مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۴۳/هفته سوم شهریور ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۳

بهینه‌سازی شرایط جذب توکسوئید دیفتری بر روی ژل فسفات آلومینیوم و ارتباط آن با توانمندی آنتی‌ژن

مینا پهلوانی[۱]، دکتر حسین ذوالفقاریان[۲]، دکتر مجید تبیانیان[۳]، دکتر حسین راثی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در اواسط دهه‌ی ۱۹۴۰، ریشه‌کن کردن بیماری دیفتری توسط ترکیب واکسن توکسوئید دیفتری (سم غیر فعال) با واکسن کزاز و سیاه سرفه (واکسن DTP یا Diphtheria, Tetanus, Pertussis)، با موفقیت در سراسر جهان انجام شده است. هدف از این مطالعه، بهینه‌سازی شرایط جذب توکسوئید دیفتری در ژل فسفات آلومینیوم برای بهبود میزان جذب و افزایش اثربخشی واکسن بود.

روش‌ها: در این مطالعه، پارامترهای مختلف از جمله pH اولیه، دما و pH نهایی، که در میزان جذب توکسوئید دیفتری در ژل فسفات آلومینیوم مؤثر هستند، در مقیاس آزمایشگاهی و داخل بدن مورد مطالعه قرار گرفتند. به این منظور، توکسوئید دیفتری خالص شده برای تهیه و ساخت واکسن مورد استفاده قرار گرفت. توکسوئید دیفتری در هیدروکسید آلومینیوم با pH مختلف جذب اعم از ۶/۰، ۵/۸، ۵/۶، ۵/۴، ۵/۲ و ۵/۰، در معرض درجه حرارت‌های مختلف (شامل ۳۷، ۲۴ و ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) تنظیم شد و به pH نهایی ۶/۸، ۶/۶ و ۶/۴ رسید.

یافته‌ها: فرمولاسیون مؤثر در جذب، pH برابر ۵/۸، در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با pH نهایی ۶/۶ بود.

نتیجه‌گیری: سطح آنتی‌بادی در حیوانات ایمن شده توسط واکسن، به طور قابل توجهی بالا رفت. به نظر می‌رسد که با واکسن جدید فرموله شده و با بهینه‌سازی شرایط، میزان توکسوئید و سطح آنتی‌بادی در حیوانات واکسینه شده به طور قابل توجهی افزایش یافت.

واژگان کلیدی: دیفتری، واکسن، ادجوانت، جذب، pH

ارجاع: پهلوانی مینا، ذوالفقاریان حسین، تبیانیان مجید، راثی حسین. **بهینه‌سازی شرایط جذب توکسوئید دیفتری بر روی ژل فسفات آلومینیوم و ارتباط آن با توانمندی آنتی‌ژن.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۳): ۱۱۳۶-۱۱۲۸

مقدمه

دیفتری یک بیماری حاد مسری، اغلب منجر به مرگ و کشنده می‌باشد. این بیماری، ناشی از باکتری کورینه باکتریوم دیفتری گرم مثبت است. مهم‌ترین ویژگی دیفتری، فارنژیت غشایی (اغلب به عنوان یک غشای کاذب نامیده می‌شود) به همراه تب، بزرگ شدن غدد لنفاوی قدامی گردن و ادم بافت نرم به شکل یک «گاو نر گردن بزرگ» بارز می‌گردد (۱).

این بیماری توسط یک اگزوتوکسین ۵۸ کیلو دالتون به نام سم دیفتری (DT یا Diphtheria toxin)

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران
۲- دانشیار، بخش واکسن و آنتی‌سرم انسانی، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
۳- استادیار، بخش واکسن و آنتی‌سرم انسانی، مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
۴- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حسین ذوالفقاریان
Email: zolfagharianh@yahoo.com

پیشرفت می‌کند، که سنتز پروتئین را مهار و اثر سیتوتوکسیک در اعضای مختلف، مانند قلب، کلیه و سیستم عصبی را به وجود می‌آورد (۱).

در اواسط دهه‌ی ۱۹۴۰، ریشه‌کن کردن بیماری دیفتری توسط ترکیب واکسن توکسوئید دیفتری (سم غیر فعال) با واکسن کزاز و سیاه سرفه (واکسن DTP یا Diphtheria, Tetanus, Pertussis)، با موفقیت در سراسر جهان انجام شده است (۲).

واکسن DTP، بیش از دیگر واکسن‌ها، شامل ادجوانت برای افزایش اثربخشی واکسن می‌باشد. ادجوانت‌ها، از طریق مکانیزم‌های مختلف عمل می‌کنند. یکی از این مکانیسم‌ها، جلوگیری از گسترش آنتی‌ژن آزاد و ارایه‌ی آن در یک مکان خارج سلولی یا داخل سلول می‌باشد. مهم‌ترین ادجوانت مورد استفاده در واکسن‌های انسانی، ترکیبات آلومینیوم (فسفات و هیدروکسید) هستند. در واقع، همه‌ی ادجوانت‌ها، منجر به تحریک سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن و افزایش ایمنی‌زایی در بدن می‌گردند (۵-۳).

برخی از ادجوانت‌ها، به عنوان یک نسخه (سیستم تحویل) که منجر به حفظ سیستم ایمنی از آسیب می‌گردد، عمل می‌کنند. برخی از ادجوانت‌ها به ارایه و تحویل آنتی‌ژن به هدف و افزایش میزان جذب در سلول‌های ارایه دهنده‌ی آنتی‌ژن کمک می‌کنند.

برخی از ادجوانت‌ها، یک نقش سلول‌های ارایه دهنده‌ی آنتی‌ژن (APC یا Antigen-presenting cell) دارند که می‌توانند به طور مستقیم، هم‌زمان آنتی‌ژن را ارایه دهند و انواع دیگر از ادجوانت‌ها با اثر بر روی سلول‌های سیستم ایمنی بدن و سایتوکاین‌ها، منجر به ارایه و عرضه‌ی غیر مستقیم آنتی‌ژن می‌گردند (۷-۶).

از میان تمامی ادجوانت‌ها، ادجوانت آلومینیوم به عنوان ذرات نمک آلومینیوم، مانند $ALPO_4$ (Aluminium phosphate)، $Al(OH)_3$ (Aluminium hydroxide)، در چندین واکسن انسانی در ایالات متحده‌ی آمریکا، در سال ۱۹۲۰ استفاده شد (۹-۸).

مکانیسم ادجوانت آلوم که شامل مکمل فعال، ائوزینوفیل‌ها و ماکروفاژها هستند، منجر به افزایش سطح جذب آنتی‌ژن توسط سلول‌های ارایه دهنده‌ی آنتی‌ژن می‌گردد. همچنین، ممکن است توسط به دام انداختن آنتی‌ژن محلول، تعامل بین آنتی‌ژن و سیستم ایمنی بدن افزایش یابد. در نهایت، بر ساخت Th۲ (T helper۲) از سیتوکاین، IL۴ (Interleukin۴) و IL۵ (Interleukin۵)، تحریک لنفوسیت B و ترشح ایمونوگلوبولین به خصوص افزایش IgG (Immunoglobulin G) اثر می‌گذارد (۱۳-۱۰).

بنابراین، جذب آنتی‌ژن در آلوم، نقش مهمی برای تحریک بهتر در پاسخ‌های ایمنی دارد. بر اساس تحقیقات قبلی، افزایش جذب توکسوئید دیفتری در ژل فسفات آلومینیوم، می‌تواند پاسخ ایمنی را افزایش دهد و منجر به ترشح طولانی مدت آنتی‌بادی خاطره گردد (۱۵-۱۴).

هدف از این مطالعه، بررسی عوامل مختلف و متغیر، مانند pH جذب اولیه، دما و pH نهایی، در میزان جذب توکسوئید دیفتری روی ژل آلومینیوم فسفات بود. نتایج به دست آمده، می‌تواند برای بهینه‌سازی فرمولاسیون واکسن و بهبود اثربخشی توکسوئید دیفتری و ادجوانت استفاده گردد و نقش بسیار مهم داشته باشد.

روش‌ها

توکسوئید دیفتری (۷۳۰۰ میلی‌لیتر/LF)، آنتی‌توکسین (۱۰۰ واحد) و آنتی‌ژن از بخش DTP مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی از کرج (RVSRI یا Razi Vaccine and Serum Research Institute) دریافت گردید.

خوکچه‌ی هندی سالم ماده (۶-۴ هفته، ۳۵۰-۲۵۰ گرم) و خرگوش ماده (۱۶-۱۲ هفته، ۱/۵-۱ کیلوگرم)، از بخش حیوانات اهلی مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج (RVSRI) خریداری شد.

واکسن نمونه با استفاده از ۵/۵ میلی‌لیتر آنتی‌ژن دیفتری، ۵۵ میلی‌لیتر $AlCl_3$ و ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد. سپس، ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات (PBS یا Phosphate-buffered saline) به این مخلوط اضافه شد. برای آماده‌سازی واکسن با pH جذب مختلف، NaOH به منظور ثابت کردن مقادیر pH (شامل ۶، ۵/۸، ۵/۶، ۵/۴، ۵/۲ و ۵) مورد استفاده قرار گرفت. کل واکسن نمونه در دماهای مختلف (شامل ۳۷، ۲۴ و ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) انکوبه شدند و یک شب به مدت ۱۸ ساعت روی دستگاه شیکر، شیک گردیدند.

هر واکسن نمونه، با درجه‌ی حرارت خاص خود، به سه قسمت با حجم یکسان و با pH نهایی خاص (۶/۸، ۶/۶ و ۶/۴)، تقسیم شد.

برای اندازه‌گیری میزان آنتی‌ژن جذب شده در هر نمونه، ژل آلوم با سیترات سدیم تجزیه شد و غلظت پروتئین (آنتی‌ژن مورد اندازه‌گیری) به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت.

همه‌ی نمونه بر اساس آزمایش فولیکولاسیون به منظور تعیین بهترین شرایط برای جذب آنتی‌ژن، در محلول بافر فسفات آلومینیوم مورد بررسی قرار گرفت. سپس فرمول واکسن بر اساس روش پیش‌گفته تهیه شد. واکسن تهیه شده در داخل بدن و در شرایط آزمایشگاهی مورد آزمایش قرار گرفت (۷).

انجام آزمایش در شرایط آزمایشگاهی

انتشار واکسن دیفتری در ژل آلومینیوم فسفات از طریق آزمایش فولیکولاسیون در شرایط آزمایشگاهی تعیین شد. در این فرایند، ۳۰ میلی‌لیتر واکسن دیفتری به چند لوله‌ی آزمایش تقسیم شد. سپس، ۱ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات (PBS) قبل از قرار دادن آن‌ها روی شیکر و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به این لوله‌ها اضافه شد. نمونه‌ها در مدت زمان از پیش تعیین شده جدا شدند (۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۱۷، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۶۸، ۲۴۰ و ۳۶۰ دقیقه) و محتویات پروتئین با استفاده از روش ارایه شده توسط Lowry تعیین شد (۱۶).

انجام آزمایش در داخل بدن

۱- روش برای آزمایش قدرت (Potency)

۱-۱ آزمایش ایمنی‌زایی: ۰/۷۵میلی‌لیتر واکسن دیفتری استریل به شش خوکچه‌ی هندی از طریق زیر جلدی (SC یا Subcutaneous injection) تزریق شد. شش هفته پس از ایمن‌سازی، ۵ میلی‌لیتر نمونه‌ی خون به صورت جداگانه از هر خوکچه‌ی هندی گرفته شد و سرم هر کدام به روش سانتریفوژ جدا شد (۷).

۱-۲ آزمایش خنثی‌سازی سرم (SN یا Serum neutralisation): همان‌طور که در جدول ۱ دیده می‌شود، واکسن دیفتری در ۱۰ غلظت مختلف تهیه شد و ۰/۲ میلی‌لیتر از هر غلظت واکسن، از

طریق داخل جلدی به خرگوش تزریق شد. در گروه شاهد، توکسوئید دیفتری تزریق شد و سطح نکروز مورد بررسی قرار گرفت (۷).

یافته‌ها

در این مطالعه، متغیرهای مختلفی به منظور بهینه‌سازی سطح جذب توکسوئید دیفتری در روی ژل آلومینیوم فسفات مورد بررسی قرار گرفتند. بنابراین، عوامل مهم مانند pH جذب، دما و pH نهایی برای آماده‌سازی واکسن دیفتری بررسی شدند. اثر واکسن در داخل بدن و در شرایط آزمایشگاهی، به منظور بررسی قدرت و توانایی واکسن مورد آزمایش قرار گرفت.

همان‌طور که در جدول ۲ دیده می‌شود، واکسن دیفتری با شش مقدار مختلف pH (۶، ۵/۸، ۵/۶، ۵/۴، ۵/۲ و ۵) و در معرض درجه حرارت‌های مختلف (شامل ۳۷، ۲۴ و ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) و در PH نهایی (۶/۸، ۶/۶ و ۶/۴) آماده و در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که شرایط مطلوب برای واکسن بهینه، pH اولیه‌ی جذب ۵/۸، حرارت جذب ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و مقدار pH نهایی ۶/۶ بود.

جدول ۱. تهیه‌ی رقت‌های مختلف از واکسن دیفتری و توکسین

شماره‌ی لوله	حجم توکسین (ml)	حجم حلال: پپتون واتر (ml)	حجم سرم خون خوکچه‌ی هندی (ml)
۱	۱	۰/۹	۰/۱
۲	۱	۰/۸	۰/۲
۳	۱	۰/۷	۰/۳
۴	۱	۰/۶	۰/۴
۵	۱	۰/۵	۰/۵
۶	۱	۰/۴	۰/۶
۷	۱	۰/۳	۰/۷
۸	۱	۰/۲	۰/۸
۹	۱	۰/۱	۰/۹
۱۰	۱	۱/۰	------

جدول ۲. تعیین درصد جذب توکسوئید دیفتری بر روی ژل آلومینیوم فسفات با pH جذب و pH نهایی مختلف در دماهای مختلف

واکسن دیفتری		دمای یخچال ۴ °C			دمای انکوباسیون ۳۷ °C			دمای اتاق ۲۴ °C		
pH		۶/۸	۶/۶	۶/۴	۶/۸	۶/۶	۶/۴	۶/۸	۶/۶	۶/۴
pH = ۵	شماره‌ی لوله	۳	۳	۴	۲	۳	۳	۲	۳	۲
	جذب (درصد)	۸۵/۰	۸۵/۰	۷۷/۵	۹۲/۵	۸۵/۰	۸۵/۰	۹۲/۵	۸۵/۰	۹۲/۵
pH = ۵/۲	شماره‌ی لوله		۲	۲	۲	۲	۲	۳	۳	۳
	جذب (درصد)	۸۵/۰	۹۲/۵	۹۲/۵	۹۲/۵	۹۲/۵	۹۲/۵	۸۵/۰	۸۵/۰	۸۵/۰
pH = ۵/۴	شماره‌ی لوله	۲	۱/۲	۲	۲	۱/۲	۲	۲	۲	۲
	جذب (درصد)	۹۲/۵	۹۳/۵	۹۲/۵	۹۲/۵	۹۴/۰	۹۲/۵	۹۲/۵	۹۲/۵	۹۲/۵
pH = ۵/۶	شماره‌ی لوله	۱/۲	۲	۱/۲	۲	۱/۲	۲	۱/۲	۲	۲
	جذب (درصد)	۹۴/۰	۹۲/۵	۹۴/۰	۹۲/۵	۹۳/۵	۹۲/۵	۹۴/۰	۹۲/۵	۹۲/۵
pH = ۵/۸	شماره‌ی لوله	۲	۱/۲	۲	۲	۳	۲	۲	۱/۲	۲
	جذب (درصد)	۹۲/۵	۹۵/۰	۹۴/۰	۹۲/۵	۸۵/۰	۹۲/۵	۹۲/۵	۹۳/۵	۹۲/۵
pH = ۶	شماره‌ی لوله	۲	۲	۲	۳	۱/۲	۱/۲	۴	۳	۳
	جذب (درصد)	۹۲/۵	۹۲/۵	۹۲/۵	۸۵/۰	۹۳/۵	۹۴/۰	۷۷/۵	۸۵/۰	۸۵

جدول ۳. ارزیابی کارایی (Potency) واکسن دیفتری مورد مطالعه

شماره‌ی لوله	حجم سرم خون خوکچه‌ی هندی (ml)	حجم حلال: پپتون واتر (ml)	حجم توکسین (ml)	مشاهده‌ی روزها در هر دو پهلوی خرگوش						نتیجه IU/ml
				روز اول		روز دوم		روزسوم		
				چپ	راست	چپ	راست	چپ	راست	
۱	۰/۱	۰/۹	۱	+	+	+	+	+	+	۵ IU/ml
۲	۰/۲	۰/۸	۱	–	–	–	–	–	–	
۳	۰/۳	۰/۷	۱	–	–	–	–	–	–	
۴	۰/۴	۰/۶	۱	–	–	–	–	–	–	
۵	۰/۵	۰/۵	۱	–	–	–	–	–	–	
۶	۰/۶	۰/۴	۱	–	–	–	–	–	–	
۷	۰/۷	۰/۳	۱	–	–	–	–	–	–	
۸	۰/۸	۰/۲	۱	–	–	–	–	–	–	
۹	۰/۹	۰/۱	۱	–	–	–	–	–	–	
۱۰	–	۱/۰	۱	+	+	+	+	+	+	

با توجه به مشاهدات مطالعه‌ی حاضر، بهبود در شرایط جذب آنتی‌ژن بر روی ژل آلومینیوم فسفات در آزمایش فولیکولاسیون در حدود ۹۵ درصد برآورد شد.

انتشار آنتی‌ژن دیفتری در شرایط آزمایشگاهی

آنتی‌ژن دیفتری با استفاده از محلول بافر فسفات (PBS با pH = ۷) در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد از ژل آلومینیوم فسفات آزاد و رها شد. انتشار آهسته‌ی آنتی‌ژن دیفتری از ژل آلومینیوم فسفات در طی یک دوره‌ی ۲۴–۵ ساعته رخ داد. این فرایند، در یک روند ثابت برای ۳۶۰ ساعت آینده ادامه یافت و در حدود ۶۰ درصد از آنتی‌ژن بیشتر از ۱۵ روز آزاد شد.

ایمنی‌زایی

ایمنی‌زایی بر روی شش خوکچه‌ی هندی که هر کدام ۰/۷۵ میلی‌لیتر واکسن دیفتری دریافت کرده بودند، مورد آزمایش قرار گرفت. بعد از ۶ هفته از ایمن‌سازی، نمونه‌ی خون برای بررسی سطح آنتی‌بادی‌های سرم خنثی، گرفته شد. نمونه‌ی واکسن به ۱۰ غلظت مختلف (آنتی‌بادی + آب پپتون + توکسوئید) رقیق شد (جدول ۳). نتایج علایم نکروز را در رقت اول (۱/۰ + ۰/۹ + ۰/۱) نشان داد؛ در حالی که هیچ تفاوت قابل توجهی در دیگر رقت‌ها (رقت‌های ۲ تا ۹) دیده نشد. نمونه‌ی رقیق شده در سطح دهم، یعنی توکسوئید خالص، علایم قابل توجهی از نکروز را به نمایش گذاشت.

علاوه بر این، قدرت واکسن ما در اولین رقت که در آن علایم نکروز مشاهده گردید، محاسبه شد. ۱ میلی‌لیتر از دومین رقت (۰/۲) با قدرت ۱ میلی‌لیتر/واحد بین‌المللی، بالاترین میزان قدرت واکسن (۵ میلی‌لیتر/واحد بین‌المللی) بررسی و در جدول ۳ ثبت گردید.

بحث

مطالعه‌ی حاضر با تمرکز بر توسعه‌ی واکسن دیفتری به منظور القای ایمنی کارآمد و محافظ، صورت پذیرفت.

هیدروکسید آلومینیوم، به عنوان ادجوانت در واکسن انسانی برای بیش از ۶۰ سال استفاده شده است.

هیدروکسید آلومینیوم و ژل فسفات آلومینیوم، به عنوان ادجوانت به صورت منظم برای بهبود اثربخشی واکسن در واکسن‌های انسانی به کار رفته است. میزان جذب آنتی‌ژن در ادجوانت، بستگی به عوامل مختلفی از جمله آنتی‌ژن و ادجوانت مشخص، مواد جانبی و pH فرمولاسیون واکسن دارد (۱۸-۱۷).

در این مطالعه، توکسوئید دیفتری خالص شده برای واکسن تهیه شده، استفاده می‌شود. بررسی میزان جذب در هیدروکسید آلومینیوم با pH مختلف جذب (۶، ۵/۸، ۵/۶، ۵/۴، ۵/۲ و ۵) و در معرض درجه حرارت‌های مختلف (۳۷، ۲۴ و ۴ سانتی‌گراد) و تنظیم در pH نهایی (۶/۸، ۶/۶ و ۶/۴) نشان داد که فرمولاسیون مؤثر، با pH اولیه‌ی جذب ۵/۸، حرارت جذب ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و مقدار pH نهایی ۶/۶ بوده است.

به طور مشابه، Sivananda و Sundaran، میزان جذب توکسوئید دیفتری در ژل آلومینیوم فسفات در pHهای مختلف (۷/۵، ۷، ۶/۵، ۶ و ۵) را ارزیابی و پیشنهاد کردند که درجه‌ی کم pH، منجر به میزان جذب بالاتری خواهد شد (۲۰-۱۹).

با توجه به مطالعه‌ی Gupta و Siber، جذب آنتی‌ژن بر روی ژل آلومینیوم به طور مستقیم به نیروی الکترواستاتیکی که بین ادجوانت و آنتی‌ژن برقرار است، بستگی دارد. جذب آنتی‌ژن پروتئین (دیفتری) در فاصله‌ی pH بین نقطه‌ی ایزوالکتریک از آنتی‌ژن و ادجوانت آلومینیوم انجام می‌شود (۲۰).

در این مطالعه، نقش عمده‌ی pH در جذب آنتی‌ژن و تعامل بین آنتی‌ژن و آلومینیوم، که ناشی از نیروی الکترواستاتیک است، نشان داده شد. همچنین، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که یک رابطه‌ی مستقیم بین pH و جذب آنتی‌ژن وجود دارد. این نتایج، با نتیجه‌ی قبلی گزارش شده توسط Lindblad (۴) و Gupta (۲۱) سازگار است.

نتایج این مطالعه، نشان داد که رهش آنتی‌ژن دیفتری از ادجوانت بین ۲۴-۵ ساعت آهسته و پس از آن تا ۳۶۰ ساعت آینده، با میزان ثابت رخ داد.

از سوی دیگر، ایمنی‌زایی واکسن دیفتری فرموله شده، در شرایط بدنی، مورد ارزیابی قرار گرفت. خوکچه‌های هندی توسط واکسن دیفتری واکسینه شدند و میزان افزایش ایمنی‌زایی آن‌ها و سطح آنتی‌بادی، با خونگیری از آن‌ها و انجام آزمایش SN برآورد شد. همان‌طور که در مطالعه‌ی حاضر مشاهده شد، با تزریق رقت اول نکروز نشان داده شد، اما بقیه‌ی رقت‌ها ایمن بودند. مشاهدات مطالعه‌ی حاضر نشان داد که در رقت دوم تا نهم، آنتی‌بادی محافظ وجود داشته است. با این وجود، آنتی‌بادی ۵ میلی‌لیتر/واحد بین‌المللی است که در نظر گرفته شد (جدول ۳).

در این مطالعه، از ۹ فرمولاسیون مختلف با موفقیت برای واکسن دیفتری به منظور پیدا کردن یک وضعیت بهتر برای بهترین درجه از جذب آنتی‌ژن استفاده شد.

ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم در فرمولاسیون واکسن دیفتری توسط Regnier و همکاران (۲۲) استفاده شد. آن‌ها بررسی کردند که «آیا جذب، باعث تغییرات ساختاری آنتی‌ژن توکسوئید دیفتری می‌گردد؟». گزارش‌ها جذب و ظرفیت بالا برای جذب توکسوئید دیفتری بر روی ژل را نشان دادند (۲۳-۲۲).

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که درجه‌ی جذب، بستگی به خواص فیزیکوشیمیایی آنتی‌ژن، ادجوانت و pH فرمولاسیون واکسن با درجه حرارت مناسب دارد.

می‌توان نتیجه گرفت که pH پایین، منجر افزایش میزان جذب خواهد شد. نتایج به وضوح نشان داد که نمونه‌ی جذب شده در pH اولیه‌ی جذب ۵/۸، حرارت جذب ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و مقدار pH نهایی ۶/۶، دارای حداکثر جذب بود.

علاوه بر این، سطح آنتی‌بادی در حیوانات مصون، به طور قابل توجهی بالا بود. واکسن دیفتری فرموله شده، امن و بسیار ایمنی‌زا بود (جدول ۲).

می‌توان نتیجه گرفت که دانش به دست آمده در این مطالعه، می‌تواند در بهبود تولید واکسن مفید و مؤثر واقع شود.

تشکر و قدردانی

با تشکر از اعضای بخش واکسن و آنتی‌سرم‌های انسانی موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی که در اجرای این مطالعه، با پژوهشگران همکاری نمودند. همچنین از این مؤسسه جهت تأمین منابع مالی اجرای این مطالعه قدردانی می‌گردد.

References

1. Rydell N, Sjoholm I. Oral vaccination against diphtheria using polyacryl starch microparticles as adjuvant. Vaccine 2004; 22(9-10): 1265-74.
2. Moro PL, Yue X, Lewis P, Haber P, Broder K. Adverse events after tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis (Tdap) vaccine administered to adults 65 years of age and older reported to the Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS), 2005-2010. Vaccine 2011; 29(50): 9404-8.
3. Goto N, Kato H, Maeyama J, Eto K, Yoshihara S. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. Vaccine 1993; 11(9): 914-8.
4. Lindblad EB. Aluminium adjuvants--in retrospect and prospect. Vaccine 2004; 22(27-28): 3658-68.
5. Lima KM, dos Santos SA, Rodrigues JM, Silva CL. Vaccine adjuvant: it makes the difference. Vaccine 2004; 22(19): 2374-9.
6. Aggerbeck H, Heron I. Adjuvanticity of aluminium hydroxide and calcium phosphate in diphtheria-tetanus vaccines--I. Vaccine 1995; 13(14): 1360-5.
7. O'Hagan DT. Preparation methods and research protocols: Mmethods in molecular medicine. New York, NY: Springer; 2000. p. 435-50.
8. Tritto E, Mosca F, De Gregorio E. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. Vaccine 2009; 27(25-26): 3331-4.
9. van Duin D, Medzhitov R, Shaw AC. Triggering TLR signaling in vaccination. Trends Immunol 2006; 27(1): 49-55.
10. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. Immunol Cell Biol 2004; 82(5): 488-96.
11. Aguilar JC, Rodriguez EG. Vaccine adjuvants revisited. Vaccine 2007; 25(19): 3752-62.
12. Schirmbeck R, Melber K, Mertens T, Reimann J. Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: implication for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis. J Virol 1994; 68(3): 1418-25.
13. Rimaniol AC, Gras G, Verdier F, Capel F, Grigoriev VB, Porcheray F, et al. Aluminum hydroxide adjuvant induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type. Vaccine 2004; 22(23-24): 3127-35.
14. Aggerbeck H, Wantzin J, Heron I. Booster vaccination against diphtheria and tetanus in man. Comparison of three different vaccine formulations--III. Vaccine 1996; 14(13): 1265-72.
15. Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. Vaccine 2001; 19(17-19): 2666-72.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193(1): 265-75.
17. Sivakumar SM, Safhi MM, Kannadasan M, Sukumaran N. Vaccine adjuvants - Current status and prospects on controlled release adjuvancity. Saudi Pharm J 2011; 19(4): 197-206.

18. Lyng J. Potency assay of diphtheria and tetanus toxoids some theoretical and practical considerations. Dev Biol Stand 1986; 64: 47-50.
19. Sivananda N, Sundaran B. Studies on adsorption of diphtheria toxoid on aluminium phosphate gel. Indian Journal of Science and Technology 2010; 3(3): 248-9.
20. Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects. Vaccine 1995; 13(14): 1263-76.
21. Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. Adv Drug Deliv Rev 1998; 32(3): 155-72.
22. Regnier M, Metz B, Tilstra W, Hendriksen C, Jiskoot W, Norde W, et al. Structural perturbation of diphtheria toxoid upon adsorption to aluminium hydroxide adjuvant. Vaccine 2012; 30(48): 6783-8.
23. Oleszycka E, Lavelle EC. Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum. Curr Opin Immunol 2014; 28: 1-5.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 07.05.2015
Vol. 33, No. 343, 3rd Week, September 2015
Accepted: 25.07.2015

Optimization of Diphtheria Toxoid Absorption on Aluminum Phosphates and its Relationship with Potency

Mina Pahlevani MSc[1], Hossein Zolfagharian PhD[2], Majid Tebianian PhD[3], Hossein Rasi PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: In the mid-1940s, the diphtheria toxoid (inactivated toxin) vaccine was developed via combination with tetanus and pertussis vaccines (DTP vaccine) and successfully conducted to eradication of diphtheria disease throughout the world. Optimization of diphtheria toxoid absorption on aluminum phosphates to improve the rate of absorption and increase the efficacy of vaccine was our aim.

Methods: In this study, the effect of different parameters, such as initial pH, temperature and final pH, on the adsorption rate of diphtheria toxoid on aluminum phosphate gel waz studied in vitro and vivo. Purified diphtheria toxoid was used for vaccine preparation. It was adsorbed to aluminum hydroxide with different pH values (5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8 and 6.0) and exposed to various temperatures (4, 24 and 37°C) and adjusted to the final pH values of 6.4, 6.6 and 6.8.

Findings: The effective formulation was the pH of 5.8 at the temperature of 4°C with the final pH of 6.6.

Conclusion: The level of antibody in the immunized animals significantly was high. It is suggested that with new formulated vaccine with the optimized conditions, can significantly make the rate of toxoid and level of antibody high in the immunized animals.

Keywords: Diphtheria, Vaccines, Adjuvant, Absorption, pH

Citation: Pahlevani M, Zolfagharian H, Tebianian M, Rasi H. **Optimization of Diphtheria Toxoid Absorption on Aluminum Phosphates and its Relationship with Potency.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(343): 1128-36

1- Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2- Associate Professor, Department of Human Vaccine and Antisera, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
3- Assistant Professor, Department of Human Vaccine and Antisera, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
4- Assistant Professor, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
Corresponding Author: Hossein Zolfagharian PhD, Email: zolfagharianh@yahoo.com