

Comparison of in vivo and in vitro methods for potency assay of Bordetella Pertussis vaccines

SH. Mousavi^{*}E. Asli^{**}A. Movahedi^{***}N. Harzandi^{****}V. Maljaee^{*****}

*M.Sc. in Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran

**Assistant Professor of Immunology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

***Assistant Professor of Bacteriology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

****Assistant Professor of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran

*****Instructor of Veterinary Medicine, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

*Abstract

Background: One of the main applications of laboratory animals is in quality control of vaccines. In vitro methods have been suggested as alternatives to in vivo animal testing because of its special problems.

Objective: The aim of this study was to compare in vivo and in vitro methods for potency assay of bordetella pertussis vaccines.

Methods: This experimental study was performed on a group of mice using different lots of reference or whole cell pertussis (wP) vaccine that were provided by Razi Vaccine & Serum Research Institute at this Institute in 2010. Mice were killed after immunization and their peritoneal cavities were lavaged and were cultured with challenge strain to determine nitrite concentration produced from macrophages and to assess immune response. Data were analyzed by comparison with a standard curve of sodium nitrite ($r=0.924$).

Findings: There were significant differences between results of in vivo and in vitro methods using different lots of wP vaccines. Macrophages from mice immunized with wP vaccine produced higher levels of nitric oxide than macrophages from mice of control groups.

Conclusion: With regards to the results, nitric oxide induction assay is more sensitive than Kendrick assay in potency assay of vaccine and provides the possibility of assessing low-titre vaccine. Therefore, it can be used as an alternative to reduce animal testing.

Keywords: Bordetella Pertussis, Vaccines, Macrophages, Nitric Oxide

Corresponding Address: Shaghayegh Mousavi, Microbiology Department, Faculty of Sciences, Karaj, Iran

Email: shmousavi3716@yahoo.com

Tel: +98-912-3827110

Received: 27 June 2012

Accepted: 9 Apr 2013

مقایسه آزمون‌های موجود زنده و آزمایشگاهی در تعیین توان واکسن بوردتلا پرتوسیسی

شقایق موسوی* دکتر اسماعیل اصلی** دکتر عبدالرضا موحدی*** دکتر ناصر هرزندی**** دکتر وفا ملجایی*****

* کارشناس ارشد میکروبی‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی کرج
** استادیار ایمنی‌شناسی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی
*** استادیار باکتری‌شناسی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی
**** استادیار میکروبی‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی کرج
***** مربی دام‌پزشکی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی

آدرس نویسنده مسؤول: کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم، گروه میکروبی‌شناسی، تلفن: ۰۹۱۳۳۸۲۷۱۱۰

Email: shmousavi3716@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۲/۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۷

* چکیده

زمینه: یکی از کاربردهای اصلی حیوان‌های آزمایشگاهی در مراکز تولید واکسن، آزمایش‌های کنترل کیفی است. به دلیل مشکلات خاص استفاده از حیوان‌ها در شرایط آزمایشگاهی، جای‌گزینی آن با آزمون‌های آزمایشگاهی (*in vitro*) پیشنهاد شده است.

هدف: مطالعه به منظور مقایسه آزمون موجود زنده (*in vivo*) با آزمون آزمایشگاهی در تعیین توان واکسن بوردتلا پرتوسیسی انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۹ در مؤسسه رازی بر روی گروهی از موش‌ها با رقت‌هایی از واکسن‌های ساخت همین مؤسسه انجام شد. در آزمون آزمایشگاهی بعد از طی دوره ایمن‌سازی، موش‌ها کشته شدند و مایع داخل حفره صفاقی آن‌ها جمع‌آوری و با سویه چلنج کشت داده شد تا غلظت نیتریک اکساید تولید شده از ماکروفاژها و پاسخ ایمنی ایجاد شده بررسی شود. داده‌ها با منحنی استاندارد نیترات سدیم تحلیل شدند ($r=0/924$).

یافته‌ها: اختلاف معنی‌دار آماری بین نتایج این دو روش آزمایش (در بدن موش و در شرایط آزمایشگاهی) با رقت‌های متفاوت واکسن تمام سلولی وجود داشت و ماکروفاژهای موش‌های ایمن شده با واکسن تمام سلولی، مقدار نیتریک اکساید بیش‌تری نسبت به گروه شاهد تولید کردند. **نتیجه‌گیری:** با توجه به یافته‌ها، آزمایش القای نیتریک اکساید نسبت به روش قدیمی آزمایش کندریک در تعیین توان واکسن حساس‌تر است و می‌توان واکسن‌های با عیار پایین را نیز ارزیابی کرد که می‌تواند به عنوان یک روش جای‌گزین برای کاهش استفاده از حیوان‌ها به کار رود.

کلیدواژه‌ها: بوردتلا پرتوسیسی، واکسن‌ها، ماکروفاژها، نیتریک اکساید

* مقدمه:

یکی از کاربردهای اصلی حیوان‌های آزمایشگاهی در مراکز تولید واکسن استفاده از آن‌ها در آزمایش‌های کنترل کیفی و تعیین توان واکسن‌هاست که رایج‌ترین آن‌ها آزمایش کندریک (در بدن موجود زنده) است. در این آزمایش تعداد زیادی موش از طریق تزریق داخل مغزی برای بررسی توانمندی واکسن بوردتلا پرتوسیسی استفاده می‌شوند این آزمایش با قدمت بیش از ۴۰ سال هنوز تنها آزمایشی است که حفاظت ایجاد شده توسط واکسن در کودکان را نشان می‌دهد. این آزمایش همواره از طرف گروه‌های حامی حیوان‌ها مورد انتقاد بوده است. از طرفی

سیاه سرفه یک بیماری باکتریایی است که عامل آن بوردتلا پرتوسیسی است. براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت میزان ابتلای سالانه آن در جهان ۲۰ تا ۴۰ میلیون نفر با مرگ و میری برابر با ۲۰۰ تا ۴۰۰ هزار نفر است. واکسن‌های سیاه سرفه تمام سلولی در سال ۱۹۵۰ ساخته شدند. واکسن‌های مؤثر اغلب به واکسن‌های ناخواسته تمایل دارند، لذا به کنترل و نظارت بیش‌تری در تولید واکسن‌ها نیاز است. فارماکوپه اروپا و سازمان جهانی بهداشت انجام آزمایش‌های کنترل کیفی را قبل از تولید و استفاده از این واکسن‌ها، لازم می‌دانند.^(۱)

* مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۹ در مؤسسه سرم‌سازی رازی انجام شد. به وسیله یک نرم‌افزار آماری تهیه شده توسط سازمان جهانی بهداشت ۱۷۸ موش از نژاد NIH به صورت تصادفی به ۱۶ گروه با وزن ۱۲ تا ۱۶ گرم و به طور مساوی از لحاظ جنسی تقسیم شدند: ۱۰ قفس با ۱۶ موش برای آزمایش کندریک و شش قفس با ۳ موش برای آزمایش القای نیتریک اکساید.

واکسن ۹۴/۵۳۲ به عنوان استاندارد در سه رقت مختلف (۱/۱، ۱/۵، ۱/۲۵) از مؤسسه ملی استاندارد و کنترل فرآورده‌های زیست‌شناسی انگلستان (NIBSC) تهیه شد. واکسن نمونه ساخت مؤسسه رازی در سه رقت (۱/۸، ۱/۴۰، ۱/۲۰۰) نیز برای تزریق به موش‌ها تهیه شد. سه رقت تهیه شده از واکسن‌های استاندارد و نمونه در حجم ۰/۵ سی‌سی (حدود ۱۶ میلیارد باکتری) به صورت داخل صفاقی به ۱۶ موش در هر قفس تزریق شد. یک قفس ۱۰ تایی به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند که واکسن دریافت نکردند و ایمن نشدند. ایمن‌سازی موش‌ها به مدت ۱۴ روز انجام شد. موش‌ها در شرایط استاندارد و در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد در حیوان‌خانه مؤسسه رازی نگهداری شدند.

۱۴ روز بعد از ایمن‌سازی، گروه کندریک سوپه ATCC ۱۸۳۲۳ بوردتلا پرتوسیس به عنوان سوپه چلنج با دوز کشنده ۱۰۰ تا ۵۰۰ LD50 (مقداری از باکتری که ۵۰ درصد موش‌ها را می‌کشد) به موش‌ها به صورت داخل مغزی تزریق شد. ۱۴ روز پس از تزریق سوش حاد ATCC ۱۸۳۲۳ (بانک میکروب آمریکا)، تعداد موش‌های زنده و مرده براساس دوز تزریق شده بررسی شدند. نتایج به دست آمده با نرم‌افزار آماری Combistats تحلیل و توانمندی واکسن بررسی شد.

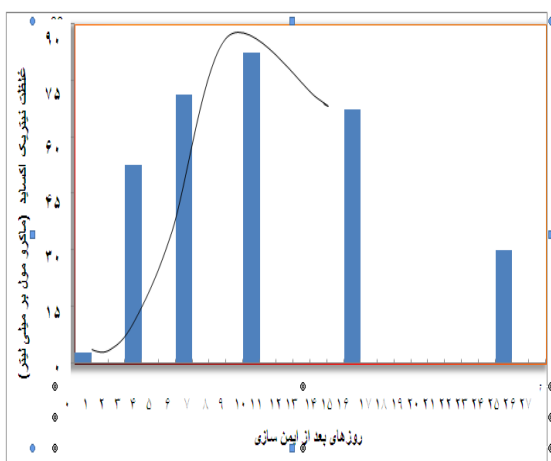
۱۴ روز بعد از ایمن‌سازی موش‌های گروه القای نیتریک اکساید با واکسن استاندارد و نمونه، موش‌ها با گاز کشته شدند و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نمکی بافر فسفات (PBS) به داخل شکم آن‌ها تزریق شد. بعد از چند دقیقه

به دلیل مشکلات خاص استفاده از حیوان‌های آزمایشگاهی (نگهداری و هزینه‌های آن) و توصیه‌های سازمان جهانی بهداشت و کمیسیون اروپایی فارماکوپه برای کاهش استفاده از حیوان‌های آزمایشگاهی در آزمایش‌های مربوط به واکسن، جای‌گزینی این آزمایش‌ها با روش‌های آزمایشگاهی (in vitro) ارایه شده است. با توجه به مشکلات آزمایش کندریک، توسعه یک روش جای‌گزین احساس می‌شود.^(۲-۴)

آزمایش‌های متعدد نشان داده‌اند که بوردتلا پرتوسیس می‌تواند داخل ماکروفاژهای ریه زنده بماند و ایمنی وابسته به سلول نقش اصلی را در حفاظت علیه بیماری دارد. ماکروفاژها در اثر واکسن تمام سلولی فعال می‌شوند و نیتریک اکساید تولید می‌کنند. بعد از وارد شدن این میکروارگانیسم به داخل ماکروفاژها، این سلول‌ها فعال می‌شوند تا باکتری داخل سلولی را از بین ببرند. ماکروفاژها با تولید واسطه‌های اکسیژن و آزاد کردن آنزیم‌های هضم کننده در این فرایند شرکت می‌کنند. نیتریک اکساید واسطه بالقوه مهمی در سیستم ایمنی است.^(۶و۵) تولید نیتریک اکساید به وسیله ماکروفاژهای فعال شده موش‌ها یک مکانیسم مؤثر علیه چندین پاتوژن است. آزمایش القای نیتریک اکساید یکی از روش‌های آزمایشگاهی در تعیین توان واکسن است که بر مبنای تولید عامل نیتریک اکساید در اثر فعال شدن ماکروفاژها، متعاقب واکنش شدن موش القا می‌شود. مقدار نیتریک اکساید تولید شده به دوز واکسن تزریق شده بستگی دارد. بین مقدار نیتریک اکساید با ایمنی ایجاد شده در شرایط آزمایشگاهی ارتباط مستقیم وجود دارد.^(۴) این آزمایش در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند جای‌گزین مناسبی برای آزمایش کندریک باشد. بر این اساس، مطالعه حاضر با هدف مقایسه آزمون کندریک (in vivo) با آزمون آزمایشگاهی (in vitro) در تعیین توان واکسن بوردتلا پرتوسیس انجام شد.

۱۰ بعد از ایمن‌سازی بود. غلظت نیتریک اکساید تولید شده ۱۰ روز بعد از ایمن‌سازی تقریباً ۳۵ برابر موش‌های گروه شاهد بود (نمودار شماره ۱).

نمودار ۱- تعیین غلظت نیتریک اکساید تولید شده براساس زمان در موش‌های ایمن شده با واکسن کلاسیک سیاه سرفه



در دوزهای مختلف هرچه غلظت واکسن تزریق شده بالاتر بود؛ مقدار نیتریک اکسایدها هم بالاتر بود. در بدن موش هرچه دوز واکسن بالاتر بود، موش‌های کشته شده کم‌تر شد. در دوز ۱/۸، میزان نیتریک اکساید ۱۰ میکرومول بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد و تعداد موش‌های زنده ۱۸ درصد بود. در دوز ۱/۴۰، میزان نیتریک اکساید ۴۳ میکرومول بر میلی‌لیتر و تعداد موش‌های زنده ۶۲ درصد بود. در دوز ۱/۲۰۰، میزان نیتریک اکساید ۶۰±۵/۸ میکرومول بر میلی‌لیتر و تعداد موش‌های زنده ۸۲ درصد بود. ضریب همبستگی بین آزمون کندریک و آزمون القای نیتریک اکساید حدود ۰/۹۳۴ تعیین شد ($P < 0/0001$).

نتایج توان واکسن سیاه سرفه در آزمون کندریک و القای نیتریک اکساید در ۵ نمونه از موش‌های مورد آزمایش بررسی شد (جدول شماره ۲).

مایع داخل حفره شکمی که حاوی ماکروفاژ است با سرنگ خارج شد. مایع داخل شکمی هر گروه سه تایی در یک لوله جمع آوری، شستشو و سانتریفیوژ شد. در داخل هر لوله ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI 1640 (Memorial Institute formulation Roswell Park) ریخته و ۱ میلی‌لیتر از سوش حاد ۱۸۳۲۳ بوردتلا پرتوسیس غیرفعال، داخل پلیت ۱۲ خانه‌ای و ۱ میلی‌لیتر از نمونه داخل پلیت ریخته شد. نمونه‌ها شامل محیط RPMI 1640 و مایع حفره شکمی بود. برای هر نمونه ۲ خانه در نظر گرفته شد. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد و سپس با ۲ میلی‌لیتر از معرف گریس (Greiss) مخلوط شد. بعد از ۱۰ دقیقه، نتایج با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده و با منحنی استاندارد به دست آمده از نیترات سدیم سنجیده شد.

* یافته‌ها:

توان واکسن استاندارد به روش کندریک ۷/۶ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر و واکسن نمونه ۴/۹ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر تعیین شد (جدول شماره ۱).

جدول ۱- نتایج آزمایش توان واکسن تمام سلولی پرتوسیس به روش کندریک

نام واکسن	تعداد موش‌ها	رقت‌های تهیه شده	تعداد موش‌های زنده و مرده بعد از ۱۴ روز		نتایج پوتسی (واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر)
			زنده	مرده	
واکسن استاندارد (NIBSC)	۱۶	۱/۱	۱۳±۲	۲±۱	۷/۶±۰/۲
	۱۶	۱/۵	۱۲±۲	۴±۲	
	۱۶	۱/۲۵	۸±۴	۸±۴	
واکسن نمونه مؤسسه رازی	۱۶	۱/۸	۱۰±۳	۶±۳	۴/۹±۱/۳
	۱۶	۱/۴۰	۹±۳	۷±۳	
	۱۶	۱/۲۰۰	۶±۳	۱۰±۳	

در القای نیتریک اکساید، افزایش تولید نیتریک اکساید در کشت ماکروفاژ از موش‌های ایمن شده در روز سوم بعد از ایمن‌سازی شروع شد. حداکثر تولید نیتریک اکساید در روزهای ۹ تا ۱۲ و بیش‌ترین مقدار آن در روز

جدول ۲- نتایج توان واکسن سیاه سرفه (واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر) در آزمون کندریک و القای نیتریک اکساید

نمونه موش‌های مورد مطالعه	القای نیتریک اکساید	کندریک
۱	۱/۲	۲/۷
۲	۲/۷	۳/۳
۳	*-۰/۰۵	۲
۴	۴	۶/۸
۵	۵/۳	۴/۴
نتیجه	۳/۳	۳/۸۴

* در روش القای نیتریک اکساید مقادیر بسیار کم نیتریک اکساید (۰/۰۵ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر) نیز قابل اندازه‌گیری بود که در تحلیل آماری در نظر گرفته نشد.

* بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد که القای نیتریک اکساید توسط ماکروفاژ را می‌توان به عنوان نشانه‌ای از توان واکسن در نظر گرفت. در این بررسی هرچه دوز تزریقی بالاتر بود میزان نیتریک اکساید تولید شده از ماکروفاژ هم بالاتر بود. ماکروفاژ در اثر فعال شدن یک نقش محوری در ایمنی محافظت کننده در برابر آنتی‌ژن سیاه سرفه ایجاد کرد و تعداد حیوان‌های مورد استفاده برای آزمایش توان را کاهش داد (۴۸ موش در روش کندریک در برابر ۹ موش در روش القای نیتریک اکساید). همچنین با استفاده از این روش امکان ارزیابی واکسن‌های با عیار پایین نیز امکان پذیر بود. در روش القای نیتریک اکساید، تزریق داخل مغزی لازم نیست و موش‌ها کم‌تر مورد آزار قرار می‌گیرند، ولی در روش کندریک سوش ۱۸۳۲۳ به صورت داخل مغزی به موش‌ها تزریق می‌شود.^(۸)

نتایج این مطالعه ارتباط مهم و قابل اطمینانی را بین رقت‌های واکسن و القای نیتریک اکساید نشان داد. نیتریک اکساید و واسطه‌های نیتروژن (نیتریک و نیترات) به عنوان تنظیم‌کننده در سیستم ایمنی اهمیت دارند.^(۹) فعال شدن ماکروفاژها که به وسیله واکسن تمام سلولی انجام می‌شود با القای سنتز نیتریک اکساید مرتبط است که به وسیله ماکروفاژها در پاسخ به تحریک با آنتی ژن‌های بوردتلا پرتوسیسی در شرایط آزمایشگاهی تولید

می‌شود. تولید نیتریک اکساید در کشت‌هایی که با واکسن تمام سلولی و بدون سلولی تلقیح می‌شوند (زمانی که با باکتری بوردتلا پرتوسیسی غیرسمی شده تحریک می‌شوند) پایین‌تر از زمانی است که با سلول‌های کشته شده بوردتلا پرتوسیسی تحریک می‌شوند. در موش‌هایی که با واکسن تمام سلولی سیاه سرفه ایمن می‌شوند در تحریک با سلول‌های کشته شده ظرف ۳ تا ۴ روز در شرایط آزمایشگاهی نیتریک اکساید تولید می‌شود.

ایمنی سلولی نقش مهمی در فعال کردن ماکروفاژها دارد تا باکتری‌های مهاجم را از بین ببرند. ماکروفاژهای جدا شده از موش‌های دریافت‌کننده واکسن تمام سلولی، تقریباً ۴۰ تا ۵۰ برابر نیتریک اکساید بیش‌تری نسبت به گروه شاهد تولید می‌کنند.^(۹) غلظت نیتریک اکساید تولید شده در موش‌هایی که توسط واکسن تمام سلولی پرتوسیسی ایمن شده‌اند ۵/۵ برابر موش‌های ایمن شده با واکسن بدون سلولی است. غلظت نیتریک اکساید در کشت سلول‌های ماکروفاژ، درجه فعال شدن ماکروفاژها را مشخص می‌کند که با تأثیر حفاظتی القا شده توسط واکسن ارتباط دارد و می‌تواند توان واکسن را نشان دهد.^(۴)

این مطالعه نشان می‌دهد که ماکروفاژها در موش‌های ایمن شده با واکسن تمام سلولی می‌توانند در شرایط آزمایشگاهی به آنتی ژن‌های پرتوسیسی به وسیله القای نیتریک اکساید پاسخ دهند. بنابراین تولید نیتریک اکساید می‌تواند به عنوان یک نشانه از فعال شدن ماکروفاژها در موش‌های ایمن شده با واکسن تمام سلولی در نظر گرفته شود.

مطالعه مشابهی برای اولین بار در مؤسسه NIBSC انگلستان توسط دکتر زینگ و همکاران انجام شد و به نتایج قابل قبولی در خصوص القای نیتریک اکساید رسیدند و نتایج آن‌ها با مطالعه حاضر همخوانی داشت.^(۵) به طور کلی، این مطالعه نشان داد که آزمایش القای نیتریک اکساید نسبت به روش معمول (کندریک) در تعیین توان واکسن مزیت‌های بیش‌تری داشت؛ از جمله کاهش استفاده از حیوان‌های آزمایشگاهی. رعایت

5. Xing DK, Canthaboo C, Corbel MJ. Nitric oxide induction in murine macrophage and spleen cells by whole-cell *Bordetella pertussis* vaccine. *Vaccine* 1998 Jan; 16 (1): 16-23
6. Xing DK, Canthaboo C, Corbel MJ. Effect of pertussis toxin on the induction of nitric oxide synthesis in murine macrophages and on protection in vivo. *Vaccine* 2000 Apr 14; 18 (20): 2110-9
7. Metz B, Hendriksen CF, Jiskoot W, Kersten GF. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. *Vaccine* 2002 Jun 7; 20(19-20): 2411-30
8. Canthaboo C, Xing D, Wei XQ, Corber MJ. Investigation of role of nitric oxide in protection from *Bordetella pertussis* respiratory challenge. *Infect Immun* 2002 Feb; 70 (2): 679-84
9. Hendriksen CF. Refinement, reduction, and replacement of animal use for regulatory testing: current best scientific practices for the evaluation of safety and potency of biologicals. *ILAR J* 2002; 43 Suppl: S43-8

ملاحظات اخلاقی، صرفه‌جویی در زمان (۱۵ روز در مقابل ۲۱ روز) و کاهش هزینه نگهداری حیوان‌ها. از این رو آزمایش سنجش نیتریک اکساید را می‌توان به عنوان روش جای‌گزین کندریک پیشنهاد نمود.

در صورت جای‌گزینی این روش به جای روش کندریک، ضرورت تعیین صحت توان از طریق سنجش نیتریک اکساید و همچنین استفاده از آن در مورد واکسن بدون سلولی سیاه سرفه پیشنهاد می‌شود.

* مراجع:

1. Tramper J, Martens DE, Graaf TW. Whooping cough vaccines: production of virulent *B. pertussis*. 2008 May; 4474:180-2
2. Canadian Council on Animal Care (CCAC). Three Rs introduction. Available at: <http://CCAC-page-Three-Rs-introduction.mht>. Accessed in: 2008
3. Larfars G, Lantoin F, Devynck MA, et al. Activation of nitric oxide release and oxidative metabolism by leukotriene B4, C4 and D4 in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 1999 Feb 15; 93 (4): 1399-405
4. Canthaboo C, Xing D, Corbel M. Development of a nitric oxide induction assay as a potential replacement for the intracerebral mouse protection test for potency assay of pertussis whole cell vaccine. *Dev Biol Stand* 1999; 101: 95-103