

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 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.

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. meningitidis*.

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.

*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

طراحی و توسعه تکنیک الایزا برای شناسایی IgG علیه نایسریا مننژیتیدیس با استفاده از تخلیص آنتی سرم

مریم حجازی^۱، مهدی پریان^{۲*}، رحمان شکری^۲

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

۲- بخش تولید آنتی ژن و آنتی سرم، 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 توسعه یافته است. مننگوکوک بر اساس ویژگی های سرولوژیکی آنتی ژن های کپسولی به ۱۳ سرگروپ طبقه بندی می شوند. شناسایی سریع باکتری در دوره بیماری سبب انتخاب درمان ضد میکروبی در اسرع وقت می شود. هدف از این تحقیق، تهیه آنتی سرم علیه انواع سرگروپ های مننگوکوک با درجه خلوص بالا برای استفاده در تست های تشخیصی است.

روش کار: نوع مطالعه تحقیق و توسعه است. سوسپانسیون غیرفعال شده باکتری به خرگوش سفید نیوزیلندی تزریق شد. جمع آوری سرم یک هفته بعد از آخرین تزریق انجام شد. خالص سازی با روش های رسوب دهی، تانژنشیال فلوفیلتریشن و کروماتوگرافی انجام شد. از آنتی سرم تولید شده در تست آگلوتیناسیون و طراحی آزمون الایزا استفاده شد.

یافته ها: یافته ها نشان داد که آنتی سرم به دست آمده از لحاظ کیفیت (درجه خلوص بالا، بیشتر از ۹۸ درصد) و کمیت (غلظت پروتئین مناسب) از درجه بالایی برخوردار است. تست آگلوتیناسیون با آنتی ژن اولیه به صورت ۴+ بود. غلظت های بهینه برای طراحی آزمون الایزا ۱ و ۸۰ میکروگرم به ترتیب برای آنتی بادی اولیه و بیوتینیل به دست آمد. نتایج ارزش پیشگویی مثبت یا Positive predictive value ۱۰۰ درصد و ارزش پیشگویی منفی Negative predictive value ۹۶ درصد برای آزمون طراحی شده به دست آمد.

نتیجه گیری: تشخیص سریع بیماری به وسیله آزمایش های مختلف مانند تست های سرمی که دارای حساسیت، اختصاصیت و سرعت عمل بالا و هزینه کمتری هستند، توصیه می شود. همچنین با توجه به درجه خلوص بالای به دست آمده در این مطالعه، می توان از این آنتی سرم در تست های 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: mparayan@gmail.com؛ شناسه ارکید: 0000-0002-2592-3528

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

مقدمه

مننگوکوک به عنوان یکی از عوامل مهم مرگ و میر در کودکان کشورهای توسعه یافته و همچنین سبب اپیدمی در آسیا و آفریقا است (۱-۴). اگرچه اپیدمی‌شناسی مننژیت باکتریایی از یک کشور به کشور دیگر دارای تغییرهای وسیعی است، ولی سرگروپ‌های مختلف مننگوکوک با اپیدمی‌های متعددی همراه بوده‌اند (۵). در کشورهای پیشرفته مننژیت باکتریایی از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر، ۶-۲/۶ نفر را آلوده می‌کند و در کشورهای کمتر توسعه یافته به کمتر از ۱۰ برابر این میزان می‌رسد (۶،۷). 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 حدود ۲۰-۱۰ درصد افراد مبتلا را سالیان متمادی درگیر می‌کند. همچنین عواقب اقتصادی و اجتماعی نامطلوب آن نیز جامعه را متأثر می‌سازد. بیماری مننژیت در پزشکی همواره به عنوان یک مورد اورژانسی مطرح بوده و بسیار مهلک است (۸،۹).

برای افراد مشکوک به مننژیت، 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 مننگوکسمی، نمونه خون از نظر وجود باکتری بررسی می‌شود (۱۱-۱۳). مهمترین آزمایش برای تایید یا رد مننژیت، 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 مننژیت 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 مننژیت باکتریایی استفاده می‌شود که مقدار آن در مننژیت کمتر از مقدار طبیعی آن است. سطح بالای لاکتات در CSF نشان‌دهنده احتمال وجود مننژیت 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 مننژیت باکتریایی را رد می‌کند (۱۵،۱۶). آزمایش‌های تخصصی متنوع دیگری را هم می‌توان برای تشخیص عوامل مننژیت 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 مننژیت باکتریایی و لمفوسیت‌ها در مننژیت ویروسی) دیگر روش تشخیصی است که در شروع بیماری کارایی لازم را ندارد، همچنین اتوزینوفیل 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 ایمونیزاسیون 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 مننگوکوک 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 مننگوکوک (سرگروپ‌های 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.

غیرفعال سازی باکتری و تزریق آنتی ژن به خرگوش: برای غیرفعال سازی، لوله های حاوی باکتری به مدت نیم ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد داخل شیکر بن ماری قرار گرفتند. سپس لوله ها به مدت یک ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد 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، رنگ آمیزی 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 میلی لیتر) از این محلول در فاصله زمانی ۷۲ ساعت به صورت داخل وریدی گوش به خرگوش سفید نیوزیلندی تزریق شد.

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

تست آگلوتیناسیون: برای بررسی اولیه آنتی سرم به دست آمده، تست آگلوتیناسیون روی اسلاید شیشه ای انجام شد. ۳۰ میکرولیتر از آنتی سرم را با ۳۰ میکرولیتر از آنتی ژن (باکتری غیرفعال شده مننگوکوک) روی صفحه شیشه ای مخلوط شد. پس از یک دقیقه نتایج آگلوتیناسیون مشاهده و بررسی شد.

تخلیص و بررسی کیفیت آنتی بادی: برای خالص سازی پروتئین ابتدا عمل رسوب دهی با استفاده از آمونیوم سولفات (Merck, Cat. No. 101217) انجام شد. حجم مساوی از سرم خرگوش به محلول (NaCl(0.15M, Merck, Cat. No. 106404) اضافه شد و مخلوط حاضر روی همزن با سرعت ۲۰۰

دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس حجم مساوی از آمونیوم سولفات اشباع (۱۰۰ درصد، ۱۰۰ گرم از آمونیوم سولفات در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته شده و یک شبانه روز روی استیرر گذاشته می شود و از محلول رویی به عنوان آمونیوم سولفات اشباع استفاده می شود) 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 ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه و با سرعت ۱۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول شفاف رویی را دور ریخته و رسوب به دست 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 یون های آمونیوم سولفات و تغلیظ نمونه، از دستگاه tangential flow filtration (Labscale 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. Phosphate-buffered saline و در برابر محلول PBS; Gibco, Cat. No.18912014) با pH: 6.4 استفاده شد. برای تایید حذف یون های 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 بی رنگ بودن محلول نشان گر حذف یون های آمونیوم سولفات بود (۲۱).

در مرحله بعد کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از ژل دی اتیل آمینو اتیل سفاروز فست فلو (DEAE Sepharose® Fast Flow, GE17-0709-01 Sigma) برای حذف ناخالصی های باقی مانده انجام شد (۲۱). متعادل سازی با استفاده از پنج حجم ستون (۵۰ میلی لیتر) 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 می شود) انجام شد.

سپس محتوای چاهک‌ها دور ریخته شد و سه بار شست‌وشو با بافر TBST (Tween-20, NaCl (1.5M), Tris (200 mM)) (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 دو 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 سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس سه بار شست‌وشو داده شد و آنتی‌بادی بیوتینیل‌ه را به کمک بافر کونژوگه در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکروگرم رقیق و به تمام چاهک‌ها اضافه شد. دوباره چهار بار شست‌وشو انجام شد.

کونژوگه استرپتواویدین HRP (HRP-Streptavidin, Sigma, Cat. No. RABHRP3-600UL) به تمام چاهک‌ها به جز چاهک‌های ردیف بلانک اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 (MPR4⁺ (Hiperion) قرار گرفت و جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد (۲۴، ۲۱).

یافته‌ها

آگلوتیناسیون روی اسلاید شیشه‌ای: برای بررسی کیفیت و تعیین تیتراژ 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.

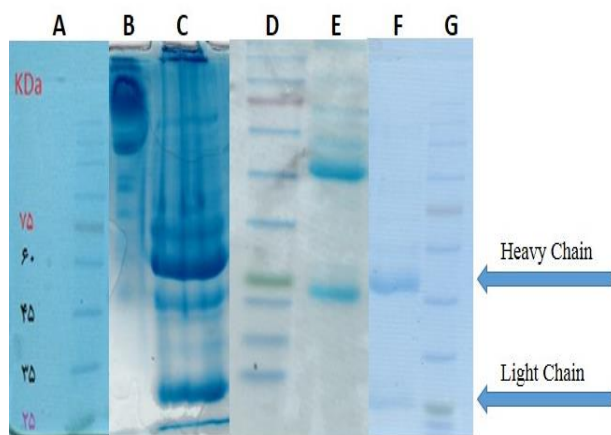
سپس اعمال نمونه انجام شد و دوباره بافر فسفات pH:7.6 افزوده شد تا زمانی که کل پروتئین خارج شد (۲۲). بررسی فراکشن‌های نمونه با استفاده از دستگاه UV detector (Amersham Biosciences AKTA UV-900 Monitor) که اساس کار دستگاه، جذب نوری (OD) بوده یعنی در محدوده طول موج ۲۸۰ نانومتر عمل کرده و به محض اینکه غلظت 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.

کونژوگه کردن 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 به دست 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 Carbonate, 3.332 و Na-Bicarbonate, 5.76 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.

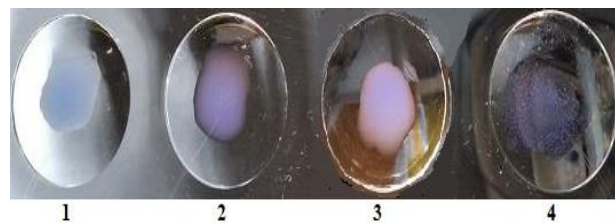
حسب غلظت‌های به کار رفته متفاوت است. بیشترین جذب نوری مربوط به غلظت‌های یک میکروگرم (آنتی‌بادی اولیه) و ۸۰ میکروگرم (آنتی‌بادی بیوتینیل‌ه) است. نتایج حاصل در جدول ۱ نشان داده شده است.



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 فلوئیدیشن و فیلتر ۳۰ کیلودالتونی در شرایط احیا (Reducing)؛ F: بعد از کروماتوگرافی تعویض یونی و فیلتراسیون ۱۰۰ کیلودالتونی با استفاده از روش تانژنشیال فلوئیدیشن 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 طراحی شده برای باکتری پنوموکوک منفی است که نشان‌دهنده اختصاصیت آزمون است.



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

تخلیص آنتی‌بادی: برای ارزیابی کیفی آنتی‌بادی از الکتروفورز ژل ۱۲ درصد 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 فلوئیدیشن و فیلتر ۳۰ کیلودالتونی در شرایط احیا و در نهایت بعد از کروماتوگرافی تعویض یونی و فیلتراسیون ۱۰۰ کیلودالتونی با استفاده از روش تانژنشیال فلوئیدیشن 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 خالص‌سازی شده با استفاده از روش برادفورد به ترتیب بعد از رسوبدهی با آمونیم سولفات (۲۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر)، بعد از کروماتوگرافی تعویض یونی (۱۷/۲۳ میلی گرم بر میلی لیتر) و در نهایت بعد از خالص‌سازی نهایی با TFF و فیلتر ۱۰۰ کیلودالتونی (۱۳/۱۲۲ میلی گرم بر میلی لیتر) 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

غلظت آنتی بادی بیوتینیل شده													
غلظت آنتی بادی اولیه		B	C ⁻	۵ µg		۱۰ µg		۲۰ µg		۴۰ µg		۸۰ µg	
	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
	۵ µg	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 آنتی بادی ستون‌های افقی غلظت آنتی بادی بیوتینیل (میکروگرم بر میلی لیتر) و ستون‌های عمودی غلظت آنتی بادی اولیه (میکروگرم بر میلی لیتر). هر غلظت به صورت دوبار تکرار گذاشته شده است. غلظت آنتی بادی بیوتینیل شده به ترتیب (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکروگرم) و غلظت آنتی بادی 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 مننگوکوک و نمونه ۱/۱۰۰ رقیق شده مننگوکوک 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 راه اندازی شده به ترتیب، ۱۰۰ و ۹۶ درصد است.

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 آنتی سرم‌های پلی‌والان در تشخیص گروه‌های باکتریایی سفارش شده است. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۶، از دو روش تشخیصی سریع برای شناسایی سروگروپ‌های A، W135، C و Y استفاده کردند. آن‌ها با استفاده از آنتی بادی‌های تولید شده علیه این سروگروپ‌ها، سروگروپ‌های A و W135 که عوامل عمده مننژیت در آفریقا بودند را شناسایی کردند (۲۸). این مطالعه با پژوهش حاضر قابل مقایسه بوده که در آن با تولید آنتی بادی پلی‌کلونال در خرگوش برای استفاده در تست‌های مختلفی همچون آگلوتیناسیون، الایزا، می‌توان سروگروپ‌های مختلف مننگوکوک را شناسایی کرد. Nato و همکاران در سال ۱۹۹۱، آنتی بادی‌های مونوکلونال و پلی‌کلونال علیه کپسول پلی‌ساکاریدی سروگروپ‌های A، B و C مننگوکوک تولید کردند. آن‌ها این کار را برای توسعه معرف‌های ایمونولوژیکی برای تشخیص آنتی‌ژن‌های محلول در طول مننژیت مننگوکوکی و

تشخیص واقعی			
تشخیص در روش طراحی شده	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 راه‌اندازی شده پیشگویی مثبت (PPV): ۱۰۰ درصد؛ پیشگویی منفی (NPV): ۹۶ درصد.

بحث

از آزمون‌هایی که برای تشخیص مننژیت به کار می‌رود، بررسی مایع مغزی نخاعی (CSF) از لحاظ میزان گلوکز، پروتئین‌ها و سلول‌هاست (۲۵، ۲۶). 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 به وسیله آزمایش‌های مختلف که دارای

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. آنتی‌بادی 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 از 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 از 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 بیوتینیل، از غلظت‌های مختلف آنتی‌بادی اولیه (۱، ۲، ۵ و ۱۰ میکروگرم) و آنتی‌بادی بیوتینیل (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

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 پلی‌ساکاریدی (در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نیست (۲۹). در مطالعه حاضر آنتی‌سرم 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 لیپوپلی‌ساکارید مننگوکوک توسط Sugawara و همکاران در سال ۱۹۸۳ و همچنین تهیه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه کپسول پلی‌ساکاریدی سروگروپ‌های A، C، W135 و Y توسط Reyes و همکاران 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 (۳۳، ۳۴).

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.

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 ۱۰۰ درصد 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 فلوئیدیشن، علیه مننگوکوک 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 منافی را گزارش نکرده‌اند.

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 methylprednisolone 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, Laundry 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. Meningococemia 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. Meningococemia 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. AACCC; 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.

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, Darteville S, Mahamane AE, Djibo S, Boissier 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 meningitidis* and the distribution of this subtype in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2004; 8(6):407-18. Doi: 10.1590/S1413-86702004000600004
31. Sugawara 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 in identity 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](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>.