مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۷، مهر ۱۳۹۶
صفحه: ۵۴۶-۵۳۷

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No.7, Oct 2017
Pages:537-546

مقایسه پاسخ‌های ایمنی هومورال متعاقب تجویز آنتی‌ژن نوترکیب ESAT-6/CFP-10 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در سه مسیر مختلف

مژده نامورپور [۱]، رضا منصوری مجومردی [۲]، مجید تبیانیان [۳*]

چکیده

مقدمه: بیماری سل به عنوان یکی از معضلات بهداشتی قرن حاضر محسوب می شود. واکسن BCG به عنوان تنها واکسن موجود علیه این بیماری می باشد که پاسخ‌های محافظتی آن تغییرات فراوانی را به همراه دارد. به همین دلیل، مطالعه در مورد ایجاد و توسعه واکسنی جدید علیه توبرکلوزیس، از موضوعات نوین تحقیقاتی است. در این مطالعه تأثیر مسیرهای تجویز، درون‌بینی، زیرجلدی و داخل عضلانی بر ایجاد ایمنی هومورال محافظتی علیه آنتی ژن نوترکیب ESAT6/CFP-10 توبرکلوزیس مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در ابتدا آنتی‌ژن نوترکیب ESAT6/CFP-10 مورد ارزیابی اولیه و تایید قرار گرفت. آنتی‌ژن فوق در سه مسیر درون‌بینی، عضلانی و زیرجلدی، درسه مرحله وبه فواصل زمانی دوهفته‌ای، همراه با یا بدون ادجوانت به موش‌های Balb/C تجویز شدند. برای مسیرهای تجویز عضلانی و زیرجلدی، ادجوانت MF59 و برای مسیر تجویز درون‌بینی از ادجوانت CTB استفاده شد. ۱۰ روز پس ازهر تجویز، از ورید اربیتال چشمی موش‌ها خون‌گیری به عمل آمد و میزان آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن فوق به روش الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان دادند که موش‌های واکسینه با آنتی‌ژن نوترکیب در مقایسه با گروه‌های کنترل، تیتر آنتی‌بادی اختصاصی بالاتری دارند. اگرچه مسیرهای تزریق زیرجلدی و داخل عضلانی هر دو به سرعت قادر به ایجاد پاسخ ایمنی مناسبی بودند اما پاسخ ایمنی ایجاد شده از مسیر درون‌بینی نیز به تدریج افزایش داشت تا به مقادیر قابل قبول رسید.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست امده از این تحقیق می تواند در فرمولاسیون واکسن های مخاطی نوترکیب برعلیه بیماری سل مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، تزریق داخل عضلانی، تزریق زیرجلدی، تجویز درون‌بینی، ESAT-6/CFP10

۱- کارشناس ارشد ایمونولوژی پزشکی، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
۲- استادیار ایمونولوژی پزشکی، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
۳- استادیار ایمونولوژی پزشکی، بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
***(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۲۶۳۴۵۷۰۰۳۸ ، پست الکترونیکی:** mtebianian@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۵

مقدمه

بیماری سل یا توبرکلوزیس به عنوان طاعون سفید شناخته شده که بشر از دیرباز تاکنون با آن مواجه بوده است. شیوع این بیماری کشنده، طبق آمار سازمان بهداشت جهانی به گونه ایست که حدود یک‌سوم جمعیت جهانی را آلوده و سالانه حدود ۳ میلیون نفر جان خود را در اثر این عامل از دست می‌دهند (۱،۲). این سازمان پیش‌بینی کرده است که در صورت متوقف نکردن رشد بیماری، طی بیست سال آینده، ۷۰ میلیون نفر جان خود را از دست خواهند داد (۲،۳).

علی‌رغم تلاش‌های بسیاری که در دهه‌های اخیر صورت گرفته، تنها واکسن موجود و مورد استفاده در سراسر دنیا، در تمامی این سال‌ها، واکسن BCG است که به علت محدودیت‌هایی چون عدم ایجاد پاسخ ایمنی کافی، عدم ایجاد پاسخ در بیماران مبتلا به HIV با توجه به شیوع بالای HIV در سال‌های اخیر، کاهش کارایی واکسن در بالغین، اثر بر روی تست تشخیصی توبرکولین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی موجود علیه سل و افزایش بروز بیماری در کشورهای در حال توسعه واکسنی کارآمد در پیشگیری و مقابله با این عفونت به شمار نمی‌آید (۴-۶).

بنابراین طراحی واکسن مناسب، مؤثرترین گام در پیشگیری از این بیماری است. در یک واکسن ایده آل، انتخاب صحیح آنتی‌ژن واکسن، ادجوانت و مسیر و نحوه تجویز نقش اساسی دارند (۷).

عامل این بیماری خطرناک جهانی، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است؛ که امروزه بسیاری از آنتی‌ژن‌های آن شناخته شده‌اند. در میان آن‌ها دو فراکشن ۳۵-۲۵ کیلودالتونی و کمتر از ۱۴ کیلو دالتونی دارای آنتی‌ژن‌های با قدرت ایمنی‌زایی بالا می‌باشند (۷). اخیراً مطالعاتی که بر نقش ناحیه ژنی RD1 در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس صورت گرفته بیان می‌کنند که این ناحیه کد کننده ۲ پروتئین ترشحی مهم ESAT6 (6KD Early Secretory Antigen Target) و CFP10 (10 KD Culture Filterate Protein) است (۴،۸). از ویژگی‌های مهم این دو آنتی‌ژن عدم حضور آن‌ها در واکسن BCG است. ناحیه ژنی RD1 در تمامی مایکوباکتریوم‌های پاتوژن شامل توبرکلوزیس بوویس و آفریکانوم وجود دارد اما از واکسن BCG حذف شده است که منجر به عدم ایجاد پاسخ ایمنی در افراد واکسینه شده با BCG می‌گردد و از مزایای انتخاب این آنتی‌ژن‌ها به عنوان کاندیدای واکسن جدید سل است (۴،۹).

مطالعات صورت گرفته بر روی این دو آنتی‌ژن نشان داده‌اند که ESAT6 و CFP10 محرک قوی ایمنی سلولی و تحریک تولید IFNγ بوده در حالی که قادرند سیستم ایمنی هومورال را نیز تحریک کنند و تیتر آنتی بادی‌های اختصاصی را به طور قابل‌توجهی افزایش دهند (۱۰،۱۱). همچنین مشاهده شده است که ترکیب این دو آنتی‌ژن منجر به ایجاد پاسخ‌های قوی‌تری می‌شود.

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، پاتوژنی داخل سلولی ست و از طریق هوا منتقل می‌شود. موضع هدف اصلی این باکتری ریه‌ها و سیستم تنفسی فوقانی و غشای مخاطی آن‌هاست که منجر به عفونت حاد یا مزمن دستگاه تنفسی می‌گردد (۱۲،۱۳)؛ بنابراین در دفاع علیه این عفونت، پاسخ ایمنی مخاطی و سلولی بسیار حائز اهمیت هستند. به نظر می‌رسد بهترین راه پیشگیری علیه این بیماری تقویت سیستم ایمنی ناحیه مخاطی دستگاه تنفسی به عنوان محل هدف باکتری است.

مسیر تجویز درون‌بینی، انتخابی مناسب جهت القا پاسخ ایمنی به شمار می‌آید. این مسیر در مقایسه با سایر مسیرهای تجویز دارای مزایای بسیاری می‌باشد ازجمله: غیرتهاجمی بودن و عدم استفاده از سرسوزن، راحتی تجویز، تحریک پاسخ ایمنی مخاطی و افزایش پاسخ‌های ایمنی سیستمیک (۱۳).

به‌منظور دریافت پاسخی کاملاً مناسب می‌بایست ادجوانت‌هایی به همراه آنتی‌ژن مورد استفاده قرار بگیرند که منجر به افزایش و جهت دهی پاسخ‌های ایمنی در مسیر تجویزی مورد نظر گردد.

ادجوانت‌های افزایش دهنده ایمنی سلولی و قابل استفاده در مسیرهای مخاطی، می‌توانند برای طراحی واکسن انتخاب شوند. مولکول CTB از جمله ادجوانت‌های محرک سیستم ایمنی هومورال و سلولی و مخاطی است که در مقالات مختلف مورد

بررسی قرار گرفتند (۱۴-۱۱). همچنین MF59 نیز از بهترین محرک‌های ایمنی سلولی و هومورال اختصاصی است اما در مسیر مخاطی قابل استفاده نیست (۱۹-۱۵).

در این مطالعه؛ هدف ارزیابی ایمنی هومورال ناشی از آنتی‌ژن نوترکیب ESAT6/CFP10 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در سه مسیر مختلف تجویز، داخل عضلانی، زیرجلدی و درون‌بینی است.

روش بررسی

روش مطالعه تجربی و نوع مطالعه بنیادی-کاربردی است. به منظور انجام این ارزیابی ابتدا آنتی‌ژن نوترکیب ESAT6/CFP10 توسط بخش بیوتکنولوژی موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی فراهم شد. به منظور تائید خالص بودن و اندازه‌گیری وزن مولکولی فیوژن حاصل از ESAT6 و CFP10، از الکتروفورز به روش SDS PAGE استفاده شد. درصد ژل مورد استفاده برای جداسازی، 15 % Resolving Gel و 4 % Stacking Gel بود. پس از رسوب نمونه‌های آنتی‌ژن نوترکیب ESAT6/CFP10، بر روی ژل و با توجه به محل قرار گرفتن باندهای با اندازه مشخص (مارکر)، وزن مولکولی باندهای آنتی‌ژن نوترکیب ESAT6/CFP10 حدود ۲۴ کیلودالتون شناسایی شد. برای انجام این تحقیق تعداد ۳۵ سر موش Balb/c Inbred ماده با سن ۶ الی ۸ هفته با وزن تقریبی ۵±۲۵ گرم، از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی فراهم و به ۷ گروه ۵ تایی تقسیم‌بندی شد. تمامی موش‌ها تحت شرایط استاندارد در دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. چرخه روشنایی و تاریکی به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی برقرار بود. هر حیوان فقط یک بار مورد آزمایش قرار گرفت و در طی آزمایش‌ها، آب و غذای کافی در اختیار حیوانات قرار داشت. ادجوانت‌های مورد نیاز در هر مسیر تجویز نیز متفاوت بودند. برای مسیرهای تجویز عضلانی و زیرجلدی، ادجوانت MF59 (موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی) و برای مسیر تجویز درون‌بینی از ادجوانت CTB (SIGMA™) استفاده شد که به صورت تجاری فراهم شدند. طبق مطالعات میزان آنتی‌ژن در هر تجویز (عضلانی، زیرجلدی و درون‌بینی) برای هر موش ۲۰ میلی‌گرم و دوز تزریق عضلانی و زیرجلدی برای هر موش ۱۰۰ میکرولیتر و دوز تجویز درون‌بینی برای هر موش ۱۵ میکرولیتر است. نسبت آنتی‌ژن به ادجوانت MF59، ۱ به ۱ و نسبت آنتی‌ژن به ادجوانت CTB، ۲ به ۱ بوده است. الگوی ایمن‌سازی به صورت سه تجویز با فاصله ۲ هفته (روزهای ۰ و ۱۴ و ۲۸) تعیین شد. از کلیه حیوانات در فواصل زمانی ۱۰ روزه، در روزهای ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ به میزان حدود ۵۰ میکرولیتر از ورید اربیتال چشمی خون‌گیری به عمل آمد. سپس با دور ۳۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریوفوژ شده و سرم‌ها به میزان ۱۰ میکرولیتری تقسیم‌بندی یا aliquot کرده و در میکروتیوب‌ها به صورت مجزا جداسازی گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام بررسی‌های ایمونولوژیکی نگهداری شد.

به منظور ارزیابی میزان آنتی‌بادی اختصاصی تولید شده علیه آنتی‌ژن نوترکیب پروتئینی ESAT6/CFP10 از کلاس IgG، از تکنیک الایزای غیرمستقیم استفاده کردیم. برای انجام تست الایزا، غلظت ایده‌آل آنتی‌ژن به منظور کوت کردن در کف پلیت‌ها براساس Checkerboard طراحی شده، ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. در هر چاهک از پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن حل شده در بافر کوت‌کننده (بافر بی‌کربنات ۰/۰۵ مولار با pH= ۹/۶ بود) را ریخته شد و به مدت یک شب در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

پس از طی مدت زمان یاد شده، محتویات پلیت‌ها را خالی کرده و سه بار با بافر شستشو (PBS حاوی ۰/۰۵ توئین ۲۰ با pH = ۷/۲) به مدت ۲ دقیقه شستشو داده شد. سپس بافر مسدودکننده (شیرخشک ۵٪) که به صورت تازه تهیه شد را به میزان ۳۰۰ میکرولیتر در تمامی چاهک‌ها ریخته و به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. پس از یک ساعت، محتویات پلیت‌ها خالی و سه بار با بافر شستشو، شستشو داده شد. سرم‌ها را دفریز و به نسبت ۱ به ۱۰ در شیرخشک ۲٪ رقیق نموده و از هر نمونه به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک ریخته و نمونه‌های خون‌گیری دوم و سوم را به صورت دوتایی گذاشتیم. به عنوان کنترل منفی در چهار چاهک به جای سرم رقیق شده از PBS استفاده شد. مجدداً به مدت ۱ ساعت در

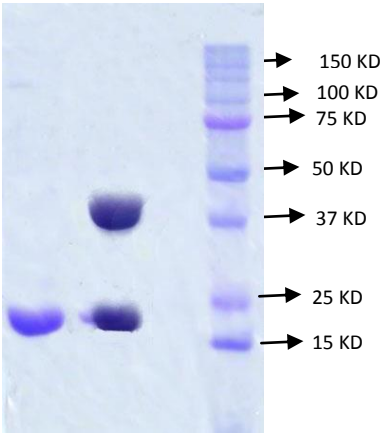
انکوباتور ۳۷ درجه قرار دادیم. پس از طی یک ساعت، مطابق قبل، سه بار شستشو داده شد. سپس آنتی‌بادی اختصاصی کونژوگه با آنزیم HRP (HRP) congugated Rabbit Anti- Mouse (SIGMA™)، را به نسبت ۱ به ۲۰۰۰۰ درون شیر خشک ۲٪ ، رقیق شده و بلافاصله به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک ریخته شد. روی پلیت را کاملاً پوشیده شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه و در تاریکی انکوبه گردید. پس از طی مدت زمان یاد شده، محتویات پلیت‌ها را خالی کرده و پنج بار با بافر شستشو، شستشو داده و کاملاً خشک نمودیم. شستشو در این مرحله بسیار مهم است تا از ایجاد مثبت کاذب یا اتصالات غیراختصاصی آنتی‌بادی جلوگیری شود. در این مرحله، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای ترامتیل بنزیدین (TMB) (Merck™) را در هر چاهک از پلیت ریخته و بلافاصله روی آن را با فویل پوشانده و مدتی در دمای اتاق در تاریکی قرار دادیم. بعد از حدود ۱۰دقیقه و به محض مشاهده تغییر رنگ در نمونه‌های کنترل، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده (اسیدسولفوریک ۱۰٪ Merck™) را بر روی محتویات چاهک‌ها ریخته شد. میزان جذب نوری نمونه‌ها به‌وسیله دستگاه ELISA reader (Biotek™) در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

جدول ۱: نحوه تزریق و فرمولاسیون آنتی ژن در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌های مورد مطالعه	توضیحات
گروه A	گروه تزریق عضلانی آنتی‌ژن به همراه ادجوانت MF59
گروه B	گروه تزریق عضلانی آنتی‌ژن بدون ادجوانت
گروه C	گروه تزریق زیرجلدی آنتی‌ژن به همراه ادجوانت MF59
گروه D	گروه تزریق زیرجلدی آنتی‌ژن بدون ادجوانت
گروه E	گروه تجویز درون‌بینی آنتی‌ژن به همراه ادجوانت CTB
گروه F	گروه تجویز درون‌بینی آنتی‌ژن بدون ادجوانت
گروه G	گروه PBS (گروه کنترل اصلی)

یافته‌ها

ارزیابی وزن مولکولی ESAT-6/CFP-10 بوسیله الکتروفورز نشان داد که غلظت آنتی‌ژن نوترکیب برابر با ۴/۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر است.



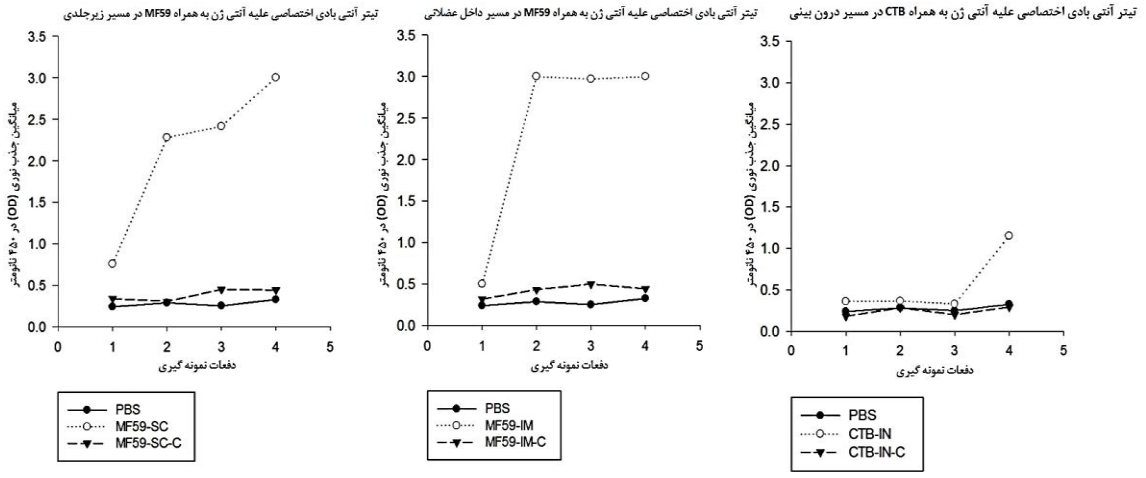
شکل ۱: الکتروفورز آنتی‌ژن نوترکیب ESAT6/CFP10 به روش SDS PAGE

از سمت راست، ستون ۱: مارکر، ستون ۲: باندهای آنتی‌ژن نوترکیب ESAT6/CFP10 در حالت غیر احیا، ستون ۳: باندهای آنتی‌ژن نوترکیب ESAT6/CFP10 در حالت احیاشده با مرکاپتواتانول

خون‌گیری از سینوس اوربیتال چشمی موش‌ها در روزهای ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ ام انجام شد و پس از جداسازی سرم، با روش الایزا غیرمستقیم تیتر آنتی‌بادی اختصاصی از کلاس IgG علیه آنتی‌ژن نوترکیب ESAT-6/CFP-10 به صورت سه‌گانه (Triplicate) اندازه‌گیری شد. نتایج به دست آمده نشان داد که میانگین تیتر پاسخ IgG اختصاصی مطابق جدول ۱ طی چهار مرحله خون‌گیری، در مسیرهای داخل عضلانی، زیرجلدی و درون‌بینی در مقایسه با گروه‌های کنترل هر یک از مسیرهای زیر جلدی، داخل عضلانی و درون‌بینی و گروه کنترل PBS، افزایش داشته است. بنا بر نتایج آماری حاصل از آنالیزهای آماری One way ANOVA و Paired T-Test، اختلاف میانگین جذب نوری در چهار مرحله خون‌گیری، بین گروه‌های مسیر تزریق عضلانی آنتی‌ژن و مسیر تزریق زیرجلدی معنی‌دار نبوده ولی اختلاف میان گروه‌های مسیر تزریق عضلانی و زیرجلدی با مسیر تجویز درون‌بینی آنتی‌ژن معنی‌دار بوده است (P value < 0.01). میانگین جذب نوری حاصل از دومین خون‌گیری در موش‌هایی که آنتی‌ژن نوترکیب ESAT6/CFP10 را در مسیر داخل عضلانی دریافت کرده بودند به اوج یا پیک پاسخ خود رسید (میانگین جذب نوری = ۳). در مسیر زیر جلدی این روند با سرعتی کمتر اما به همان شدت در آخرین نمونه‌گیری به حداکثر پاسخ رسید (میانگین جذب نوری = ۳) و در مورد مسیر درون‌بینی، میانگین جذب نوری پاسخ‌ها در آخرین مرحله خون‌گیری افزایش قابل‌توجهی نسبت به گروه کنترل داشت (میانگین جذب نوری = ۱/۱۵).

جدول ۲: میانگین و انحراف استاندارد جذب نوری حاصل از میزان تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن در سه گروه مختلف تجویز

گروه‌های مورد مطالعه	میانگین	انحراف معیار
گروه کنترل PBS	۰/۲۷۵	۰/۰۳۹
گروه تزریق عضلانی آنتی‌ژن به همراه ادجوانت MF59	۲/۳۶۷	۱/۲۴۶
گروه تزریق زیرجلدی آنتی‌ژن به همراه ادجوانت MF59	۲/۱۱۲	۰/۹۵۸
گروه تجویز درون‌بینی آنتی‌ژن به همراه ادجوانت CTB	۰/۵۵۱	۰/۳۹۹



نمودار ۱: میانگین جذب نوری حاصل از میزان تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن در سه گروه مختلف تجویز در دفعات مختلف نمونه‌گیری

بحث

مطالعات اخیر نشان می‌دهند که نحوه و مسیر تجویز واکسن در ایجاد پاسخ ایمنی نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کند. مسیرهای متفاوت تجویز منجر به تغییراتی در الگوی تولید آنتی‌بادی و سایتوکاین‌ها و همچنین تحریک سلول‌های مختلف

ایمنی می‌گردد (۲۰). در این بین بسیاری از روش‌های تجویزی، از جمله تنفسی، داخل عضلانی، زیرجلدی، درون‌بینی، خوراکی و ... برای تجویز آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مورد بررسی قرار گرفته شده است (۲۱-۲۳).

مسیر تزریق داخل عضلانی، یکی از مسیرهای تهاجمی تجویز آنتی‌ژن و از رایج‌ترین مسیرها به منظور تزریق دارو محسوب می‌شود. مطالعات متعددی بر روی پاسخ‌های ایمنی ناشی از تزریق در این مسیر نشان داده‌اند که تزریق داخل عضلانی به خوبی قادر به ایجاد ایمنی اختصاصی سیستمیک با افزایش تیتر آنتی‌بادی اختصاصی و فعال‌سازی ایمنی سلولی است (۲۴-۲۶).

مسیر تزریق زیرجلدی نیز یکی دیگر از مسیرهای تهاجمی بوده که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرد. از ویژگی‌های پاسخ ایمنی زیرجلدی، وجود سلول‌های دندرتیک پوستی، سلول‌های لانگرهانس، است که قادر به برداشت هرچه سریع‌تر آنتی‌ژن حتی در میزان کم می‌باشند. همچنین کراتینوسیت‌های پوستی قادر به ایجاد سایتوکاین‌های التهابی و فراخوانی سلول‌های APC به موضع هستند. این ویژگی‌ها مسیر تجویز زیر جلدی را در مقایسه با مسیر داخل عضلانی در برداشت دوز پایین آنتی‌ژن کارآمدتر می‌سازد (۲۶-۲۸).

طبق گزارش مروری Erin L. Giudice و همکاران در سال ۲۰۰۶، رویکرد نوین استفاده از مسیرهای غیرتهاجمی، مانند مسیر تجویز درون‌بینی، به منظور افزایش امنیت و ایمن بودن تجویز، کاهش عوارض و درد، انتقال سریع‌تر و استفاده دوز کمتری از آنتی‌ژن، حذف زنجیره سرمایی برای نگهداری واکسن‌ها، کاهش هزینه‌ها، در دسترس‌تر بودن و راحتی تجویز و افزایش سرعت ایمن‌سازی جمعیت، روز به روز بیشتر مورد توجه قرارگرفته و از بهترین گزینه‌های تجویز آنتی‌ژن، در مقایسه با سایر مسیرهای تهاجمی است (۲۹).

در مطالعات اخیر در سال ۲۰۱۴، Wu Li و همکاران واکسن DNA ای از آنتی‌ژن‌های ESAT-6, CFP-10, Ag85A, Ag85B را در مسیر درون‌بینی به موش‌ها تجویز کردند که شاهد افزایش آنتی بادی‌های اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌ها بودند (۴).

بر اساس مزیت‌های ذکر شده، در این تحقیق از آنتی‌ژن نوترکیب ESAT-6/CFP-10 (حدود ۲۳ کیلودالتونی) به عنوان کاندیدی برای طراحی واکسن زیر واحدی به کار گرفته شد. همان‌طور که گفته شد، در تحقیقات صورت گرفته توسط برخی محققین این دو آنتی‌ژن به عنوان کاندیدی برای طراحی واکسن زیر واحدی استفاده شده است. در نتیجه بررسی‌های انجام شده به‌وسیله آزمون الکتروفورز میزان خلوص، غلظت و وزن مولکولی آنتی‌ژن فوق تعیین شد که با توجه به خلوص بالای ۹۸٪ و غلظت ۴/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بسیار مطلوب ارزیابی شد و با نتایج مطالعات قبلی، همخوانی داشت.

همچنین بنا بر اکثر مطالعات ایمونولوژیکی بهترین گزینه به عنوان میزبان موش‌های ماده Balb/C با سن ۸ الی ۱۰ هفته، به‌حساب می‌آیند که از نظر سیستم ایمنی تکامل یافته‌اند. در این مطالعه نیز از ۳۵ رأس موش Balb/C استفاده شد. از نوآوری‌های این مطالعه می‌توان به توانایی تجویز درون‌بینی بدون بیهوشی اشاره نمود که این امر منجر به عدم تداخل پاسخ ناشی از مواد بی‌هوش کننده در ارزیابی پاسخ‌ها است. تزریق در سایر مسیرها نیز کاملاً به روش استاندارد صورت گرفت.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه بر روی آنتی بادی‌های اختصاصی علیه این آنتی‌ژن نشان می‌دهند که این آنتی‌ژن قادر به تحریک سیستم ایمنی هومورال اختصاصی بوده و میانگین تیتر پاسخ IgG طی چهار مرحله خون‌گیری، در مسیرهای زیرجلدی، داخل عضلانی و درون‌بینی در مقایسه با گروه‌های کنترل هر یک از مسیرها و گروه کنترل PBS، افزایش داشته است. بنا بر نتایج به دست آمده، مسیرهای زیر جلدی و داخل عضلانی با اختلافی اندک هر دو توانسته‌اند پاسخ ایمنی بسیار بالایی را نشان دهند. نکته قابل توجه توانایی ایجاد پاسخ ایمنی در گروه تجویز درون‌بینی است که با تقویت هر چه بیشتر فرمولاسیون آنتی‌ژن، شاهد پاسخ ایمنی قوی‌تری خواهیم بود.

پیشنهادها

بسیاری از مطالعات دیگر، نشان دادند که ادجوانت CTB گزینه مناسبی برای القا ایمنی در مسیر درون‌بینی به حساب

می‌آید، با این وجود لازم به ذکر است که تمامی مطالعات CTB بر روی نمونه‌های حیوانی به‌ویژه موش‌های Balb/C انجام شدند زیرا این ادجوانت، بخشی از سم باکتری ویبریو کلرا بوده که علی‌رغم کاهش سمیت، در موارد انسانی قابل استفاده نیست. هم‌اکنون محققان سعی بر این دارند تا از خاصیت سمیت این ادجوانت کاسته و در صورت امکان جایگزین مناسبی به عنوان ادجوانت قوی مخاطی قابل استفاده در مسیر درون‌بینی تولید کنند.

بنابراین؛ استفاده از ادجوانت‌های مخاطی دیگر در مسیر درون‌بینی به منظور ایجاد واکسن مناسب برای موارد انسانی

بررسی سطح IgA مخاطی و ساب کلاس‌های آنتی‌بادی در سرم و لاواژ بینی به منظور ارزیابی جزئی‌تر سیستم ایمنی

بررسی پاسخ‌های خاطره‌ای در پی ایمن‌سازی حیوانات ایمن شده با آنتی‌ژن نوترکیب ESAT-6/CFP-10

و به‌علاوه؛ قطعاً به منظور دریافت نتایج بهتر از این آنتی‌ژن، بررسی ایمنی سلولی ناشی از آن در هر سه مسیر نیز حائز اهمیت است.

سپاسگزاری

با سپاس و قدردانی از تمامی کارکنان و دوستان محترم در موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، به‌ویژه سرکار خانم دکتر خامه چیان و سرکار خانم کشکولی و با احترام ویژه خدمت جناب آقای دکتر مهدوی و جناب آقای دکتر تقی زاده که بنده را در انجام و تدوین این پروژه تحقیقاتی همراهی و راهنمایی نمودند.

References:

1-Hoft DF. ***Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation.*** The Lancet 2008; 372(9633): 164-75.

2-Frothingham R, Stout JE, Hamilton CD. ***Current issues in global tuberculosis control.*** International j infectious diseases: Int J Infect Dis 2005; 9(6): 297-311.

3-Kaufmann SH, Parida SK. ***Changing funding patterns in tuberculosis.*** Nat med 2007; 13(3): 299-303.

4-Li W, Deng G, Li M, Zeng J, Zhao L, Liu X, et al. ***A recombinant adenovirus expressing CFP10, ESAT6, Ag85A and Ag85B of Mycobacterium tuberculosis elicits strong antigen-specific immune responses in mice.*** Mol immunol 2014; 62(1): 86-95.

5-Baumann S, Nasser Eddine A, Kaufmann SH. ***Progress in tuberculosis vaccine development.*** Curr Opin Immunol 2006; 18(4): 438-48 .

6-Hawkridge T, Mahomed H. ***Prospects for a new, safer and more effective TB vaccine***. Paed resp rev. 2011; 12(1): 46-51.

7-Verbon A, Kuijper S, Jansen HM, Speelman P, Kolk AH***. Antigens in culture supernatant of Mycobacterium tuberculosis: epitopes defined by monoclonal and human antibodies.*** J gen microbiol 1990; 136(5): 955-64.

8-Sable SB, Plikaytis BB, Shinnick TM. ***Tuberculosis subunit vaccine development: impact of physicochemical properties of mycobacterial test antigens.*** Vaccine 2007; 25(9): 1553-66 .

9-Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. ***A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). Microbiology*** 1998; 144 (Pt 11): 3195-203 .

10- Brandt L, Elhay M, Rosenkrands I, Lindblad EB, Andersen P. ***ESAT-6 subunit vaccination against Mycobacterium tuberculosis.*** Infect Immun 2000; 68(2): 791-5 .

11- Olsen AW, Hansen PR, Holm A, Andersen P. ***Efficient protection against Mycobacterium tuberculosis by vaccination with a single subdominant epitope from the ESAT-6 antigen.*** Eur J Immunol 2000; 30(6): 1724-32.

12- De Magistris MT. ***Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics.*** Adv drug deliv rev 2006 20; 58(1): 52-67 .

13- Partidos CD. ***Intranasal vaccines: forthcoming challenges.*** Pharm Sci Technolo Today 2000; 3(8): 273-81.

14- Baldauf KJ, Royal JM, Hamorsky KT, Matoba N. ***Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications.*** Toxins 2015; 7(3): 974-96 .

15- O'Hagan DT, Ott GS, De Gregorio E, Seubert A. ***The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation.*** Vaccine 2012; 30(29): 4341-8 .

16- Agnolon V, Bruno C, Leuzzi R, Galletti B, D'Oro U, Pizza M,et al. ***The potential of adjuvants to improve immune responses against TdaP vaccines: A preclinical evaluation of MF59 and monophosphoryl lipid A.*** Int j pharm 2015 ;492(1-2): 169-76 .

17- Ko EJ, Lee YT, Kim KH, Jung YJ, Lee Y, Denning TL, et al. ***Effects of MF59 Adjuvant on Induction of Isotype-Switched IgG Antibodies and Protection after Immunization with T-Dependent Influenza Virus Vaccine in the Absence of CD4+ T Cells.*** J virol 2016; 90(15): 6976-88 .

18- Valensi JP, Carlson JR, Van Nest GA***. Systemic cytokine profiles in BALB/c mice immunized with trivalent influenza vaccine containing MF59 oil emulsion and other advanced adjuvants.*** J immunol 1994; 153(9): 4029-39 .

19- Ott G, Barchfeld GL, Van Nest G. ***Enhancement of humoral response against human influenza vaccine with the simple submicron oil/water emulsion adjuvant MF59.*** Vaccine 1995; 13(16): 1557-62 .

20- Heinemann L, Woodfield L, Amer M, Hibma M. ***Effective induction of type 1 helper IgG2a and cytotoxic T-cell responses in mice following immunization with human papillomavirus type 16 E2 in MF59.*** Viral immunol 2008; 21(2): 225-33.

21- Mohanan D, Slutter B, Henriksen-Lacey M, Jiskoot W, Bouwstra JA, et al. ***Administration routes affect the quality of immune responses: A cross-sectional evaluation of particulate antigen-delivery systems.*** J Control Release 2010; 147(3): 342-9 .

22- Giri PK, Khuller GK. ***Is intranasal vaccination a feasible solution for tuberculosis?*** Expert review of vaccines 2008; 7(9): 1341-56.

23- Lagranderie M, Balazuc AM, Abolhassani M, Chavarot P, Nahori MA, Thouron F,et al. ***Development of mixed Th1/Th2 type immune response and protection against Mycobacterium tuberculosis after rectal or subcutaneous immunization of newborn and adult mice with Mycobacterium bovis BCG.*** Scand J immunol 2002; 55(3): 293-303 .

24- Hunter J. ***Intramuscular injection techniques.*** Nurs stand 2008; 22(24): 35-40 .

25- Tanghe A, Denis O, Lambrecht B, Motte V, van den Berg T, Huygen K. ***Tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85A is immunogenic and protective when administered by intramuscular needle injection but not by epidermal gene gun bombardment.*** Infect immun 2000; 68(7): 3854-60 .

26- Smith GN, Griffiths B, Mollison D, Mollison PL. ***Uptake of IgG after intramuscular and subcutaneous injection.*** Lancet 1972; 1(7762): 1208-12.

27- Smith A. ***Subcutaneous injection.*** Nurs stand 2015; 29(38): 61 .

28- Higgins D. ***Subcutaneous injection.*** Nurs times 2004; 100(50): 32-3 .

Giudice EL, Campbell JD. ***Needle-free vaccine delivery.*** Adv Drug Deliv Rev 2006; 58(1): 68-89

Evaluation of three different administration routes (IM, SC and IN) on humoral immune responses against *Mycobacterium Tuberculosis* ESAT-6/CFP-10 fusion protein

Mojdeh Namvarpour[1], Reza Mansouri[1], Majid Tebianian[*2]

[1] Immunology Department, Shahid sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
[2] Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: 8 Jan 2017 **Accepted:** 27 Jul 2017

Abstract

Introduction: Tuberculosis (TB) has been considered as a main health problems of the present century. Unfortunately, it has been reported different protective responses against BCG vaccine, as only available vaccine against TB .The search for a new and improved vaccine against tuberculosis is currently a very active field of research. In this study, we have evaluated the relative effects of intranasal (i.n), subcutaneous (s.c) and intramuscular (i.m) routes of immunization on the induction of humoral immune responses against TB recombinant protein.

Methods: The recombinant ESAT-6/CFP-10 antigens has been assessed and confirmed preliminary, for this study. The Balb/C mice were immunized in 3 different routes, three times at 2-week intervals with recombinant protein, formulated with or without adjuvants (MF-59 for the i.m and s.c routes and CTB for i.n). Blood was collected from retro-orbital sinus 10 days after each immunization and after separation of sera, they were evaluated for specific antibodies against antigen by an indirect ELISA method, which had set up during the research.

Results: Mice vaccinated against recombinant proteins had high level of specific antibodies compared to the controls. Our results showed that although the i.m and s.c injections also induce immune responses, but the antibody titer in i.n rout had graduately elevated to reach in acceptable levels.

Conclusion: The results could be used for formulation of mucosal vaccines against tuberculosis in future studies.

Key Words: Mycobacterium tuberculosis, Intramuscular injection, Subcutaneous injection, Intranasal administration, ESAT-6/CFP-10

This paper should be cited as:
Namvarpour M, Mansouri R, Tebianian M. **Evaluation of three different administration routes (IM, SC and IN) on humoral immune responses against *Mycobacterium Tuberculosis* ESAT-6/CFP-10 fusion protein.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(7): 537-46.

***Corresponding author: Tel: 02634570038, email: mtebianian@yahoo.com**