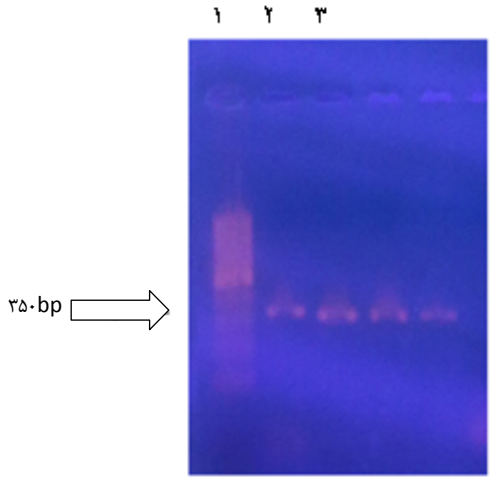
در سال ۱۹۷۰، واکسیناسیون با کپسول پلی‌ساکاریدی هموفیلوس آنفلوانزا باعث پیش‌گیری مننژیت در کودکان بالای ۲ سال شد، اما این واکسن در نوزادان زیر ۲ سال کارایی ندارد؛ چرا که Polyribosylribitol phosphate (PRP) خالص در این سنین، عیار کمی از آنتی‌بادی را القا می‌کند (۸). در اوایل دهه‌ی ۸۰، محققان موفق به تولید واکسن کونژوگه علیه HIb شدند. در این واکسن‌ها، PRP به صورت کونژوگه به یک پروتئین حامل متصل می‌شود (۱۰-۹) که قابلیت تحریک سلول‌های ایمنی را دارد و سلول‌های T غیر وابسته را به سلول‌های T وابسته تبدیل می‌کند (۸).

پس از ساخت واکسن در سال ۱۹۸۸، امروزه در ایالات متحده‌ی امریکا بروز مننژیت توسط HIb در کودکان زیر ۵ سال به کمتر از ۲/۵ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر کاهش یافت.

واکسیناسیون علیه HIb در سازمان بهداشت جهانی (WHO یا World Health Organization) شامل برنامه‌ی ایمن‌سازی به عنوان یک واکسن چهار ظرفیتی و یا پنج ظرفیتی (کزاز، سیاه‌سرفه، دیفتری، هپاتیت و HIb) گسترش یافته است (۹). از طرف دیگر، تولید واکسن کونژوگه به علت مراحل مختلف فرایند تولید نظیر کشت باکتری برای تولید PRP، خالص‌سازی پروتئین، کونژوگاسیون بین پروتئین و PRP، جداسازی محصول کونژوگه از PRP و پروتئین آزاد و نیز آزمایش‌های کنترلی، هزینه‌ی بالایی دارد. بنا بر این، هر گونه بهبود در یکی از این مراحل، به افزایش نسبت سود به هزینه کمک خواهد کرد. یکی از راه‌های افزایش تولید واکسن HIb، بهبود شرایط رشد و انتخاب بهترین محیط کشت برای تولید بازده بالا و همچنین، فرایند تخلیص و کونژوگاسیون با استفاده از امکانات موجود است.

روش‌ها

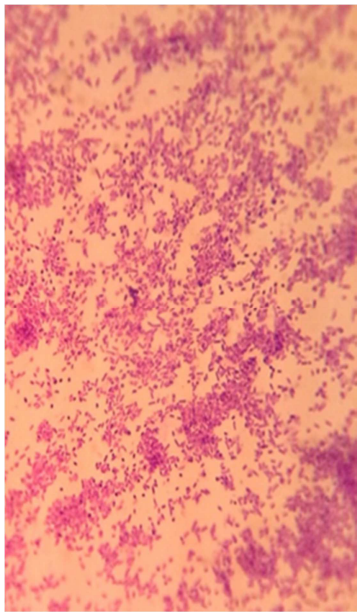
سویه‌ی باکتریایی و شرایط نگهداری: HIb سویه‌ی Atf2 که از یک کودک مبتلا به مننژیت جدا و در آزمایشگاه تحقیقاتی HIb در مؤسسه‌ی رازی با استفاده از روش‌های سرولوژیک و استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی HIb، روش‌های بیوشمیایی و باکتریولوژیک که در مطالعات گذشته جدا و شناسایی گردیده بود در این مطالعه با استفاده از روش Polymerase chain reaction (PCR) و استفاده از ۲ پرایمر یکی برای شناسایی هموفیلوس آنفلوانزا و دیگری برای اطمینان از تیپ b تأیید گردید (شکل ۱). برای نگهداری طولانی مدت باکتری، از ویال‌های کرایوبنک یا گلیسرول ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده گردید.



شکل ۱. نتایج Polymerase chain reaction (PCR) جهت جداسازی سویه‌های هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b: (۱) Lader، (۲) سویه‌ی Atf2، (۳) سویه‌ی American type culture collection (ATCC)، باند ۳۵۰ bp بین نمونه‌های Haemophilus influenza b (HIb) و نمونه‌ی Lader باند مشترک است.

کشت فرمانتوری باکتری و تخلیص PRP: برای آماده‌سازی محیط کشت اولیه، دانه‌ای از ویال کرایوبنک برداشته شد و به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط Giolitti-Cantoni broth (GC broth) (مواد تشکیل دهنده از شرکت Merck) حاوی ۱۰ گرم در هر میلی‌لیتر عامل x (Hemin) (Becton, Dickinson, USA) و ۰/۱۵ گرم در میلی‌لیتر عامل v (NAD) (Merck, Germany)، اضافه شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH = ۷، CO_2 ۵ درصد و Shake برای ۸ ساعت قرار داده شد. محیط کشت اولیه پس از بررسی از نظر خلوص (شکل ۲)، به فرمانتور با ۱۰ لیتر محیط

broth GC حاوی ۱۰ گرم در میلی‌لیتر گلوکز اضافه شد (شکل ۳). سوسپانسیون کشت پس از ۲۴ ساعت از فرمانتور خارج شد و پس از بررسی آزمایش‌های کنترلی و خلوص آن در دور ۶۰۰۰ xg در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.



شکل ۲. رنگ‌آمیزی گرم هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b سویه‌ی Atf_2

شکل ۳. کشت هموفیلوس آنفلوانزا در فرمانتور

وزن پلت تر (Wet weight) که شامل ۵۰ گرم سلول باکتری است، در مجاورت ستاولون ۱ درصد (N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammonium bromide) (Merck, Germany) حاوی NaCl ۰/۵ مولار، قرار داده شد و به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به شدت تکان داده شد. سوسپانسیون حاصل، با دور ۴۰۰۰ xg به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل جمع‌آوری گردید و در معرض اتانول ۲۵ درصد حجمی حاوی استات سدیم برای یک شب در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، با دور ۱۶۰۰۰ xg به مدت ۴۰ دقیقه سانتریفیوژ و همین روند با اتانول ۷۵ درصد و سدیم استات تکرار شد.

رسوب در ۶ میلی‌لیتر Phosphate buffered saline (PBS) حل شد و آنزیم‌های DNase، RNAase و پروتئاز (Fermentas, EU) به آن اضافه شد و یک شب در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد.

برای از بین بردن سایر اسیدهای چرب و مواد زاید، به محلول حاصل، فنل اشباع به نسبت ۱ به ۵ اضافه و سپس در دور ۶۰۰۰ xg به مدت یک ساعت سانتریفیوژ شد و بخش میانی جدا شده و در برابر کلرید کلسیم دیالیز گردید. محصول نهایی، از فیلتر ۰/۴۵عبور داده شد و PRP حاصل، در لوله‌های اپندورف ریخته و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. آنتی‌ژن کپسولی با روش بیال با استفاده از D- ریبوز به عنوان استاندارد مطابق آن چه در جدول ۱ آمده است، اندازه‌گیری شد.

به طور خلاصه، در این روش از ریبوز استاندارد و نمونه‌های آزمایش، رقت‌های مختلف تهیه و از معرف اورسینول برای شناسایی ریبوز استفاده گردید. سپس، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (LKB, France) خوانده شد. ناخالصی پروتئین با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد و معرف فولین برای شناسایی پروتئین به روش Lowry و همچنین، اسید نوکلئیک اضافی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. جدول ۲، روش Lowry با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان رقت استاندارد را نشان می‌دهد.

فرایند کونژوگاسیون: PRP تخلیص شده با سیانوژن برماید (CNBr یا Cyanogen bromide) (Merck, Germany) و توکسوئید کزاز (TT یا Tetanus toxoid) به عنوان حامل پروتئینی که از بخش Diphtheria، Pertussis و Tetanus (DTP) مؤسسه‌ی رازی تهیه شد، با Ethyl dimethyl aminopropyl carbodimide (EDAC) (Merck, Germany) فعال شدند و سپس، از آدیپک اسید دی هیدرازاید (ADH یا Adipic acid dihydrazide) (Merck, Germany) به عنوان رابط برای اتصال و کونژوگه کردن پروتئین و PRP استفاده شد. سوسپانسیون حاصل در دور ۱۲۰۰۰ xg به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاوی محصول کونژوگه که متشکل از PRP-TT بود، جمع‌آوری گردید.

کروماتوگرافی: محصول کونژوگه‌ی حاصل، در ستون شیشه‌ای

با ارتفاع ۹۰ سانتی‌متر و قطر ۱/۵ سانتی‌متر که حاوی ژل سفارز CL-4B (Sigma, US) بود، ریخته شد و از NaCl ۰/۲ مولار با pH = ۸ به عنوان بافر شستشو دهنده استفاده گردید. آن گاه، جذب نوری محلول خارج شده از ستون در ۲۶۰ نانومتر بررسی شد. از دی‌اکسی کولات سدیم (DOC یا Sodium deoxycholate) برای اندازه‌گیری میزان PRP آزاد از محصول کونژوگه مورد استفاده قرار گرفت. به طور خلاصه، DOC به محلول حاصل از ستون کروماتوگرافی اضافه شد و در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد و پس از افزودن HCl ۱ مولار در دور ۵۰۰۰ xg به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفیوژ و پلت حاصل جمع‌آوری و میزان PRP با استفاده از روش بیال بررسی شد.

آماده‌سازی سرم برای استفاده در ELISA: هفت نوزاد رت نژاد ویستار (Vistar) بین ۵-۴ روز با وزن ۸/۴-۸ گرم ۴ بار به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از محصول کونژوگه (PRP-TT) متشکل از ۱۱۵ میکروگرم PRP با فاصله‌ی ۵ روز در ناحیه‌ی صفاق تزریق شد و یک دز یادآور یک هفته بعد تزریق گردید. ۱۰ روز بعد از آخرین تزریق، از قلب رت خون‌گیری انجام و سرم خون جدا شد.

روش ELISA: آنتی‌بادی علیه محصول کونژوگه (PRP-TT) تهیه شده در نوزادان رت به روش ELISA غیر مستقیم اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، PRP-TT، PRP استاندارد و PRP تخلیص شده در این آزمایشگاه به عنوان آنتی‌ژن با غلظت ۳۶ میکرولیتر در هر ول از پلیت ELISA کوت شد، به مدت ۳ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و برای یک شب در یخچال نگهداری گردید. پس از خارج کردن از یخچال با محلول PBS-tween20 ۴ مرتبه شسته و سپس چاهک‌ها با شیر خشک ۰/۱ درصد بلاک و برای ۹۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ۵ مرتبه شستشوی چاهک‌ها با محلول PBS-tween20، سرم تهیه شده در نوزاد رت با رقت ۱ به ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ به عنوان آنتی‌بادی اول به چاهک‌ها اضافه و برای مدت ۹۰ دقیقه انکوبه گردید. پس از ۴ مرتبه شستشوی مجدد، چاهک‌ها با آنتی‌رت بزی کونژوگه با پراکسیداز که ۱/۱۰۰۰۰ با PBS ۰/۰۱ مولار رقیق شده بود، به عنوان آنتی‌بادی ثانویه پوشش داده شدند. از اتانول- TMB (Tetramethylbenzidine) به عنوان سوبسترا استفاده و واکنش با اسید سولفوریک متوقف شد. نتایج در ۴۵۰ نانومتر بررسی شد.

یافته‌ها

از ۱۰ لیتر HIb در GC broth اصلاح شده، ۵۰ گرم پلت تر به دست آمد. غلظت پلی‌ساکارید با استفاده از روش بیال و با استفاده از ریبوز (Sigma, US) به عنوان استاندارد تعیین شد (جدول ۱). غلظت PRP با استفاده از یک عامل تبدیل که در آن ۱ میلی‌گرم از ریبوز مطابقت دارد، با ۲/۵۵ میلی‌گرم پلی‌ریبوزیل ریبیتول فسفات برآورد شد. این عامل تبدیل، بر اساس فرمول ساختاری در پلی‌ریبوزیل ریبیتول فسفات گزارش شده توسط Brooks و همکاران، استوار است (۱).

جدول ۱. جدول استانداردهای ریبوز در روش بیال برای اندازه‌گیری Polyribosylribitol phosphate (PRP) تخلیص شده در جذب نوری ۶۷۰ نانومتر

استانداردها	جذب نوری	طول موج (nm)	غلظت (µl)
۱	۰	۰	۰
۲	۰/۰۹۵	۲۵	۵
۳	۰/۱۹۸	۵۰	۱۰
۴	۰/۳۶۸	۱۰۰	۲۰
۵	۰/۷۱۸	۲۰۰	۴۰
۶	۰/۹۴۰	۳۰۰	۶۰

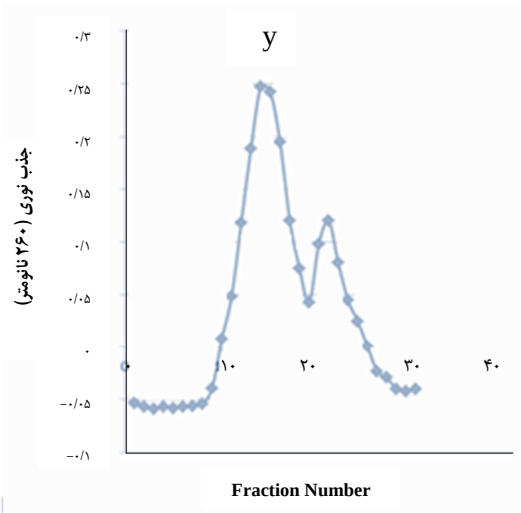
بر اساس این اندازه‌گیری، مقدار PRP اندازه‌گیری شده به روش بیال، ۴۰۲ میکروگرم در میلی‌لیتر (معادل ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PRP) و مقدار پروتئین و اسید نوکلئیک آن زیر ۱ درصد بود که مطابق با مقدار توصیه شده توسط سازمان بهداشت جهانی می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲. جدول استانداردهای آلبومین سرم گاوی برای بررسی پروتئین در ۷۵۰ نانومتر به روش Lowry

استانداردها	Blank	$S_{۱۰}$	$S_{۲۰}$	$S_{۴۰}$	$S_{۸۰}$	$S_{۱۰۰}$
آب مقطر (µl)	۱۰۰	۹۰	۸۰	۶۰	۲۰	۰
BSA (µl)	۰	۱۰	۲۰	۴۰	۸۰	۱۰۰
آب مقطر (µl)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
محلول D (cc)	۲	۲	۲	۲	۲	۲
معرف فولین (µl)	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰

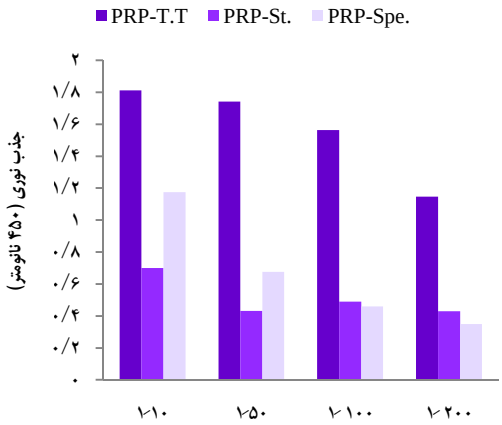
BSA: Bovine serum albumin

در این مطالعه، جداسازی محصول کونژوگه از غیر کونژوگه با استفاده از ستون کروماتوگرافی ژل سفارز CL-4B که یک نوع ژل فیلتراسیون است و بر اساس وزن مولکولی انجام شد. در سیستم ژل سفارز CL-4B مولکول‌های درشت‌تر، زودتر خارج می‌شوند و تنها پروتئین‌ها در این سیستم جذب دارند. از این رو، PRP که ساختار پروتئینی ندارد، فاقد جذب در Ultraviolet (UV) است؛ بنا بر این، پیک اول و بلندتر نمودار شدت جذب را به خود اختصاص می‌دهد و پیک بعدی که شدت جذب کمتری را نشان می‌دهد، نمایانگر پروتئین غیر کونژوگه مطابق با شکل ۴ می‌باشد.



شکل ۴. نمودار جداسازی محصول کونژوگه در ستون کروماتوگرافی سفارز CL-4B، پس از بررسی جذب نوری آن‌ها در ۲۶۰ نانومتر. پیک اول محصول کونژوگه و پیک دوم پروتئین‌هایی را که در واکنش شرکت نکردند، نشان می‌دهد.

فراکسیون‌های ۱۹-۱۱ جمع‌آوری شده به عنوان محصول کونژوگه مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر محصول کونژوگه، مشتقاتی از جمله پروتئین‌های آزاد و PRP غیر کونژوگه (Derivatives') وجود دارد. مقدار PRP کونژوگه شده با TT پس از استفاده از DOC به عنوان نشانگر جدا کننده‌ی محصول کونژوگه از سایر مشتقات ۵۸ درصد برآورد شد (Recovery). در نتایج آزمایش ELISA غیر مستقیم، غلظت آنتی‌ژن‌های مختلف ۳۶ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر موجود در هر ول بود و جذب نوری آنتی‌بادی به دست آمده از سرم نوزاد رت با توجه به شکل ۵، برای PRP استاندارد ۰/۷ و برای PRP تخلیص شده ۰/۸ بود. همچنین، تیتر آنتی‌بادی برای محصول کونژوگه ۱/۸ به دست آمد.



شکل ۵. بررسی ایمونولوژیک آنتی‌ژن‌های محصول کونژوگه (PRP-TT یا Polyribosylribitol phosphate-Tetanus toxoid)، PRP استاندارد (PRP-St یا PRP-standard) و PRP تخلیص شده (PRP-Spe یا PRP-separated) با نمودار ستونی Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). در غلظت‌های برابر از آنتی‌ژن و رقت آنتی‌بادی (۱/۲۰۰)، تیتر آنتی‌بادی علیه PRP استاندارد و PRP تخلیص شده شباهت دارند که حاکی از خلوص محصول تخلیص شده است.

بحث

در این مطالعه، هدف تخلیص PRP با خلوص بالا مقرون به صرفه بودن آن از نظر اقتصادی و همچنین، اطمینان از فرایند کونژوگاسیون پایدار و بررسی ایمنی‌زایی آن در نوزاد رت بود. در مطالعات انجام شده، برای به دلیل بازده بالای محیط اصلاح شده‌ی GC broth در مقایسه با محیط‌های دیگر از جمله Brain-heart infusion (BHI)، Tryptic soy broth (TSB) و لوینتال، از این محیط استفاده گردید.

همچنین، بین سویه‌های جدا شده از کودکان مبتلا به منتژیت، از سویه‌ی Atf2 بالاترین مقدار کپسول از کشت فرمانتوری به دست آمد (۱۲-۱۱). میزان PRP تخلیص شده و مقدار بازیافت آن در مقایسه با سایر پژوهش ها، مقدار مشابهی بوده است که خود دلیلی بر دستیابی این تحقیق به فن آوری تخلیص PRP از باکتری هموفیلوس آنفلوانزا می‌باشد (۱۳). واکسن‌های اولیه علیه HIb که تنها حاوی PRP بود، به دلیل ماهیت فیزیکی و شیمیایی خود قادر به تحریک کمتر ایمنی سلولی و لنفوسیت T بود (۱۴). بنا بر این، توانایی ایجاد مصونیت در مقابل منتژیت هموفیلوس نوزادان را نداشت. کانژوگاسیون PRP مربوط به HIb با پروتئین کزاز، به عنوان حامل پروتئینی، ایمنی‌زایی و تولید آنتی‌بادی اختصاصی در بدن میزبان را افزایش می‌دهد. در فرایند کانژوگاسیون، بعد از فعال نمودن کپسول پلی‌ساکاریدی و توکسوئید کزاز،

از رابط ADH به منظور اتصال PRP و پروتئین حامل استفاده شد.

طبق تحقیقات انجام شده، اتصال ADH به پلی‌ساکارید، پیوند پایدارتری نسب به اتصال به پروتئین ایجاد می‌کند (۱۵). در این تحقیق، ADH بعد از فعال شدن PRP به آن متصل و سپس با پروتئین کونژوگه گردید.

در این مطالعه، اثر ایمنی‌زایی واکسن کونژوگه‌ی آزمایشی هموفیلوس آنفلوانزا بررسی شد و همچنین، نتایج ELISA همان‌طور که در شکل ۵ دیده می‌شود، در بالاترین رقت از آنتی‌بادی در غلظت برابر برای آنتی‌ژن‌های مختلف شباهت معنی‌داری بین PRP استاندارد و PRP تهیه شده از سویه‌ی محلی Atf2 نشان داد که این شباهت در مقدار تیتر آنتی‌بادی، حاکی از شباهت خلوص بین PRP استاندارد و PRP استخراج شده در این آزمایشگاه است.

به دلیل کونژوگه بودن PRP با پروتئین کزاز، که قابلیت تحریک بیشتر سلول‌های ایمنی را دارد، تیتر آنتی‌بادی بالاتری نسبت به PRP استاندارد (تهیه شده از NIBSC) و PRP استخراج شده در آزمایشگاه رازی در مقایسه‌ی جذب نوری به دست آمده از پلیت ELISA به وسیله‌ی ELISA reader را نشان می‌دهد (۱۶). در نهایت، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که واکسن کونژوگه‌ی تولید شده که توانایی تحریک سلول‌های ایمنی را دارد، امکان استفاده از روش‌های پیش‌گفته را برای تولید واکسن آزمایشی HIb در مقیاس بزرگ‌تر مهیا می‌کند. این تحقیق، در راستای اهداف بلند پایه‌ی WHO مبنی بر کاهش میزان شیوع مننژیت باکتریال در جهان انجام شد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح شماره‌ی ۲۱۸۱۸۹۰۰۴۱ مصوب مؤسسه‌ی واکسن و سرم‌سازی رازی کرج می‌باشد. بدین وسیله، نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از مدیریت و پرسنل محترم این مؤسسه جهت تأمین منابع مالی و امکانات مورد نیاز این پژوهش اعلام می‌دارند.

References

1. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology. 24th ed. New York, NY: McGraw-Hill Medical; 2007.
2. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 6th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2005.
3. Hilleman MR, Tai JY, Tolman RL, Vella PP. Coupled H. influenzae type b vaccine [US Patent 4,459,286]. 1984.
4. Marburg S, Kniskern PJ, Tolman RL. Covalently-modified bacterial polysaccharides, stable covalent conjugates of such polysaccharides and immunogenic proteins with big eneric spacers and methods of preparing such polysaccharides and conjugates and of confirming covalency. [US Patent: Registration No. 4 882 317]. 1989.
5. Davey PG, Cruikshank JK, McManus IC, Mahood B, Snow MH, Geddes AM. Bacterial meningitis--ten years experience. J Hyg (Lond) 1982; 88(3): 383-401.
6. Barbour ML, Mayon-White RT, Coles C, Crook DW, Moxon ER. The impact of conjugate vaccine on carriage of Haemophilus influenzae type b. J Infect Dis 1995; 171(1): 93-8.
7. Kelly DF, Moxon ER, Pollard AJ. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. Immunology 2004; 113(2): 163-74.
8. Granoff DM, Cates KL. Haemophilus influenzae type b polysaccharide vaccines. J Pediatr 1985; 107(3): 330-6.
9. Eskola J, Ward J, Dagan R, Goldblatt D, Zepp F, Siegrist CA. Combined vaccination of Haemophilus influenzae type b conjugate and diphtheria-tetanus-pertussis containing acellular pertussis. Lancet 1999; 354(9195): 2063-8.
10. Mawas F, Bolgiano B, Rigsby P, Crane D, Belgrave D, Corbel MJ. Evaluation of the saccharide content and stability of the first WHO International Standard for Haemophilus influenzae b capsular polysaccharide. Biologicals 2007; 35(4): 235-45.
11. Afshar M, Esmaily F, Aminian M, Asli E, Haadi E, Torabi M, et al. A study on Haemophilus influenzae type b growth rate and capsule production in different media. Archves of Razi Institute 2012; 67(1): 7-12.
12. Esmaily F, Aminian M, Tavangar AR, Hadi A. Comparison of bacterial biomass and PRP production between different isolates of Haemophilus influenza type b (Hib) under different culture conditions. Archives of Razi Institute 2011; 66(1): 43-9.
13. Takagi M, Lima RB, Albani SM, Zangirolami TC, Tanizaki MM, Cabrera-Crespo J. Purification of capsular polysaccharide produced by Haemophilus influenzae type b through a simple, efficient and suitable method for scale-up. J Ind Microbiol Biotechnol 2008; 35(11): 1217-22.
14. Peltola H. Worldwide Haemophilus influenzae type b disease at the beginning of the 21st century: Global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clin Microbiol Rev 2000; 13(2): 302-17.
15. Chu C, Schneerson R, Robbins JB, Rastogi SC. Further studies on the immunogenicity of Haemophilus influenzae type b and pneumococcal type 6A polysaccharide-protein conjugates. Infect Immun 1983; 40(1): 245-56.
16. Madore DV, Anderson P, Baxter BD, Carlone GM, Edwards KM, Hamilton RG, et al. Interlaboratory study evaluating quantitation of antibodies to Haemophilus influenzae type b polysaccharide by enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Diagn Lab Immunol 1996; 3(1): 84-8.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 34, No. 375, 3rd Week, May 2016

Received: 11.12.2015

Accepted: 11.03.2016

Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) for Measurement of Antibody against Polyribosylribitol Phosphate Polysaccharide Capsule Extracted from Haemophilus Influenza Type-B Strain-Atf2

Shafagh Khademi[1], Farhad Esmaily[2], Mehdi Aminian[3]

Original Article

Abstract

Background: Haemophilus influenzae type b (Hib) is an encapsulated bacterium cause meningitis in infants worldwide. The capsular Polysaccharide antigen of this organism is a polymer made of ribosylribitol phosphate and is the most important virulence factor and the causative agent of many infections in children under 2 up to 5 years of age. The capsular Polysaccharide conjugated to a carrier protein is effective in the prevention of such infections.

Methods: In this study Hib strain Atf_2which was isolated and identified from a child with meningitis (previous studies), was cultured in a bioreactor (13-L Bio flo 2000(New Bruns Wick Scientific Co. USA)) containing Giolitti-Cantoni broth (GC broth). The culture was inactivated and polyribosylribitol phosphate (PRP) was extracted by various methods from the bacterial pellet and ultimately filtered through 0.25 µm filter. The filtrate was conjugated with tetanus toxoid (TT) as protein carrier and injected in to sepharos CL-4B gel. Fractions between 11 to 19 was pooled and used as a conjugate product (PRP-TT).

Findings: The amount of 402 µg PRP was extracted from 10^9cfu/ml of bacteria. The amount of protein and nucleic acid was under 1% which is the amount recommended by World Health Organization (WHO) .The PRP recovery after conjugation which was measured by sodium deoxycholate (DOC) was 58%. The antibody response against PRP-TT raised in infant rats showed the highest titer against itself compare to extracted PRP in our own lab and the PRP purchased from National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). The similarity between standard PRP and extracted PRP, was shown by antibody titer in 1/200 dilution.

Conclusion: The amount of 402 µg PRP was extracted from 10^9cfu/ml of bacteria. The amount of protein and nucleic acid was under 1% which is the amount recommended by World Health Organization (WHO). The PRP recovery after conjugation which was measured by DOC was 58%. The antibody response against PRP-TT raised in infant rats showed the highest titer against itself compare to extracted PRP in our own lab and the PRP purchased from NIBSC. The similarity between standard PRP and extracted PRP, was shown by antibody titer in 1/200 dilution.

Keywords: Haemophilus influenza type b, Polyribosylribitol phosphate, Conjugation, Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA)

Citation: Khademi S, Esmaily F, Aminian M. **Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) for Measurement of Antibody against Polyribosylribitol Phosphate Polysaccharide Capsule Extracted from Haemophilus Influenza Type-B Strain-Atf2.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(375): 238-44

1- Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
2- Associate Professor, Director of Hib Project, Department of Human Vaccines, Razi institute of Vaccine and Serum, Hessarak, Karaj, Iran
3- Assistant Professor, Department of Biochemistery, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Farhad Esmaily, Email: fesmaily@yahoo.com