Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2022; Vol. 46; No. 2

Design and development of ELISA technique for detection of IgG against *Neisseria meningitidis* using purification of antisera

Maryam Hejazi[1,2], Mahdi Paryan[2*], Rahman Shokri[2*]

1- Department of Biology, Faculty of Life Sciences, Danesh Alborz University, Qazvin, Iran.

2- Department of Antigen and Antisera production, Production and Research Complex, Pasteur Institute of Iran, Karaj, Iran.

Received: March 16, 2021; Accepted: December 1, 2021

Abstract

Background and Aim: *Neisseria meningitidis* is a leading cause of death in children in developed countries. Meningococcus has 13 sero-groups based on the capsule antigens. Rapid diagnosis of the bacteria results in timely selection of the right anti-microbial treatment. The present study, conducted in 2019, aimed to produce a highly pure antiserum for diagnostic assays for the detection of meningococcus sero-groups.

Methods: The type of research study was research and development. Inactivated bacterial suspension was intravenously injected into white New Zealand Rabbits. Serum was collected after the last injection. Purification process was performed using precipitation, chromatography, and tangential flow filtration. The produced antiserum was used in Agglutination and ELISA assays. The purified antiserum had a purity of more than 98% at a suitable quantity. Agglutination test with the primary antigen showed 4+ result. To develop the ELISA assay, the optimized concentration of primary and biotinylated antibodies was 1 and 80 micrograms, respectively. The results of positive predictive value were 100% and negative predictive value was 96%, for the designed assay.

Results: The purified antiserum had a purity of more than 98% at a suitable quantity. Agglutination test with the primary antigen showed 4+ result. To developed the ELISA assay, the optimized concentration of primary and biotinylated antibodies was 1 and 80 micrograms, respectively. The results of positive predictive value were 100% and Negative predictive value was 96%, for the designed assay.

Conclusion: Serum-based assays are recommended for the timely diagnosis of the disease since these assays are specific, sensitive, inexpensive, and rapid. The antiserum produced in the present research is highly pure. Therefore, we recommend the antiserum for the development of agglutination and ELISA assays for the detection of *N. meningitides.*

Keywords: Meningococcus; Antisera; High purity; ELISA; Tangential Flow Filtration

Please cite this article as: Hejazi M, Paryan M, Shokri R. Design and development of ELISA technique for detection of IgG against Neisseria meningitidis using purification of antisera. Pejouhesh dar Pezeshki. 2022;46(2):30-39.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.4.8]

[*]**Corresponding Authors:**
Mahdi Paryan; **Email:** mparyan@gmail.com; **ORCID ID:** 0000-0002-2592-3528
Rahman Shokri; **Email:** shokrei@gmail.com; **ORCID ID:** 0000-0002-1996-5799

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی-پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۶، شماره ۲، سال ۱۴۰۱ شمسی، صفحات ۳۰ تا ۴۰

طراحی و توسعه تکنیک الایزا برای شناسایی IgG علیه *نایسریا مننژیتیدیس* با استفاده از تخلیص آنتی‌سرم

مریم حجازی[۱،۲]، مهدی پریان[۲*]، رحمان شکری[۲*]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه دانش البرز، قزوین، ایران.

۲- بخش تولید آنتی‌ژن و آنتی‌سرم، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۰

خلاصه

سابقه و هدف: نایسریا مننژیتیدیس یکی از عوامل منجر به مرگ در کودکان کشورهای توسعه‌یافته است. مننگوکوک بر اساس ویژگی‌های سرولوژیکی آنتی‌ژن‌های کپسولی به ۱۳ سروگروپ طبقه‌بندی می‌شوند. شناسایی سریع باکتری در دوره بیماری سبب انتخاب درمان ضدمیکروبی در اسرع وقت می‌شود. هدف از این تحقیق، تهیه آنتی‌سرم علیه انواع سروگروپ‌های مننگوکوک با درجه خلوص بالا برای استفاده در تست‌های تشخیصی است.

روش کار: نوع مطالعه تحقیق و توسعه است. سوسپانسیون غیرفعال شده باکتری به خرگوش سفید نیوزیلندی تزریق شد. جمع‌آوری سرم یک هفته بعد از آخرین تزریق انجام شد. خالص‌سازی با روش‌های رسوب‌دهی، تانژنشیال فلوفیلتریشن و کروماتوگرافی انجام شد. از آنتی‌سرم تولید شده در تست آگلوتیناسیون و طراحی آزمون الایزا استفاده شد.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که آنتی‌سرم به دست آمده از لحاظ کیفیت (درجه خلوص بالا، بیشتر از ۹۸درصد) و کمیت (غلظت پروتئین مناسب) از درجه بالایی برخوردار است. تست آگلوتیناسیون با آنتی‌ژن اولیه به صورت ۴+ بود. غلظت‌های بهینه برای طراحی آزمون الایزا ۱ و ۸۰ میکروگرم به ترتیب برای آنتی‌بادی اولیه و بیوتینیله به دست آمد. نتایج ارزش پیشگویی مثبت یا Positive predictive value ۱۰۰ درصد و ارزش پیشگویی منفی Negative predictive value ۹۶ درصد برای آزمون طراحی‌شده به دست آمد.

نتیجه‌گیری: تشخیص سریع بیماری به وسیله آزمایش‌های مختلف مانند تست‌های سرمی که دارای حساسیت، اختصاصیت و سرعت عمل بالا و هزینه کمتری هستند، توصیه می‌شود. همچنین با توجه به درجه خلوص بالای به دست آمده در این مطالعه، می‌توان از این آنتی‌سرم در تست‌های مختلف، از قبیل آگلوتیناسیون و الایزا استفاده کرد.

واژگان کلیدی: مننگوکوک؛ آنتی سرم؛ درجه خلوص بالا؛ الایزا؛ تانژنشیال فلوفیلتریشن

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Hejazi M, Paryan M, Shokri R. Design and development of ELISA technique for detection of IgG against Neisseria meningitidis using purification of antisera. Pejouhesh dar Pezeshki. 2022;46(2):30-39.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

مهدی پریان؛ **آدرس پست الکترونیکی:** mparyan@gmail.co؛ **شناسه ارکید:** 0000-0002-2592-3528

رحمان شکری؛ **آدرس پست الکترونیکی:** shokrei@gmail.com؛ **شناسه ارکید:** 0000-0002-1996-5799

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.4.8]
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

مقدمه

منتگوکوک به عنوان یکی از عوامل مهم مرگ و میر در کودکان کشورهای توسعه یافته و همچنین سبب اپیدمی در آسیا و آفریقاست(۱-۴). اگرچه اپیدمی‌شناسی منتژیت باکتریایی از یک کشور به کشور دیگر دارای تغییرهای وسیعی است، ولی سروگروپ‌های مختلف منتگوکوک با اپیدمی‌های متعددی همراه بوده‌اند(۵). در کشورهای پیشرفته منتژیت باکتریایی از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر، ۶-۲/۶ نفر را آلوده می‌کند و در کشورهای کمترتوسعه یافته به کمتر از ۱۰ برابر این میزان می‌رسد (۷،۶). از آنجا که زمان ابتلا به این بیماری اغلب دوران کودکی و نوجوانی است، نه تنها عوارض بیماری در فرم شدید منجر به مرگ ۱۵-۱۰ درصد می‌شود بلکه معلولیت‌های ناشی از آن حدود۲۰-۱۰ درصد افراد مبتلا را سالیان متمادی درگیر می‌کند. همچنین عواقب اقتصادی و اجتماعی نامطلوب آن نیز جامعه را متأثر می‌سازد. بیماری منتژیت در پزشکی همواره به عنوان یک مورد اورژانسی مطرح بوده و بسیار مهلک است (۹،۸).

برای افراد مشکوک به منتژیت، ابتدا آزمایش خون برای بررسی نشانگرهای التهاب (مانند پروتئین C واکنشی C-Reactive Protein، شمارش سلول‌های خون) و همچنین کشت خون انجام می‌شود (۱۰). در خصوص منتگوکسمی، نمونه خون از نظر وجود باکتری بررسی می‌شود (۱۱-۱۳). مهمترین آزمایش برای تایید یا رد منتژیت، کشت باکتری از نمونه مایع مغزی-نخاعی است، ظاهر اولیه مایع مغزی-نخاعی ممکن است نشانه‌ای از عفونت باشد. CSF کدر نشان‌دهنده سطوح بالاتری از پروتئین، گلبول قرمز و سفید و یا باکتری است و در نتیجه ممکن است نشانه منتژیت باکتریایی باشد. نمونه CSF از لحاظ وجود گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، غلظت پروتئین و سطح گلوکز سنجش می‌شود (۱۴). بررسی مقدار گلوکز مایع مغزی-نخاعی در تشخیص منتژیت باکتریایی استفاده می‌شود که مقدار آن در منتژیت کمتر از مقدار طبیعی آن است. سطح بالای لاکتات در CSF نشان‌دهنده احتمال وجود منتژیت باکتریایی را افزایش می‌دهد. اگر سطح لاکتات کمتر از ۳۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر باشد و شخص پیش از آن آنتی بیوتیک دریافت نکرده باشد، به طور معمول وجود منتژیت باکتریایی را رد می‌کند(۱۶،۱۵). آزمایش‌های تخصصی متنوع دیگری را هم می‌توان برای تشخیص عوامل منتژیت انجام داد(۱۷-۱۹). روش تشخیصی که از دقت ۷۰ تا ۸۵ درصدی برخوردار است، کشت میکروبی است، ولی این روش زمان‌بر بوده و نتایج پس از ۴۸ ساعت آماده می‌شود. بررسی درصد انواع گلبول‌های سفید (نوتروفیل در منتژیت باکتریایی و لمفوسیت‌ها در منتژیت ویروسی) دیگر روش تشخیصی است که در شروع بیماری کارایی لازم را ندارد، همچنین ائوزینوفیل با درصد بالا، احتمال انگلی یا قارچی بودن عامل بیماری را قوت می‌بخشد(۲۰). شناسایی سریع باکتری در دوره بیماری سبب انتخاب درمان ضد میکروبی شده و ضرورت پیشگیری با استفاده از ایمنی‌زایی اختصاصی را نشان می‌دهد. یکی از این روش‌ها، تست سریع لاتکس آگلوتیناسیون آنتی‌ژن روی نمونه‌های خون و CSF است، اما پایین بودن حساسیت استفاده بالینی آن‌ها را با محدودیت مواجه کرده است (۱۰).

هدف از انجام این تحقیق تهیه آنتی‌سرم با درجه خلوص بالا علیه منتگوکوک برای استفاده در کیت‌های تشخیصی بر اساس آگلوتیناسیون و الایزاست. آنتی‌سرم‌های اختصاصی با روش‌های کشت قابل مقایسه بوده و در تشخیص سریع عامل بیماری و غربالگری کلنی کاربرد دارد.

روش کار

نوع مطالعه، بر اساس هدف تحقیق در دسته‌بندی تحقیق و توسعه است.

کشت باکتری: ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر سوش منتگوکوک (سروگروپ‌های A، B و C) به لوله در پیچ‌دار حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت Brain Heart Infusion broth (BHI) به علاوه ۱۰ میکرولیتر ایزوویتالکس BD BBL™ IsoVitaleX™ (Enrichment) اضافه شد. سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور قرار گرفت تا باکتری رشد کند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.4.8]

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

غیرفعال‌سازی باکتری و تزریق آنتی‌ژن به خرگوش: برای غیرفعال‌سازی، لوله‌های حاوی باکتری به مدت نیم ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد داخل شیکر بن ماری قرار گرفتند. سپس لوله‌ها به مدت یک ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه (rpm) سانتریفیوژ (Hettich EBA 200 Centrifuge 8 x 15 mL Zentrifuge OVP) شدند. سپس مایع رویی را دور ریخته و رسوب برای مرحله بعد آماده شد. برای اطمینان از رشد خالص، رنگ‌آمیزی گرم انجام شد. به رسوب به دست آمده از سانتریفیوژ، سرم فیزیولوژی اضافه شد تا کدورت آن به استاندارد ۳ مک فارلند (معادل 9.0×10^8 CFU/mL) برسد. سپس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Thermo Scientific™ GENESYS™ 30 Visible Spectrophotometer با طول موج ۶۰۰ نانومتر غلظت آن تعیین شد. سپس چهار بار (هر بار یک میلی‌لیتر) از این محلول در فاصله زمانی ۷۲ ساعت به صورت داخل وریدی گوش به خرگوش سفید نیوزیلندی تزریق شد.

خون‌گیری و جداسازی سرم: پس از گذشت یک هفته از آخرین تزریق، نخستین مرحله خون‌گیری از خرگوش‌ها انجام شد. خون‌گیری به مدت سه هفته و در فواصل زمانی یک هفته در میان بود. پس از هر بار خون‌گیری، برای ه آوردن سرم، سانتریفیوژ دو بار به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. سرم به دست آمده در فریزر نگهداری شد.

تست آگلوتیناسیون: برای بررسی اولیه آنتی‌سرم به دست آمده، تست آگلوتیناسیون روی اسلاید شیشه‌ای انجام شد. ۳۰ میکرولیتر از آنتی‌سرم را با ۳۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن (باکتری غیرفعال شده منگوکوک) روی صفحه شیشه‌ای مخلوط شد. پس از یک دقیقه نتایج آگلوتیناسیون مشاهده و بررسی شد.

تخلیص و بررسی کیفیت آنتی‌بادی: برای خالص‌سازی پروتئین ابتدا عمل رسوب‌دهی با استفاده از آمونیوم سولفات (Merck, Cat. No. 101217) انجام شد. حجم مساوی از سرم خرگوش به محلول (Merck, Cat. No. ,NaCl(0.15M) 106404) اضافه شد و مخلوط حاضر روی همزن با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس حجم مساوی از آمونیوم سولفات اشباع (۱۰۰ درصد، ۱۰۰ گرم از آمونیوم سولفات در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شده و یک شبانه‌روز روی استیرر گذاشته می‌شود و از محلول رویی به عنوان آمونیوم سولفات اشباع استفاده می‌شود) به صورت قطره قطره با کمک پیپتور به مخلوط اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه روی همزن قرار داده شد. در مرحله بعد، مخلوط در دمای ۴درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه و با سرعت۱۵۰۰دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول شفاف رویی را دور ریخته و رسوب به‌دست آمده را با محلول نیمه اشباع آمونیوم سولفات (۵۰ درصد) شستشو داده، دوباره سانتریفیوژ مشابه مرحله قبل انجام شد. در نهایت محلول شفاف رویی را دور ریخته و رسوب، در یک سوم میزان سرم اصلی در محلول NaCl 0.15 M سرد حل شد(۲۱). برای حذف یون‌های آمونیوم سولفات و تغلیظ نمونه، از دستگاه(Labscale tangential flow filtration Tangential Flow Filtration System, Merck)، فیلتر با cut-off ۱۰۰ کیلودالتونی (Merck, Pellicon® XL50 with Biomax® 100 kDa Membrane, C screen, 50 cm², Cat. No. PXB100C50) و در برابر محلول Phosphate-buffered saline (PBS; Gibco, Cat. No.18912014) با pH: 6.4 استفاده شد. برای تایید حذف یون‌های آمونیوم سولفات، تست نسلر انجام شد. برای این منظور، ۱۵۰ میکرولیتر پروتئین، ۲۰ میکرولیتر معرف نسلر و ۲۵ میکرولیتر پتاسیم هیدروکسید (Merck, Cat. No.105033) در یک میکروتیوب مخلوط شد که بی‌رنگ بودن محلول نشان‌گر حذف یون‌های آمونیوم سولفات بود (۲۱).

در مرحله بعد کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از ژل دی‌اتیل آمینو اتیل سفاروز فست فلو (DEAE Sepharose® Fast Flow, GE17-0709-01 Sigma) برای حذف ناخالصی‌های باقی‌مانده انجام شد(۲۱). متعادل‌سازی با استفاده از پنج حجم ستون (۵۰ میلی‌لیتر) بافر فسفات (شامل دو محلول: Solution 1: NaH2PO4·H2O, 2.76 g, H2O, distilled, to 1000ml Solution 2: Na2HPO4, 2.84 g, H2O, distilled, to 1000 mL سپس یک قسمت از محلول یک با ۹ قسمت از محلول دو در یک بشر برای تهیه بافر با pH:7.6 مخلوط می‌شود) انجام شد.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.4.8]

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

سپس اعمال نمونه انجام شد و دوباره بافر فسفات pH:7.6 افزوده شد تا زمانی‌که کل پروتئین خارج شد(۲۲). بررسی فراکشن‌های نمونه با استفاده از دستگاه UV detector (Amersham Biosciences AKTA UV-900 Monitor)، که اساس کار دستگاه، جذب نوری (OD) بوده یعنی در محدوده طول موج ۲۸۰ نانومتر عمل کرده و به محض اینکه غلظت پروتئین بالا رود توسط نشانگر ثبت شده، اگر پروتئین خارج شود دستگاه یک پیک منحنی داده که نشان‌دهنده زمان جمع‌آوری پروتئین است. همچنین کیفیت آنتی‌بادی تخلیص‌شده با استفاده از تکنیک Poly acrylamide gel Sodium dodecyl sulphate- electrophoresis (SDS-Page) بررسی شد و برای ارزیابی کمیت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد.

کونژوگه‌کردن آنتی‌بادی بدست‌آمده به بیوتین برای استفاده در الایزای ساندویچ: در این مرحله یک میکروگرم بیوتین (Sigma, Biotin-NHS, Cat. No. 35013-72-0) در ۱۸۰ میکرولیتر آب قابل تزریق (Water for Injection) حل شد. سپس مخلوط به‌دست آمده به مدت ۵۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد.

مقدار ۱/۰۷۹ میلی‌لیتر آنتی‌بادی از غلظت (۱۳/۱۲۲ میلی‌گرم) به مخلوط اضافه شد و در نهایت از کروماتوگرافی ژل فیلتریشن (Sephadex® G-25 Medium, Sigma, Cat. No. GE17-0033-01) برای تعویض بافر استفاده شد (۲۳) و بررسی فراکشن‌های نمونه با استفاده از دستگاه UV detector (Amersham Bioscience) انجام شد.

طراحی آزمون الایزای ساندویچ: آنتی‌بادی اولیه در غلظت‌های ۱۰،۵،۲،۱ میکروگرم به کمک بافر کوتینگ یا بافر بی‌کربنات (Na-Bicarbonate,5.76 gr و Na Carbonate, 3.332 gr در یک لیتر آب مقطر (pH:9.7) و سپس فیلتراسیون با فیلتر ۰/۲ میکرون انجام شد) تهیه و به چاهک‌ها اضافه شد، بعد به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد روی شیکر قرار گرفت.

سپس محتوای چاهک‌ها دور ریخته شد و سه بار شست‌وشو با بافر TBST (Tris (200 mM) ,NaCl (1.5M) ,Tween-20 (1%)) انجام شد. برای بلاکینگ آنتی‌بادی، ۲۵۰ میکرولیتر آلبومین سرم گاوی (BSA,Sigma, Cat. No. A2153) با غلظت ۰/۰۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه و به مدت د.و ساعت در دمای اتاق روی شیکر انکوبه و سپس شست‌وشو داده شد. در این مرحله آنتی‌ژن یا همان باکتری غیر فعال به تمام چاهک‌ها به جز چاهک‌های ردیف بلانک و کنترل منفی اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس سه بار شست‌وشو داده شد و آنتی‌بادی بیوتینیله را به کمک بافر کونژوگه در غلظت‌های ۴۰،۲۰،۱۰،۵و ۸۰ میکروگرم رقیق و به تمام چاهک‌ها اضافه شد. دوباره چهار بار شست‌وشو انجام شد.

کونژوگه استرپتاویدین HRP (HRP-Streptavidin, Sigma, Cat. No. RABHRP3-600UL) به تمام چاهک‌ها به جز چاهک‌های ردیف بلانک اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد.

سپس، پنج بار شست‌وشو انجام شد. سوبسترای رنگ‌زا به تمام چاهک‌ها اضافه و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. در این مرحله محلول متوقف‌کننده واکنش Stop solution به تمام چاهک‌ها اضافه شد. در مرحله آخر، پلیت محتوای نمونه در دستگاه خوانش الایزا Microplate Reader (Hiperion-MPR4+) قرار گرفت و جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد(۲۱، ۲۴).

یافته‌ها

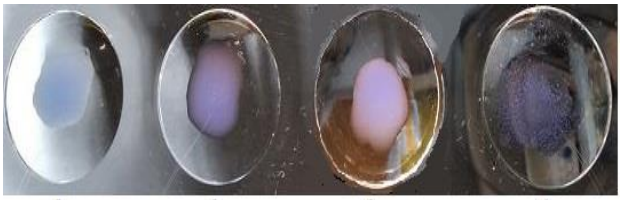
آگلوتیناسیون روی اسلاید شیشه‌ای: برای بررسی کیفیت و تعیین تیتر آنتی‌سرم تهیه شده، تست آگلوتیناسیون روی آنتی‌سرم قبل از انجام عمل تخلیص انجام شد.

از آنتی‌ژن پنوموکوک به عنوان کنترل منفی نیز استفاده شد. پس از گذشت یک دقیقه اسلاید روی لامپ پر نور بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، آگلوتیناسیون به خوبی قابل رؤیت بود.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.4.8]

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

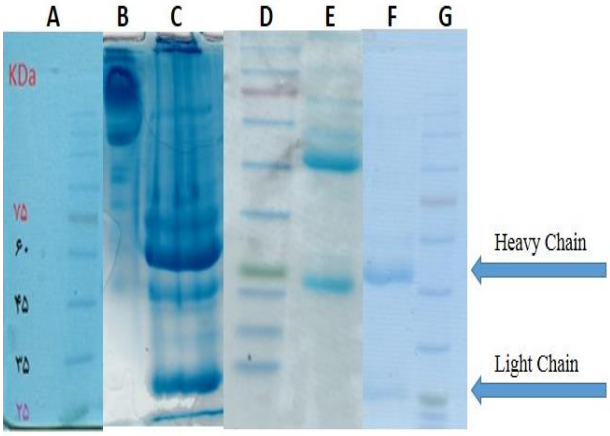


شکل ۱- آزمون آگلوتیناسیون آنتی‌سرم تهیه شده روی اسلاید شیشه‌ای: ۱- آنتی‌ژن منینگوکوک با آنتی‌سرم منفی خرگوش (تیمارنشده با آنتی‌ژن منینگوکوک)؛ ۲- آنتی‌ژن پنوموکوک با آنتی‌سرم منینگوکوک؛ ۳- آنتی‌ژن پنوموکوک با آنتی‌سرم منفی خرگوش؛ ۴- آنتی‌ژن منینگوکوک با آنتی‌سرم منینگوکوک که آگلوتیناسیون روی اسلاید شیشه‌ای بعد از یک دقیقه فقط در چاهک شماره ۴ قابل رویت است. از آنتی‌ژن پنوموکوک به دلیل دارابودن کپسول پلی‌ساکاریدی مشابه با منینگوکوک به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

تخلیص آنتی‌بادی: برای ارزیابی کیفی آنتی‌بادی از الکتروفورز ژل ۱۲درصد آکریل آمید در شرایط احیا (Reducing) استفاده شد. ۱۵ میکروگرم آنتی‌بادی بعد از تخلیص پروتئین با روش آمونیوم سولفات در شرایط بدون احیا (Non-Reducing)، بعد از تخلیص پروتئین با روش آمونیوم سولفات در شرایط احیا (Reducing)، بعد از فیلتراسیون با استفاده از روش تانژنشیال فلوفیلتریشن و فیلتر ۳۰ کیلودالتونی در شرایط احیا و در نهایت بعد از کروماتوگرافی تعویض یونی و فیلتراسیون ۱۰۰ کیلودالتونی با استفاده از روش تانژنشیال فلوفیلتریشن در شرایط احیا (در حضور ماده احیاکننده ۲- مرکاپتواتانول) روی ژل برده شد. دو باند ۵۰ و ۲۵ کیلودالتونی نشان‌دهنده خلوص بالای آنتی‌بادی است (شکل ۲).

غلظت آنتی‌بادی خالص‌سازی‌شده با استفاده از روش برادفورد به ترتیب بعد از رسوب‌دهی با آمونیم سولفات (۲۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، بعد از کروماتوگرافی تعویض یونی (۱۷/۲۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و در نهایت بعد از خالص‌سازی نهایی با TFF و فیلتر ۱۰۰ کیلودالتونی (۱۳/۱۲۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) شد.

آزمون الایزای ساندویچ: ابتدا میزان بهینه آنتی‌بادی اولیه و بیوتینیله شده بررسی شد و سپس میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد. یافته‌ها نشان می‌دهد جذب نوری برای بلانک و سرم افراد سالم صفر بوده و در مورد نمونه‌ها بر حسب غلظت‌های به کار رفته متفاوت است. بیشترین جذب نوری مربوط به غلظت‌های یک میکروگرم (آنتی‌بادی اولیه) و ۸۰ میکروگرم (آنتی‌بادی بیوتینیله) است. نتایج حاصل در جدول ۱ نشان داده شده است.



شکل ۲- بررسی درجه خلوص آنتی‌بادی تخلیص شده در سه ژل جداگانه: A: مارکر پروتئینی ۱۵-۱۷۰ کیلودالتونی شرکت Fermentas؛ B: بعد از تخلیص پروتئین با روش آمونیوم سولفات در شرایط بدون احیا (Non-Reducing)؛ C: بعد از تخلیص پروتئین با روش آمونیوم سولفات در شرایط احیا (Reducing)؛ D: مارکر پروتئینی ۱۵-۱۷۰ کیلودالتونی؛ E: بعد از فیلتراسیون با استفاده از روش تانژنشیال فلوفیلتریشن و فیلتر ۳۰ کیلودالتونی در شرایط احیا (Reducing)؛ F: بعد از کروماتوگرافی تعویض یونی و فیلتراسیون ۱۰۰ کیلودالتونی با استفاده از روش تانژنشیال فلوفیلتریشن در شرایط احیا (Reducing)؛ G: مارکر پروتئینی ۱۵-۱۷۰ کیلودالتونی.

آزمون الایزا برای بررسی اختصاصیت: پس از بهینه‌کردن غلظت‌های آنتی‌بادی‌های اولیه و بیوتینیله، اختصاصیت آزمون بررسی شد. در این تست غلظت‌های یک و ۸۰ میکروگرم به ترتیب برای آنتی‌بادی اولیه و بیوتینیله استفاده شد. همچنین از آنتی‌ژن پنوموکوک (*Streptococcus pneumoniae* strain IBRC-M 10819) برای ارزیابی آزمون استفاده شد.

نتایج مندرج در جدول ۲ نشان می‌دهند که آزمون طراحی‌شده برای باکتری پنوموکوک منفی است که نشان‌دهنده اختصاصیت آزمون است.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.4.8]

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

		غلظت آنتی بادی بیوتینیله شده											
		B	C-	۵ µg		۱۰µg		۲۰µg		۴۰µg		۸۰µg	
غلظت آنتی‌بادی اولیه	۱ µg	0.000	0.000	0.008	0.004	0.151	0.248	1.297	1.258	1.898	2.130	3.328	3.069
	۲.۵ µg	0.000	0.000	0.000	0.010	0.098	0.159	0.929	1.079	1.919	2.090	3.067	3.038
	۵µg	0.000	0.000	0.002	0.004	0.169	0.124	0.860	0.998	1.942	2.067	2.800	2.891
	۱۰ µg	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.075	0.625	0.638	1.696	1.707	2.744	2.797

جدول ۱- جذب نوری نمونه در غلظت‌های مختلف آنتی‌بادی ستون‌های افقی غلظت آنتی‌بادی بیوتینیله (میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ستون‌های عمودی غلظت آنتی‌بادی اولیه (میکروگرم بر میلی‌لیتر). هر غلظت به صورت دوبار تکرار گذاشته شده است. غلظت آنتی‌بادی بیوتینیله شده به ترتیب (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکروگرم) و غلظت آنتی‌بادی اولیه به ترتیب (۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکروگرم) تهیه شد (B: بلانک، C-: کنترل منفی).

B	C-	Meningococcus	Meningococcus (1/100)	Pneumococcus	Pneumococcus (1/100)
0.00	0.00	3.238	0.856	0.009	0.000
0.00	0.00	3.194	0.839	0.004	0.001

جدول ۲- نتایج آزمون الایزا برای بررسی حساسیت و اختصاصیت آزمون، در این آزمون یک نمونه منننگوکوک و نمونه ۱/۱۰۰ رقیق‌شده منننگوکوک و همچنین یک نمونه پنوموکوک و نمونه ۱/۱۰۰ رقیق شده پنوموکوک برای بررسی حساسیت و اختصاصیت به صورت دوبار تکرار گذاشته شد. (B: بلانک، C-: کنترل منفی) همچنین مقدار پیشگویی مثبت (PPV) و منفی (NPV) برای کیت تشخیصی راه‌اندازی شده به ترتیب، ۱۰۰ و ۹۶ درصد است.

تشخیص واقعی / تشخیص در روش طراحی‌شده	مثبت	منفی	جمع
مثبت	۰	۱۵	۱۵
منفی	۱۷	۵۵	۵۷
جمع	۱۷	۵۵	۷۲

جدول ۳- مقادیر پیشگویی مثبت و منفی آزمایش برای کیت تشخیصی راه‌اندازی‌شده پیشگویی مثبت (PPV): ۱۰۰ درصد؛ پیشگویی منفی (NPV): ۹۶درصد.

بحث

از آزمون‌هایی که برای تشخیص منننژیت به کار می‌رود، بررسی مایع مغزی نخاعی (CSF) از لحاظ میزان گلوکز، پروتئین‌ها و سلول‌هاست(۲۶،۲۵). روش‌های تشخیصی که هم اکنون به کار می‌روند (نمونه‌گیری از نخاع، کشت و در برخی موارد عکسبرداری) است که هم زمانبر بوده و هم در بر گیرنده هزینه‌های بسیار زیادی است و حتی ممکن است با نمونه‌گیری ناصحیح از نخاع صدمه‌های جبران‌ناپذیری به بیمار وارد شود. تشخیص سریع بیماری به‌وسیله آزمایش‌های مختلف که دارای حساسیت، اختصاصیت و سرعت عمل بالا هستند، توصیه می‌شود(۲۷). تست‌های آگلوتیناسیون روی لام با توجه به سهولت روش و قیمت پایین آن، از مقبولیت خوبی برخوردار است. این روش در مطالعه‌های اپیدمیولوژی نیز کاربرد دارد. استفاده از آنتی‌سرم‌های پلی‌والان در تشخیص گروه‌های باکتریایی سفارش شده است. در مطالعه ای در سال ۲۰۰۶، از دو روش تشخیصی سریع برای شناسایی سروگروپ های A، W135، C و Y استفاده کردند. آن ها با استفاده از آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه این سروگروپ‌ها، سروگروپ‌های A و W135 که عوامل عمده منننژیت در آفریقا بودند را شناسایی کردند(۲۸). این مطالعه با پژوهش حاضر قابل مقایسه بوده که در آن با تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال در خرگوش برای استفاده در تست‌های مختلفی همچون آگلوتیناسیون، الایزا، می‌توان سروگروپ‌های مختلف منننگوکوک را شناسایی کرد. Nato و همکاران در سال ۱۹۹۱، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پلی‌کلونال علیه کپسول پلی‌ساکاریدی سروگروپ‌های A، B و C منننگوکوک تولید کردند. آن‌ها این کار را برای توسعه معرف‌های ایمونولوژیکی برای تشخیص آنتی‌ژن‌های محلول در طول منننژیت منننگوکوکی و

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.4.8]

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

تعیین سروگروپ‌های آنتی‌ژنی کشت‌های مننگوکوک انجام دادند. یافته‌های آن‌ها نشان داد معرف‌های لاتکس آماده شده با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال علیه سروگروپ B قادر به تشخیص کپسول پلی ساکاریدی (در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نیست (۲۹). در مطالعه حاضر آنتی سرم علیه سروگروپ‌های A، B و C به صورت پلی‌کلونال تهیه شد و حساسیت آن بیش از یک میکروگرم در میلی‌لیتر است. همچنین از لحاظ اختصاصیت علیه سایر گونه‌های باکتریایی عامل مننژیت مانند پنوموکوک، بررسی شد و واکنش متقاطع مشاهده نشد(شکل ۱). آن‌ها برای تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال از خرگوش و برای تخلیص آن از روش‌های جداسازی با نمک و کروماتوگرافی تعویض یونی (DE52) استفاده کردند، در پژوهش حاضر نیز ما با ایمنی‌زایی خرگوش، آنتی‌سرم تولید کرده و از روش‌های رسوب‌دهی با آمونیم سولفات و کروماتوگرافی تعویض یونی (DEAE Sepharose Fast Flow) استفاده کردیم. از دیگر مطالعه‌های انجام شده در راستای تولید آنتی‌بادی علیه مننگوکوک می‌توان به مطالعه‌ای که توسط Belo و همکاران در سال ۲۰۰۴ روی آنتی‌بادی مونوکلونال علیه آنتی‌ژن ساب‌تایپ ۹ مننگوکوک، تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه لیپوپلی ساکارید مننگوک توسط Sugasawara و همکاران در سال ۱۹۸۳ و همچنین تهیه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه کپسول پلی ساکاریدی سروگروپ‌های A، C، W135 و Y توسط Reyes و همکارن در سال ۲۰۱۳ نیز اشاره کرد(۳۰-۳۲). روش‌های مختلفی برای خالص‌سازی آنتی‌بادی گزارش شده است که می‌توان به روش‌های غیرکروماتوگرافی از قبیل رسوب‌دهی، استخراج مایع-مایع و روش‌های بر پایه کروماتوگرافی مانند فیلتراسیون ژلی، تعویض یونی، برهم کنش آب‌گریز و تمایلی اشاره کرد(۳۴،۳۳).

در این تحقیق، ایمنی‌زایی خرگوش از طریق تزریق به ورید کناری گوش انجام شد. تست آگلوتیناسیون روی اسلاید شیشه‌ای با استفاده از آنتی‌سرم علیه مننگوکوک تولیدی و با آنتی‌ژن‌های مننگوکوک و پنوموکوک انجام و نتایج مثبت (آگلوتیناسیون) با مننگوکوک و منفی (عدم آگلوتیناسیون) با پنوموکوک مشاهده شد که نشان‌دهنده عدم واکنش متقاطع با سایر باکتری‌های عامل مننژیت است. علاوه بر این برای استفاده از آنتی‌سرم تولید شده در کیت‌های اختصاصی مانند الایزا، ایمونوفلئورسانس، وسترن بلات، مراحل خالص‌سازی انجام شد.

در مطالعه حاضر، از دستگاه TFF با فیلتر ۱۰۰ کیلو دالتونی برای جداسازی و تغلیظ استفاده شد که مزایای فراوانی از جمله دیالیز پروتئین با حجم زیاد، کاهش مدت زمان دیالیز از چند روز به سه تا چهار ساعت، حذف بسیاری از ناخالصی‌ها با استفاده از فیلترهای مختلف (از فیلتر ۳۰ کیلودالتونی برای حذف آمونیم سولفات و از فیلتر ۱۰۰ کیلودالتونی برای حذف ناخالصی‌هایی همچون آلبومین استفاده شد)، همچنین تغلیظ پروتئین در حجم بالا نسبت به کیسه دیالیز را داراست. استفاده از دستگاه TFF، در تخلیص آنتی‌بادی روشی است که منجر به تهیه آنتی‌بادی با درجه خلوص بالاتر در مدت زمان کمتری می‌شود. همچنین برای دستیابی به درجه خلوص بالاتر، از روش کروماتوگرافی تعویض یونی (DEAE Sepharose Fast Flow) استفاده شد. آنتی بادی خالص‌سازی شده از لحاظ کمیت با استفاده از روش جذب نوری (OD:280nm) به ترتیب بعد از رسوب‌دهی با آمونیم سولفات (۲۱/۰۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، بعد از دیالیز با استفاده TFF و فیلتر ۳۰ کیلودالتونی (۲۳/۴۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، بعد از کروماتوگرافی تعویض یونی (۱۸/۱۲۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و در نهایت در خالص‌سازی نهایی با TFF و فیلتر ۱۰۰ کیلودالتونی (۱۴/۳۶۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و با استفاده از روش برادفورد به ترتیب بعد از رسوب‌دهی با آمونیم سولفات (۲۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، بعد از دیالیز با استفاده TFF و فیلتر ۳۰ کیلودالتونی (۱۹/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، بعد از کروماتوگرافی تعویض یونی (۱۷/۲۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و در نهایت بعد از خالص‌سازی نهایی با TFF و فیلتر ۱۰۰ کیلودالتونی (۱۳/۱۲۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) شد. کیفیت آنتی‌بادی تخلیص شده با استفاده از روش SDS-PAGE بررسی شد و نتایج نشان داد که غلظت و درجه خلوص آنتی‌بادی بسیار بالاست و می‌توان در کیت‌های اختصاصی برای سنجش مننگوکوک، مانند الایزا، ایمونوفلئورسانس و ... از آن استفاده کرد.

در این مطالعه همچنین آزمون الایزا با استفاده از آنتی‌بادی خالص‌سازی شده نیز طراحی شد. برای تعیین غلظت‌های بهینه آنتی‌بادی اولیه و بیوتینیله، از غلظت‌های مختلف آنتی‌بادی اولیه (۱، ۲، ۵ و ۱۰ میکروگرم) و آنتی‌بادی بیوتینیله (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکروگرم) استفاده شد. پس از انجام الایزا و استفاده از آنتی‌ژنی که برای ایمونیزاسیون آماده شده بود، غلظت‌های بهینه

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.4.8]

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

یک و ۸۰ میکروگرم به ترتیب برای آنتی‌بادی اولیه و بیوتینیله به دست آمد که در این غلظت‌ها میزان جذب نوری بالاتر بود. برای بررسی اختصاصیت آزمون، پس از بهینه‌سازی غلظت‌های مورد نیاز در باره آنتی‌بادی‌های اولیه و بیوتینیله، اختصاصیت آن بررسی شد، در این تست از آنتی‌ژن پنوموکوک برای ارزیابی آزمون استفاده شد و نتایج نشان‌دهنده جذب نوری پایین (صفر) در باره پنوموکوک بود که نشان‌دهنده اختصاصیت بالای آزمون است. همچنین مقدار پیشگویی مثبت (PPV) و منفی (NPV) برای کیت تشخیصی راه‌اندازی شده به ترتیب ۱۰۰درصد و ۹۶ درصد است. علاوه بر این، برای بررسی Limit of Detection (LoD) آزمون نیاز به انجام آزمایش‌های تکمیلی بیشتر است. همچنین از این آزمون باید برای نمونه‌های بالینی نیز استفاده شود.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق با تولید آنتی‌سرم پلی‌کلونال و خالص‌سازی آن با استفاده از روش‌هایی چون تانژنشیال فلوفیلتریشن، علیه منتگوکوک علاوه بر استفاده در روش‌های آگلوتیناسیون که زمان تشخیص را تسریع می‌بخشد، می‌توان بعد از انجام تمام مراحل کنترل کیفی در کیت‌های اختصاصی مانند الایزا نیز استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بر اساس پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم مریم حجازی در انستیتو پاستور ایران، مجتمع تولیدی- تحقیقاتی کرج انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر با کد اخلاق IR.PII.REC.1399.006 در شورای پژوهشی انستیتو پاستور ایران تصویب شده است.

تأمین بودجه

اظهار نشده است.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.4.8]

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

References

1. Borrow R, Lee JS, Vázquez JA, Enwere G, Taha MK, Kamiya H, et al. Meningococcal disease in the Asia-Pacific region: Findings and recommendations from the Global Meningococcal Initiative. Vaccine. 2016; 34(48): 5855-62. Doi: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.10.022

2. Agier L, Martiny N, Thiongane O, Mueller JE, Paireau J, Watkins ER, et al. Towards understanding the epidemiology of Neisseria meningitidis in the African meningitis belt: a multi-disciplinary overview. International Journal of Infectious Diseases. 2017; 54: 103-12. Doi: https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.10.032

3. Sanogo YO, Guindo I, Diarra S, Retchless AC, Abdou M, Coulibaly S, et al. A New Sequence Type of Neisseria meningitidis Serogroup C Associated With a 2016 Meningitis Outbreak in Mali. The Journal of Infectious Diseases. 2019; 220 (4): 190–97. Doi: https://doi.org/10.1093/infdis/jiz272

4. Mounkoro D, Nikiema CS, Maman I, Sakandé S, Bozio CH, Tall H, et al. Neisseria meningitidis Serogroup W Meningitis Epidemic in Togo. The Journal of Infectious Diseases. 2019; 220(4): 216–24. Doi: https://doi.org/10.1093/infdis/jiz330

5. Soeters HM, Diallo AO, Bicaba BW, Kadadé G, Dembélé AY, Acyl MA, et al. Bacterial Meningitis Epidemiology in Five Countries in the Meningitis Belt of Sub-Saharan Africa, 2015–2017. The Journal of Infectious Diseases. 2019; 220 (4): 165–74. Doi: https://doi.org/10.1093/infdis/jiz358.

6. Heckenberg SG, De Gans J, Brouwer MC, Weisfelt M, Piet JR, Spanjaard L, et al. Clinical Features, Outcome, and Meningococcal Genotype in 258 Adults With Meningococcal Meningitis. Medicine. 2008; 87(4): 185-92. Doi: 10.1097/MD.0b013e318180a6b4.

7. Kauffman CA, Pappas PG, Patterson TF. Fungal infections associated with contaminated methyprednisolone injections-preliminary report. N Engl J Med. 2013; 368: 2495-500. Doi: 10.1056/NEJMra1212617.

8. Pace D, Pollard AJ, Meningococcal disease: Clinical presentation and sequelae. Vaccine. 2012; 30(2): B3-B9. Doi:https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.062.

9. Thwaites G, Chau TT, Mai NT, Drobniewski F, McAdam K, Farrar J. Tuberculous meningitis. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry. 2000; 68(3): 289–99. Doi:10.1136/jnnp.68.3.289.

10. El Bashir H, Laundy M, Booy R. Diagnosis and treatment of bacterial meningitis. Archives of Disease in Childhood. 2003; 88: 615-20.

11. Takada S, Fujiwara S, Inoue T, Kataoka Y, Hadano Y, Matsumoto K, et al. Meningococcemia in Adults: A Review of the Literature. Internal medicine. 2016; 55 (6): 567-72. Doi: https://doi.org/10.2169/internalmedicine.55.3272

12. Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE. Essentials of clinical mycology (2nd ed. ed.). New York: Springer. p. 31. ISBN 978-1-4419-6639-1

13. Young EJ, Cardella TA. Meningococcemia Diagnosed by Peripheral Blood Smear. JAMA. 1988; 260(7): 992. Doi:10.1001/jama.1988.03410070120051

14. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. AIDS. 2009; 23 (4): 525–30. Doi:10.1097/QAD.0b013e328322ffac

15. Clarke W. Contemporary Practice in Clinical Chemistry. 2nd ed. AACC; 233-246.

16. Abro AH, Saleh Abdou AM, Ustadi AM, Saleh AA, Younis NJ, Doleh WF. CSF lactate level: A useful diagnostic tool to differentiate acute bacterial and viral meningitis. Journal of the Pakistan Medical Association. 2009; 59(8):508-11.

17. Wilson MR, Sample HA, Zorn KC, Arevalo S, Yu G, Neuhaus J, et al.Clinical Metagenomic Sequencing for Diagnosis of Meningitis and Encephalitis. N Engl J Med 2019; 380: 2327-40. Doi: 10.1056/NEJMoa1803396

18. Moris G, Garcia-Monco JC. The Challenge of Drug-Induced Aseptic Meningitis. Archives of Internal Medicine. 1999; 159(11):1185–94. Doi:10.1001/archinte.159.11.1185.

19. Van de Beek D, Cabellos C, Dzupova O, Esposito S, Klein M, Kloek AT, et al. Diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis. EMCD guideline. 2016. Doi: https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.007

20. Gleissner B, Chamberlain MC. Neoplastic meningitis. Lancet Neurol. 2006; 5 (5): 443–52. Doi:10.1016/S1474-4422(06)70443-4

21. Sanborn WR, Heuck CC, Aouad RE, Storch WB. Fluorescence microscopy for disease diagnosis and environmental monitoring [Internet]. 28th ed. Organization WH, Mediterranean RO for the E, Cairo, editors. 2005. 188–190 p. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/119734/dsa281.pdf?sequence=1&isAllowed=y

22. Nasiri H, Valedkarimi Z, Aghebati-Maleki L, Abdolalizadeh J, Kazemi T, Esparvarinha M, et al.. Production and purification of polyclonal antibody against F(ab')2 fragment of human immunoglobulin G. Veterinary Research Forum, 2017; 8(4): 307-312.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.4.8]

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

23. Antibody Biotinylation protocol [Internet]. Abcam. Available from: https://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/biotin_conjugation.pdf

24. General procedure and tips for sandwich ELISA [Internet]. Abcam. Available from: https://www.abcam.com/protocols/sandwich-elisa-protocol-1

25. Tavares WM, Machado AG, Matushita H, Plese, JP. CSF markers for diagnosis of bacterial meningitis in neurosurgical postoperative patients. Arquivos de Neuro-Psiquiatria. 2006; 64(3a):592-5. Doi:https://doi.org/10.1590/S0004-282X2006000400012

26. Hrishi AP, Sethuraman M. Cerebrospinal Fluid (CSF) Analysis and Interpretation in Neurocritical Care for Acute Neurological Conditions. Indian Journal of Critical Care Medicine. 2019; 23(2):115-19. DOI: 10.5005/jp-journals-10071-23187

27. Favaro M, Savini V, Favalli C, Fontana C. A Multi-Target Real-Time PCR Assay for Rapid Identification of Meningitis-Associated Microorganisms. Mol Biotechnol. 2013; 53: 74–9. Doi:https://doi.org/10.1007/s12033-012-9534-7

28. Chanteau S, Dartevelle S, Mahamane AE, Djibo S, Boisier P, Nato F. New Rapid Diagnostic Tests for Neisseria meningitidis Serogroups A, W135, C, and Y. PLoS Medicine. 2006; 3(9):1579-1586. Doi: 10.1371/journal.pmed.0030337

29. Nato F, Mazie JC, Fournier JM, Slizewicz B, Sagot N, Guibourdenche M, et al. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against group A, B, and C capsular polysaccharides of Neisseria meningitidis and preparation of latex reagents. Infect Immun. 1983; 42(3): 863–868.

30. Belo EF, Coutinho LM, Ferraz AS, Gaspari EN. Production of monoclonal antibody to subtype 9 of Neisseria meningitides and the distribution of this subtype in Brazil. Braz J Infect Dis. 2004; 8(6):407-18. Doi: 10.1590/S1413-86702004000600004

31. Sugasawara RJ, Prato C, Sippel JE. Monoclonal antibodies against Neisseria meningitidis lipopolysaccharide. Infect Immun. 1983; 42(3): 863–68. Doi: 10.1128/IAI.42.3.863-868.1983

32. Reyes F, Amin N, Alfaro OO, Aguilar A. Four monoclonal antibodies against capsular polysaccharides of Neisseria meningitidis serogroups A, C, Y and W135: Its application inidentity tests. Biologicals. 2013; 41(4):275-8. Doi:10.1016/j.biologicals.2013.05.002

33. Fassina G, Ruvo M, Palombo G, Verdoliva A, Marino M. Novel ligands for the affinity-chromatographic purification of antibodies, Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 2001; 49(1-3): 481-90. Doi:https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00215-9.

34. Gagnon P.Technology trends in antibody purification Journal of Chromatography A. 2012; 1221: 57-70. Doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.034.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.17355311.1401.46.2.4.8]

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.