Archive of SID

(مقاله پژوهشی)

تعیین کمی آنتی ژن پرتوزیس توکسین همراه و آزاد سلولی بمنظور تعیین زمان مناسب برداشت با استفاده از الیزا

مژگان هلالی نسب[1]، مجتبی نوفلی[2*]، داود محمدباقر[3]

۱- مربی گروه میکروبیولوژی.
۲-استادیار میکروب شناسی پزشکی.
۳-مربی گروه میکروبیولوژی.

۱-دانشگاه آزاد اسلامی، شاخه رشت، دانشکده علوم پایه، گیلان.
۲-بخش تحقیق و تولید واکسنهای باکتریایی پزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران.
۳-موسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران.

*نویسندهٔ مسؤول:
مجتبی نوفلی؛ بخش تحقیق و تولید واکسنهای باکتریایی پزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۹۸۳۸۶۷۱۸
Email: noofeli1234@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: طول دوره کشت فرمانتوری واکسن سیاه سرفه سلولی (WCP - Whole Cell Pertussis)، برکمیت و کیفیت پرتوزیس توکسین (Pertussis toxin-PTX) تولید شده این باکتری اثر گذاشته و از این طریق تاثیر به سزایی در ایمینوژنیسیتی واکسن تولیدی دارد. هدف از این تحقیق اندازه گیری میزان PTX آزاد و متصل به باکتری بوردتلا پرتوزیس با روش الایزا، جهت تعیین زمان مناسب برداشت کشت فرمانتوری بوردتلا پرتوزیس به منظور تعیین شرایط بهینه تولید واکسنWCP بود.

روش بررسی: میزان آنتی ژن PTX در سه سری ساخت کشت های فرمانتوری واکسن WCP سویه ۵۰۹ (A،B و C) در محیط کشت B_2 و در جذب های نوری ۰/۱، ۰/۸ ، ۱/۱، ۱/۲ ،۱/۳ اندازه گیری گردید. هر نمونه در سه حالت رسوب، محلول رویی و سوسپانسیون واکسن WCP در مقایسه با آنتی ژن پرتوزیس توکسین استاندارد با روش ELISA و نرم افزارExcel کمیت سنجی و مقایسه گردید.

یافته‌ها: بر اساس آنالیز نتایج حاصل که بر مبنای تعیین حداکثر میزان آنتی ژن PTX تفسیر شده است، مدت زمان بهینه کشت فرمانتوری ۳۵۰ لیتری novo-paljas مؤسسه رازی برای سویه ۵۰۹، ۴۱ ساعت با حداکثرجذب نوری ۱/۲ تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: معایب فراوان روش کدورت سنجی و مزایای بسیار (کمی، کیفی و تکرار پذیری) اندازه گیری آنتی ژن PTX با روش الایزا، نوید بخش ارایه روشی مطمئن به منظور کنترل پارامتر های مؤثر در فرآیند تولید، کنترل حین تولید (In –IPQC Process Quality Control) و تولید بهینه و پایدار (Consistency approach) واکسن WCP می باشد.

واژگان کلیدی: واکسن سیاه سرفه سلولی، آنتی ژن PTX، کشت فرمانتوری سیاه سرفه، الایزا.

دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۲/۵ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۸/۴/۳۰ اعلام قبولی: ۱۳۹۸/۴/۳۱

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سیاه سرفه یا whooping cough یا سرفه صد روزه بیماری حاد و بسیار مسری دستگاه تنفسی انسان است که با انجام واکسیناسیون قابل پیشگیری می‌باشد. براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۰۸، حدود ۱۶۰۰۰۰۰۰ مورد ابتلا به این بیماری در سراسر دنیا به ثبت رسیده که ۹۵ درصد آنها متعلق به کودکان کشورهای درحال توسعه بوده است. همچنین در این سال ۱۹۵۰۰۰ مورد مرگ و میر ناشی از این بیماری نیز گزارش شده است. در این سال بر اساس تخمین سازمان جهانی بهداشت، واکسیناسیون جهانی با پوشش ۸۲ درصد علیه این بیماری موجب پیشگیری از ۶۸۷۰۰۰ مورد مرگ و میر شده است (۱). در ایران نیز سن ابتلا بیشتر در زیر دو ماه می‌باشد که رقمی کمتر از یک مورد در هر یکصد هزار نفر می‌باشد.

عامل ایجاد کننده بیماری سیاه سرفه باسیل گرم منفی بوردتلا پرتوزیس است و انسان به عنوان تنها میزبان این باکتری علایم بیماری سیاه سرفه را درخود بروزمی دهد. گرچه گونه‌های دیگر این باکتری نظیر بوردتلا پاراپرتوزیس وبوردتلابرونشی سپتیکا نیز باعث بروزعلایم خفیف این بیماری در انسان می گردند(۲). اوّلین واکسن جهت پیشگیری از این بیماری در دهه ۱۹۴۰ و از نوع واکسن کشته شده سلولی ساخته شد. در سال ۱۹۷۴ نیز تزریق این واکسن توسط سازمان بهداشت جهانی تایید و توصیه گردید(۱). در کشور ما نیز تولید واکسن سیاه سرفه کشته شده سلولی در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج از اواسط دهه ۱۳۳۰ با استفاده از دو سویه واکسینال ۱۳۴ و ۵۰۹ NVI (هلند) آغاز گردیده است که با بهره گیری از بیوراکتورهای ۳۵۰ لیتری تمام استیل که امکان کنترل پارامتر های مؤثر در کشت را دارا می باشند، اقدام به تولید واکسن سیاه سرفه کشته شده سلولی شده است (۳).

پس از پایان زمان کشت فرمانتوری با استفاده از سپراتور، باکتری بوردتلا پرتوزیس به صورت کاملا" استریل از محیط کشت و سایر ناخالصی‌ها، جداسازی می گردد. سپس به منظور غیر فعال کردن و سمیت زدایی سوسپانسیون باکتریایی به دست آمده، از حرارت ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت نیم ساعت و افزودن مرتیولات به میزان ۰/۰۱ درصد (وزنی حجمی) به سوسپانسیون باکتریایی، استفاده می‌شود. همچنین جهت تکمیل فرآیند مذکور ضروری است که سوسپانسیون سیاه سرفه به مدتی در دمای ۶-۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردد (۳).

یکی از مهم‌ترین عوامل ایمنی‌زا در بدن انسان توکسین غیر فعال بوردتلا پرتوزیس PTX است که در اتصال باکتری به اپیتلیوم میزبان مشارکت می کند. PTX فاکتور مهم کلونیزاسیون و هدف ماکروفاژهای مجاری هوایی است که باعث عرضه آنتی ژن و ایجاد التهاب و عفونت می‌گردد (۴). نظر به اهمیت نقش آنتی بادی ضد PTX در ایمن سازی افراد جامعه، PTX غیر فعال شده به تنهایی یا به صورت ترکیبی با سایر آنتی ژن ها در تمام انواع واکسن غیر سلولی سیاه سرفه مورد استفاده قرار می گیرد (۵).

به لحاظ تأثیر به سزای طول دوره کشت فرمانتوری و مراحل مختلف پس از تولید واکسنWCP در میزان تولید و حفظ خصوصیات آنتی ژنی PTX و نقش بسیار مهم این آنتی ژن در ایمنوژنیسیته انسان، اندازه گیری آنتی ژن مذکور در زمان های مختلف کشت فرمانتوری با روش الایزا، مارکر نشان دهنده زمان حداکثری تولید PTX و یا نشان دهنده مرحله ای است که به دلیل عملکرد نامناسب، میزان آنتی ژن کاهش یافته است و در مجموع با اندازه گیری میزان آنتی ژن PTX، امکان بررسی شرایط بهینه تولید واکسن WCP امکان پذیر می گردد. هدف از مطالعه جاری نیز تعیین زمان مناسب توقف کشت با استفاده از اندازه گیری کمی آنتی ژن پرتوزیس توکسین همراه و آزاد سلولی بود.

www.SID.ir

Archive of SID

روش بررسی

آماده سازی آنتی ژن پروتوزیس توکسین (PTX)

بر اساس دستورالعمل مندرج در بروشور شرکت سازنده EDQM (European -EDQM Directorate for the Quality of Medicine)، هرویال PTX محتوی ۵۰ میکروگرم (۷۵۰۰ IU/Vial) پودر لیوفیلیزه پروتوزیس توکسین می باشد که در ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر استریل حل شد که معادل ۵ میکروگرم در ۵۰ میکرولیتر بوده ودردمای ۸-۲ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

آماده سازی آنتی پرتوزیس توکسین آنتی بادی گوسفندی

(Sheep Anti Pertussis Toxin antibody)

به عنوان آنتی بادی اولیه یا کوتینگ استفاده گردید.

بر اساس دستورالعمل مندرج در بروشور شرکت سازنده National Institute for - NIBSC) Biological Standards and Control)، یک میلی لیتر از آب مقطر استریل به ویال حاوی پودر لیوفیلیزه آنتی بادی افزوده و پس از تقسیم تا زمان مصرف، در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

آماده سازی آنتی پرتوزیس توکسین آنتی بادی موشی

(Mouse Anti Pertussis Toxin Antibody

)

به عنوان آنتی بادی ثانویه استفاده گردید. بر اساس دستورالعمل مندرج در بروشور شرکت سازنده (NIBSC) یک میلی لیتر از آب مقطر استریل به ویال حاوی پودر لیوفیلیزه آنتی بادی افزوده و پس از تقسیم تا زمان مصرف، در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

آماده سازی آنتی موس آنتی بادی کونژوگه شده با آنزیم HRP(horseradish peroxidase) بزی

(HRP Conjugated Goat Anti Mouse Antibody)

براساس دستورالعمل مندرج در بروشور شرکت سازنده (NORDIC IMMUNOLOGY)، یک میلی لیتر آب مقطر استریل به ویال حاوی پودر لیوفیلیزه افزوده و پس ازتقسیم در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تهیه بافر فسفات سیترات ۰/۰۵ مولار، pH=۵

بر اساس دستورالعمل مندرج در بروشور شرکت سازنده (Sigma)، یک عدد قرص بافر فسفات سیترات در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونایز حل گردید. پس از کنترل pH، از فیلتر ۰/۲۲ عبور داده شد و در ظرف استریل جمع آوری و در یخچال نگهداری شد.

تهیه بافر کوتینگ (Coating)

بر اساس دستورالعمل مندرج در بروشور شرکت سازنده (Sigma)، یک عدد کپسول حاوی پودر کربنات بی کربنات را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و پس از تنظیم pH: ۷/۲، بافر از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده و در ظرف استریل جمع آوری و در یخچال نگهداری شد (۶).

تهیه بافر بلاکینگ(Blocking)

BSA(Bovine serum albumin) یک درصد وزنی حجمی در (Phosphate-buffered saline) PBS ۰/۰۱ مولار، pH: ۷/۶ حل شده و محلول از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده و در یخچال نگهداری شد (۶).

تهیه بافر واشینگ (Washing)

توبین ۲۰ به میزان ۰/۰۵ درصد حجمی/حجمی در بافر PBS ۰/۰۱ مولار، pH: ۷/۶ حل شده و از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده و در یخچال نگهداری شد (۶).

آماده سازی محلول سوبسترا تترا متیل بنزیدین (Tetramethylbenzidine - TMB):

بر اساس دستورالعمل مندرج در بروشور شرکت سازنده (Sigma)، به نسبت یک میلی گرم پودر تترا متیل بنزیدین در یک میلی لیتر محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) حل گردید و پس از تقسیم در فریزر ۷۰- نگهداری شد. جهت مصرف، محلولTMB و DMSO، به نسبت ۱ به ۱۰ با بافر فسفات سیترات (pH: ۵) رقیق شده، بلافاصله قبل از استفاده، به میزان ۲ میکرولیتر آب

www.SID.ir

Archive of SID

اکسیژنه (۳۰٪) به حجم ۱۰ میلی لیتری فوق اضافه و مصرف گردید.

تهیه محلول رقت سازی

BSAنیم درصد وزنی/ حجمی وتوئین ۲۰ به میزان ۰/۰۵ درصد حجمی/ حجمی در بافر PBS ۰/۰۱ مولار با pH: ۷/۶ حل واز فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد (۶).

نمونه گیری از کشت فرمانتوری سیاه سرفه سلولی و آماده سازی آن ها

در هر سه سری ساخت کشت فرمانتوری، ۵ عدد نمونه، با حجم حداقل ۴۰ میلی لیتر، در سه مرحله رشد اولیه (lag phase)(۶-۵ ساعت) با جذب نوری(OD) ۰/۱ ، مرحله رشد لگاریتمی(log phase)(۳۲-۲۸ ساعت) با جذب نوری ۰/۸ تا ۱/۱ و همچنین در مرحله پایان رشد (stationary phase)(۱۰-۶ ساعت)، با جذب نوری۱/۲ تا ۱/۳ جمع آوری شد.

بلافاصله پس از نمونه گیری، طبق دستورالعمل زیر، اقدام به تهیه سه حالت:

۱-سوسپانسیون کل سلول (Whole Cell Suspension - WCS)

۲- سوسپانسیون در سالین (Saline Suspension Cell - SSC)

۳- سوپرناتانت (Supernatant - SUP) گردید (۶).

تهیه WCS : ۱۲/۵ میلی لیتراز نمونه را در ۶ عدد کرایو تیوپ استریل ۲ میلی لیتری تقسیم و تا زمان سنجش در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

تهیه سوسپانسیون در سالین (SSC) و سوپرناتانت (SUP): ۱۲/۵ میلی لیتر از باقی مانده نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در g ۶۵۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتزیفوژ گردید. سپس محلول رویی بعنوان سوپرناتانت در ۶ کرایوتیوپ استریل تقسیم و تا زمان سنجش در ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

همچنین رسوب حاصل با سرم فیزیولوژی استریل ۰/۸۵ درصد به حجم ۱۲/۵ میلی لیتررسانده و در ۶ کرایو تیوپ استریل تقسیم و تا زمان سنجش در ۲۰-درجه سانتیگراد قرار داده شدند (۶).

جذب نوری و pH باقی مانده نمونه ۴۰میلی لیتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Ultrospect 2000 Pharmacia Biotech با طول موج ۵۹۰ نانومتر اندازه گیری و ثبت گردید.

راه اندازی الایزا ساندویچ غیر مستقیم (Indirect Sandwich Elisa)

با استفاده از روش Checker boards، غلظت بهینه آنتی بادی اولیه، آنتی ژن استاندارد، آنتی بادی ثانویه و آنتی بادی کونژوگه بر اساس حداکثر بودن نسبت سیگنال به نویز تعیین گردید (۷).

انجام آزمایش الایزا ساندویچ غیرمستقیم (Indirect Sandwich Elisa)

۵۰ میکرولیتر از رقت های آنتی بادی اولیه در چاهک ها ریخته شد و پس از گذاشتن درپوش تا روز بعد در دمای ۶ – ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر بافر بلوکه کننده درهمه چاهک ها ریخته شد و پس از گذاشتن درپوش، ۲ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. ۵۰ میکرولیتر از رقتهای نمونه های مورد بررسی و آنتی ژن استاندارد پرتوزیس توکسین (کنترل مثبت) و نمونه SUP با جذب نوری ۰/۱ به عنوان کنترل منفی در چاهک هاافزوده گردید. پس از گذاشتن درپوش، میکروپلیت ۱ ساعت در دمای محیط قرار داده شد(۶). ۵۰ میکرولیتر از رقت های آنتی بادی ثانویه به همه چاهک های میکروپلیت اضافه گردید و سپس ۲ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. ۵۰ میکرولیترآنتی موس آنتی بادی کونژوگه با رقت $\frac{1}{5000}$ به تمام چاهک ها اضافه شد و بمدت یکساعت در دمای محیط قرار داده شد. تا این مرحله، پس از پایان هر مرحله سه بار با بافر شستشو، میکروپلیت شستشو و خشک گردید. سوبسترا (TMB-DMSO) به نسبت یک به ده با بافر فسفات سیترات ۰/۰۵ مولار رقیق شده و ۲ میکرولیترآب اکسیژنه ۳۰ درصد بلافاصله هنگام مصرف افزوده گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر از این محلول به هر

www.SID.ir

Archive of SID

چاهک اضافه شد. با گذاشتن درپوش، میکروپلیت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و در شرایط تاریکی انکوبه گردید و سپس ۵۰ میکرولیتر بافر متوقف کننده (اسید سولفوریک ۱ مولار) به هر چاهک در شرایط تاریکی اضافه گردید. نهایتا جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزاریدر Elisa -EL800 (Biotek instrument reader)، قرائت گردید. تمامی نمونه ها به صورت دوتایی (Duplicate) مورد سنجش قرار گرفتند.

محاسبه غلظت آنتی ژن پرتوزیس توکسین در نمونه های مورد آزمایش

تفاوت میانگین جذب نوری نمونه مورد آزمایش از میانگین جذب نوری بلانک مربوطه محاسبه شده، عدد بدست آمده را در فرمول حاصل از رسم منحنی استاندارد با نرم افزار Excel قرار داده و از این طریق غلظت PTXدر نمونه های مورد آزمایش محاسبه گردید.

محاسبه Cut off

از طریق محاسبه میانگین کنترل منفی به علاوه سه برابر انحراف معیار آن، به علاوه ده درصد حاصل جمع این دو، محاسبه گردید Cut-off= mean + 3s + 10% (mean + 3s)

یافته ها

رقت های بهینه آنتی ژن و آنتی بادی

براساس نتایج حاصل ازروشChecker boards مبتنی بر حداکثر بودن نسبت سیگنال به نویز، رقتهای بهینه آنتی ژن استاندارد $\frac{1}{800}$، آنتی بادی اولیه $\frac{1}{5000}$، آنتی بادی ثانویه $\frac{1}{1000}$ و آنتی موس آنتی بادی کونژوگه $\frac{1}{5000}$ به دست آمد.

مقدار cut off

میانگین جذب نوری نمونه های کنترل منفی معادل ۰/۰۷۲ تعیین گردید. انحراف معیار جذب نوری نمونه کنترل منفی معادل ۰/۰۰۴ , مقدار cut off معادل ۰/۰۹۲ محاسبه گردید.

نتایج سه سری کشت فرمانتوری A، B و C

اطلاعات نمونه های بدست آمده از سه سری کشت فرمانتوری A، B وC که شامل جذب های نوری در حالات (WCS، SSC وSUP)، pH در حالت WCS و زمان نمونه گیری است، در جداول۱ و۲و ۳ ارایه شده است.

غلظت آنتی ژن PTX

با استفاده از منحنی های استاندارد در هر سری سنجش، مقادیر آنتی ژن PTX در نمونه های WCS، SSCو SUP در سه سری کشت های فرمانتوری A، B و C محاسبه و نتایج بدست آمده در جدول ۴ ارایه شده است.

جدول۱: اطلاعات کشت فرمانتور (A)

مدت زمان کشت(ساعت)	pH WCS	OD. SUP	OD. SSC	OD. WCS
۱۶	۷/۰۰	۰/۰۰۲	۰/۰۹۰	۰/۱۰۰
۳۵	۷/۵۰	۰/۰۰۶	۰/۷۹۲	۰/۸۱۳
۳۹	۷/۶۶	۰/۰۱۵	۱/۱۰۰	۱/۱۲۰
۴۱	۷/۶۹	۰/۰۱۹	۱/۱۸۰	۱/۲۱۵
۴۵	۷/۸۵	۰/۰۶۵	۱/۲۴۵	۱/۳۱۲

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: اطلاعات کشت فرمانتور (B)

مدت زمان کشت (ساعت)	pH WCS	OD. SUP	OD. SSC	OD. WCS
۱۲	۷/۱۲	۰/۰۰۲	۰/۰۹۵	۰/۱۲۰
۳۳	۷/۲۰	۰/۰۱۶	۰/۷۸۵	۰/۸۱۳
۴۱	۷/۵۲	۰/۰۱۶	۱/۰۹۰	۱/۱۰۸
۴۲	۷/۶۳	۰/۰۵۷	۱/۱۳۴	۱/۲۰۰
۴۴	۷/۷۴	۰/۱۵۵	۱/۱۴۰	۱/۳۲۰

جدول ۳: اطلاعات کشت فرمانتور (C)

مدت زمان کشت (ساعت)	pH WCS	OD. SUP	OD. SSC	OD. WCS
۱۴	۷/۲۰	۰/۰۰۳	۰/۰۹۸	۰/۱۱۵
۳۲	۷/۶۷	۰/۰۱۰	۰/۸۰۰	۰/۸۱۵
۳۵	۷/۷۰	۰/۰۰۹	۱/۰۰۰	۱/۰۱۲
۴۰	۷/۷۳	۰/۰۲۵	۱/۱۷۰	۱/۲۰۵
۴۴	۷/۷۹	۰/۱۲۰	۱/۱۷۱	۱/۳۰۳

جدول۴: نتایج غلظت آنتی ژن PTX در نمونه های WCS ، SSC و SUP در زمان‌های مختلف سه سری ساخت کشت فرمانتوری A، B وC

کشت فرمانتوری	زمان سپری شده از کشت (ساعت)	غلظت آنتی ژن PTX در WCS نانوگرم/ میلی لیتر	غلظت آنتی ژن PTX در SSC نانوگرم/ میلی لیتر	غلظت آنتی ژن PTX در SUP نانوگرم/ میلی لیتر
A	۱۶	۱/۵۰۴	۱/۵۰	۰/۰۰۴
	۳۵	۱۲/۲۲	۱۲/۱۱	۰/۱۱
	۳۹	۲۰/۳۹	۲۰/۰۸	۰/۳۱
	۴۱	۲۲/۶۴	۲۲/۱۹	۰/۴۵
	۴۵	۲۲/۹۸	۲۱/۶۶	۱/۳۲
B	۱۲	۱/۳۶۲	۱/۳۲	۰/۰۴۲
	۳۳	۱۴/۱۹۳	۱۴/۱۶	۰/۰۳۳
	۴۱	۲۹/۲۷۳	۲۹/۲۴	۰/۰۳۳
	۴۲	۳۱/۵۹۹	۳۱/۵۰	۰/۰۹۹
	۴۴	۳۳/۷۷	۳۱/۲۰	۲/۵۷
C	۱۴	۱/۰۵۵	۱/۰۲	۰/۰۳۵
	۳۲	۱۰/۷۴۲	۱۰/۶۵	۰/۰۹۲
	۳۵	۲۴/۵۷۵	۲۴/۴۸	۰/۰۹۵
	۴۰	۲۵/۳۵	۲۵/۲۴	۰/۱۱۰
	۴۴	۲۷/۳۹	۲۵/۲۴	۲/۱۵۰

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

اثر بخشی (efficacy) واکسن سیاه‌سرفه سلولی (WCP) به لحاظ توانایی در کنترل موثر این بیماری در دهه های متمادی به اثبات رسیده است. به همین دلیل علیرغم تولید واکسن آسلولار (Acellular pertussis vaccine) سیاه سرفه در بعضی از کشورها، واکسن WCP همچون گذشته درحال تولید و مصرف می‌باشد. درتحقیقات فاین و کلارکسون اثربخشی واکسن‌های WCP شرکت های تولید کننده مختلف و همچنین اثربخشی سری ساخت‌های مختلف واکسن WCP یک مرکز واکسن سازی، مورد بررسی واقع شده و تفاوت فراوانی در اثربخشی آنها دیده شده است. این تفاوت ناشی از وجود تنوع در روش های تولید و یا تفاوت در ساختارآنتی ژنای ایمینوژن (Immunogen) موجود در واکسن می باشد(۸و۶).

در مطالعه استیفن هوف تفاوت ایمنی زایی دو نوع واکسن WCPمختلف در کودکان مورد بررسی قرار گرفت. اگر چه هر دو نوع واکسن ازنظر الزامات سازمان بهداشت جهانی مورد تأیید بوده اند اما از نظر ایمنی زایی در کودکان تفاوت چشمگیری با یکدیگر داشته اند. لذا تولید سری ساخت های مختلف واکسن با شرایط مطلوب و پایدار و قابل اطمینان بودن اثر بخشی واکسن بایستی تضمین گردد. رویکرد تولید پایدار واکسن WCP به معنای تشابه ساختار آنتی ژنی سری ساخت های مختلف می باشد. ازآنجایی که مهم ترین آنتی ژن موثر در ایمنی زایی واکسنWCP آنتی ژنPTX است، لذا تعیین کمی این آنتی ژن به عنوان آزمون کنترل کیفیت حین فرآیند تولید، موجب افزایش کیفیت و تولید بهینه و پایدار(Consistency Approach) واکسن WCP می گردد (۶).

در این تحقیق میزان آنتی ژن PTX متصل و رها شده از باکتری بوردتلا پرتوزیس در زمان‌های مختلف کشت فرمانتوری واکسن WCP به روش الیزا اندازه‌گیری گردیده و نتایج حاصل از آن، مبنای محاسبه طول دوره کشت بهینه فرمانتوری واکسن WCP قرار گرفته است. حداکثر طول دوره کشت فرمانتوری بر اساس حداکثر میزان بیان آنتی ژن PTX در سطح باکتری بوردتلا پرتوزیس و حداقل رهاسازی این آنتی ژن در محیط کشت تعیین گردید (۶).

بر اساس نتایج ثبت شده در نمودار ۱ که میانگین مقادیر آنتی ژن PTX در سه حالتWCS ، SSC و SUP در ۵ نمونه زمان‌های مختلف سه سری ساخت کشت فرمانتوری WCP(جداول ۳-۴)را مقایسه نموده است نشان می‌دهد که :

۱-در نمونه اول (جذب نوری ۰/۱) که مربوط به فاز ابتدایی رشد کشت فرمانتوری بوده مقدار آنتی ژن PTX کل WCS بسیار کم بوده و تقریبا" تمامی این آنتی ژن درحالت متصل به باکتری (SSC)، سنجش شده و مقدار آنتی ژن رها شده در محیط کشت (SUP) نیز بسیار ناچیز اندازه گیری شده است.

۲-با گذشت زمان در نمونه‌های دوم، سوم و چهارم (جذب های نوری ۰/۸، ۱/۱ و ۱/۲) که مربوط به فاز لگاریتمی رشد کشت فرمانتوری بوده، روند رو به افزایش مقادیر آنتی ژن PTXکل (WCS) مشاهده می شود که به دلیل شرایط مناسب محیط کشت و قرار داشتن در فاز لگاریتمی رشد می باشد و تقریبا" تمامی این آنتی ژن درحالت متصل به باکتری(SSC)، سنجش شده و مقدار آنتی ژن رها شده در محیط کشت (SUP)نیز تقریبا" ثابت و بسیار ناچیز اندازه گیری شده است. براین اساس حداکثر فاز رشد لگاریتمی و حد اکثر آنتی ژن متصل به باکتری(SSC) درکشت فرمانتوری ۳۵۰ لیتری WCP سویه ۵۰۹، هنگامی است که جذب نوری سوسپانسیون میکروبی کشت WCP، ۱/۲ می باشد. پایان طول دوره کشت فرمانتوری در این زمان به لحاظ کمی و کیفی کاملا" ایده آل می باشد. لذا تشخیص این زمان در تولید واکسن WCP بسیار با اهمیت تلقی می گردد.

۳-در نمونه پنجم (جذب نوری ۱/۳) که مربوط به فاز توقف رشد کشت فرمانتوری بوده همچنان افزایش میزان آنتی ژن PTXکل WCS به نسبت مراحل قبل مشاهده می گردد. اما به دلیل نامساعد شدن شرایط محیط کشت از

www.SID.ir

Archive of SID

نظر کاهش مواد غذایی و افزایش متابولیت های مضر تولید شده و تغییرات pH و... باکتری وارد فاز توقف یا سکون شده و مقدار آنتی ژن متصل به باکتری(SSC) به نسبت مرحله چهارم کاهش یافته و باکتری سیاه‌سرفه آنتی ژن های سطحی خود را از دست داده و در محیط کشت رها ساخته است. لذا جذب نوری SUP در این مرحله افزایش چشمگیری یافته و در حقیقت بر خلاف چهار نمونه قبلی، عامل افزایش‌دهنده میزان آنتی‌ژن PTX کل(WCS) افزایش رهاسازی این آنتی ژن در محیط کشت (SUP) می باشد و نه افزایش آنتی ژن متصل به باکتری(SSC). در صورتی که پایان طول دوره کشت فرمانتوری در این مرحله یا در زمان های پس از این مرحله اتفاق بیافتد، اگرچه با افزایش یافتن جذب نوری کشت فرمانتوری و افزایش راندمان کمی تولید به دلیل افزایش توده زیستی (bio mass)زنده و مرده همراه است، اما باکتری در مرحله از دست دادن آنتی ژن های خود قرار گرفته و به لحاظ کیفی افت محسوسی داشته است. درحقیقت پس از پایان فاز رشد لگاریتمی به دلیل نامساعد شدن شرایط کشت، باکتری به فاز توقف یا سکون وارد شده و این وضعیت موجب می گردد که باکتری بوردتلا پرتوزیس آنتی ژن های سطحی و ایمنی زای خود را از دست داده و در محیط کشت رها نماید، این آنتی ژن های رها شده نیز در مرحله جدا نمودن توده باکتریایی از محیط کشت در دستگاه سپراتور، همراه با محیط کشت خارج شده و دور ریخته می شود و در پایان کار آنتی ژن هایPTX سطحی باکتری بوردتلا پرتوسیس که از نظر ایمنی زایی در انسان بسیار مؤثرمی باشد، کاهش یافته و واکسن تولید شده ایمنی زایی کمی داشته والزامات سازمان جهانی بهداشت را برآورده ننموده و مورد تایید بخش QC (Quality control) نیز نخواهد بود وعلی رغم صرف هزینه های بسیار، این واکسن بی کیفیت و غیر قابل استفاده خواهد بود. از این رو به لحاظ اقتصادی نیز اندازه گیری کمی آنتی ژن PTX با رویکرد بررسی کیفی واکسن WCP کاملا" ضروری و و مقرون به صرفه خواهد بود (۶).

۴-در این تحقیق نمونه گیری بر اساس مدت زمان سپری شده از کشت فرمانتوری زمان بندی نشده است. به دلیل استفاده از سویه های با عمر نگهداری متفاوت، میزان (Colony forming unit) cfu. این سویه ها با گذشت زمان با یکدیگر متفاوت بوده و طول دوره کشت آن ها به دلیل تفاوت در مدت زمان فاز ابتدایی (Lag Phase) متفاوت و فاقد ارزش مقایسه خواهد بود، از این رو نمونه گیری بر اساس جذب نوری تنظیم شده است.

بر اساس جداول اطلاعات سه سری کشت فرمانتوری (۳-۱، ۳-۲ و ۳-۳) حدود جذب نوری کشت های فرمانتوری در مقادیر ۰/۱، ۰/۸، ۱/۱، ۱/۲ و ۱/۳به لحاظ تطابق با زمان سپری شده از کشت فرمانتوری به ترتیب معادل۱۴، ۳۳/۳، ۳۸/۳، ۴۱ و ۴۴/۳ ساعت خواهد بود. براساس اطلاعات حاصل از این تحقیق حداکثر طول دوره کشت WCP سویه ۵۰۹ در فرمانتور ۳۵۰ لیتری به شرط مناسب بودن همه پارامتر های مؤثر در رشد باکتری بوردتلا پرتوزیس، معادل ۳۸ تا ۴۲ ساعت خواهد بود. یعنی حدودا" در این زمان جذب نوری معادل ۱/۲ بوده و میزان آنتی ژن PTX متصل به باکتری در بیشترین میزان خود خواهد بود.

در تحقیق مشابهی که توسط ایبسن و همکارانش در سال ۱۹۹۳ بر روی واکسن‌های WCP تولید شده در مرکز واکسن سازی سرم انستیتو دانمارک انجام دادند، با ترکیب روش های سونیکاسیون و شیمیایی، ساختار باکتری سیاه سرفه متلاشی شده و کل آنتی ژن های مؤثر در ایمنی زایی واکسن WCP اعم از (Filamentous hemagglutinin) FHA، (Outer membrane protein) OMP، AGG 2,3 (Agglutinogens)، PTX را در سه حالت single dose، supernatant و sediment استخراج نموده و با روش الایزا به ترتیب مقادیرآنتی ژن PTX را معادل ۵۴، ۷، ۴۷ نانو گرم در هر دز اندازه گیری نموده اند. هدف این محققین بررسی میزان این آنتی ژن ها در سری ساخت های مختلف تولید شده در این مرکز واکسن سازی و مقایسه آنها با واکسن های وارداتی امریکایی و حتی آنتی ژن های

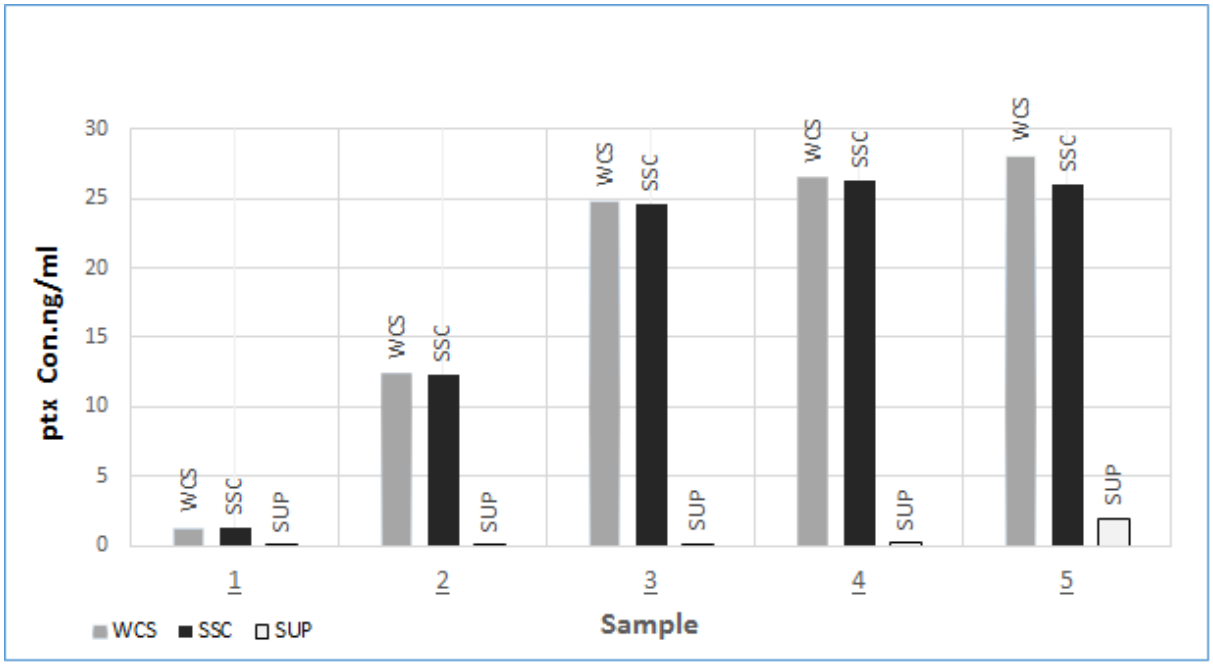
www.SID.ir

Archive of SID

واکسن‌های آسلولار ژاپنی بوده است. دراین تحقیق مقادیر LPS (Lipopolysaccharide) با روش LAL (Limulus Amebocyte Lysate)، پروتئین سنجی با روش کجلدال و آزمون LP انجام شده است (۱۰ و ۹).

در تحقیق مشابهی که وست دیج و همکارانش در سال ۱۹۹۷ در مرکز واکسن سازی NVI هلند انجام دادند به دنبال روشی جهت تضمین اثر بخشی واکسنWCP و تولید با کیفیت و پایداردر سری ساخت های مختلف (batch to batch consistency) بودند. به همین منظور آنتی‌ژن‌های مؤثر در ایمنی‌زایی باکتری بوردتلا پرتوزیس‌زایی(PTX، FHA و OMP) را بدون استخراج نمودن از باکتری، در سه حالت WCS، SSC و SUP در سویه ها و زمان های مختلف کشت فرمانتوری با استفاده از روش الایزا، مورد سنجش قرار دادند (۶).

کاربرد های متنوع و اهداف پیشنهادی این طرح تحقیقاتی میتواند مواردی شامل زیر باشند مثل، انتخاب و استفاده از سویه‌ای در تولید واکسن WCP که قادر به تولید میزان بیشتری از آنتی ژن PTX باشد، انتخاب محیط کشت مناسبی که موجب تولید هر چه بیشتر آنتی ژن PTX گردد، تعیین میزان کیفیت واکسن تولیدی، پایش پارامترهای مؤثر در روند تولید پایدار، بررسی تأثیر مراحل جداسازی باکتری از محیط کشت(Separation) بر میزان آنتی ژن PTX سطحی و بهینه سازی آن و مضافا بررسی تأثیر نوع غیر فعال سازی (فرمالین یا حرارت) بر میزان آنتی ژن PTX سطحی و بهینه سازی این روش، بررسی تأثیر طول دوره نگهداری واکسن در سردخانه بر میزان آنتی ژن PTX سطحی و بهینه سازی این فرآیند، سنجش کمی سایرآنتی ژن های موثر در ایمنی زایی علاوه بر PTX.



نمودار۱ : مقایسه آنتی ژن PTX نمونه های WCS ، SSC و SUP در زمان های مختلف کشت فرمانتوری

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه گیری

براساس اطلاعات حاصل از این تحقیق حداکثر طول دوره کشت WCP سویه ۵۰۹ در فرمانتور ۳۵۰ لیتری novo-paljas، به شرط مناسب بودن همه پارامترهای مؤثر در رشد باکتری بوردتلا پرتوزیس، معادل 38 تا ۴۲ ساعت خواهد بود. یعنی حدودا" در این زمان جذب نوری معادل ۱/۲ بوده و میزان آنتی ژن PTX متصل به باکتری در بیشترین میزان خود خواهد بود که نهایتا چون این واکسن حداکثر میزان آنتی ژن PTX متصل به باکتری را دارد بیشترین ایمنی زایی و مصونیت را در فرد واکسینه ایجاد خواهد نمود.

بر اساس مباحث مطرح شده و نتایج امید بخش حاصل از این تحقیق و تحقیقات مشابه انجام شده دراقصی نقاط دنیا، و به شرط معتبر سازی بیشتر و انجام تحقیقات گسترده تر مشترک و غیر مشترک، نتایج حاصل از این پروژه تحقیقاتی می‌تواند جهت انجام مطالعات تکمیلی، بهینه سازی فرآیندهای تولید، بهینه سازی روش های کنترل کیفیت فرآیندهای حین تولید و رفع مشکلات موجود در روند تولید پایدار واکسن سیاه سرفه با کیفیت (Consistency Approach)، حائزاهمیت وراه گشا باشد.

قدردانی

بدین وسیله از همکاران محترم بخش تولید واکسن-های باکتریایی پزشکی(DTP) و جناب آقای دکتر اکبر خراسانی بخاطر همکاری صمیمانه ایشان نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

منابع

1-Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. The lancet. 2010;375(9730):1969-87.
2-Van Der Ark AA, Hozbor DF, Boog CJ, Metz B, Van Den Dobbelsteen GP, Van Els CA. Resurgence of pertussis calls for re-evaluation of pertussis animal models. Expert review of vaccines. 2012;11(9):1121-37
3-National Institue of Public Healt and The Environment, Vaccine Technology Transfer centre. DTP Vaccine Production, 1998.Bilthoven: Netherland; 1998. P. 151-161
4-Carbonetti NH, Artamonova GV, Van Rooijen N, Ayala VI. Pertussis toxin targets airway macrophages to promote Bordetella pertussis infection of the respiratory tract. Infection and immunity. 2007;75(4):1713-20
5-WHO (2005a). Generic protocol for estimating the burden of pertussis in young children. Retrieved 16 April, 2008, from http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_IVB_05.15.p df.
6-Westdijk J, van den Ijssel J, Thalen M, Beuvery C, Jiskoot W. Quantification of cell-associated and free antigens in Bordetella pertussis suspensions by antigen binding ELISA. Journal of Immunoassay and Immunochemistry. 1997;18(3):267-84.
7-Ferencik M. "Hand book of Immunochemistry" SE1 8HN, Chapman and Hall, London 1993, p 310-363.
8-Jadhav S, Gairola S. Composition of acellular pertussis and combination vaccines: a general review. Biologicals. 1999;27(2):105-10.
9-Ibsen PH, Petersen JW, Heron I. Quantification of pertussis toxin, filamentous haemagglutinin, 69 kDa outer membrane protein, agglutinogens 2 and 3 and lipopolysaccharide in the Danish whole-cell pertussis vaccine. Vaccine. 1993;11(3):318-22.
10-WHO, Manual for quality Control of Diphtheria, Tetanus and Pertussis vaccines,WHO/IVB/11.11, 2013 April, 175-190

www.SID.ir

Archive of SID

Free and Cell Associated Pertussis Toxin Antigen Quantification to Determine *Bordetella Pertussis* Appropriate Harvesting Time by ELISA Method

Mozhgan Helalinasab [1], Mojtaba Noofeli [2*], Davoud Mohammadbagher[3]

1-Lecturer of Microbiology.
2-Assistant Professor of Medical Microbiology.
3-lecturer of Microbiology.

1-Islamic Azad University, Rasht Branch, Faculty of Basic Science, Gilan, Iran.
2-Department of Human Vaccines Research & Amp, Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
3-Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

⁎Corresponding author:
Mojtaba Noofeli; Department of Human Vaccines Research & amp; Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
Tel:+989188386718
Email: noofeli1234@yahoo.com

Abstract

Background and Objectives: Duration of whole cell pertussis (WCP) fermenter culture affects the quality and quantity of the *Bordetella pertussis* PTX production which directly influence in pertussis vaccine potency, and in this way, has a significant consequence on vaccine immunogenicity. The aim of this research was to quantify the cell associated and free pertussis toxin antigen by ELISA method to determine the optimal and appropriate harvesting time for WCP vaccine production.

Material and Methods: The PTX antigen levels were measured in three series of fermenter (350 L) batches (A, B and C) of WCP vaccine strain 509, cultivated in culture media B2 in optical densities of 0.1, 0.8, 1.1, 1.2, 1.3. Each sample was quantitatively evaluated in three modes of sediment, supernatant and suspension of WCP vaccine compared to standard pertussis toxin by ELISA and analyzed using Excel software.

Results: According to the analysis of the results which was interpreted based on maximum amount of the PTX antigen anchor to *Bordetella pertussis*, optimal duration of the fermenter (350 L) culture of WCP strain 509, was determined for 38 to 42 hours at optical density of 1.2.

Conclusion: Due to the disadvantages of turbidity method and the advantages of PTX antigen measurement by ELISA method (quantitative, qualitative and repeatability), this approach promises a reliable method in order to effectively control he parameters and procedures in the production process, in process quality control (IPQC) and consistency approach of WCP vaccine production.

Key words: WCP vaccine, PTX antigen, WCP fermenter cultivation, ELISA.

►*Please cite this paper as:*
Helalinasab M, Noofeli M, Mohammadbagher D. Free and Cell Associated Pertussis Toxin Antigen Quantification to Determine Bordetella Pertussis Appropriate Harvesting Time by ELISA Method. Jundishapur Sci Med J 2019; 18(2):193-203

Received: April 26, 2019 **Revised: July 22, 2019** **Accepted: July 23, 2019**

www.SID.ir