

طراحی کیت الایزای ایمنی-تسخیری برای سنجش قدرت ایمنی‌زایی واکسن هاری

چکیده

دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۸ ویرایش: ۱۳۹۷/۰۷/۲۵ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۰ آنلاین: ۱۳۹۷/۱۲/۲۸

زمینه و هدف: ارزیابی ایمنی‌زایی واکسن هاری با یک روش ارزان، سریع، دارای دقت بالا و سازگار با ارزش‌های اخلاقی بسیار مهم است، بنابراین پژوهشگران به ارایه روش‌های گوناگونی از جمله انتشار یک طرفه شعاعی، روش آزمایشگاهی ارایه شده توسط انستیتوی سلامت ملی آمریکا پرداخته‌اند. مطالعه حاضر با هدف جایگزینی یک روش برون‌تنی سازگار با معیارهای اخلاق پزشکی به جای روش درون‌تنی انجام شد. با پذیرش این نکته که ایمنی‌زایی واکسن هاری، وابسته به مقدار آنتی‌ژن گلیکوپروتئینی موجود در آن است و این که آنتی‌بادی مونوکلونال تا خوردگی صحیح گلیکوپروتئین و ویروس هاری را تشخیص می‌دهد، مقدار جزو گلیکوپروتئینی می‌تواند نشان‌دهنده مقدار ایمنی‌زا بودن واکسن باشد.

روش بررسی: این مطالعه کاربردی از شهریور ۱۳۹۵ تا شهریور ۱۳۹۷ در آزمایشگاه مرکز همکاری‌های سازمان بهداشت جهانی برای رفرانس و تحقیقات هاری انستیتو پاستور ایران در تهران انجام گرفت. ما برای تعیین مقدار گلیکوپروتئین و ویروس در واکسن‌های مختلف هاری یک الایزای ایمنی-تسخیری (Immune-capture enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) طراحی کردیم.

یافته‌ها: در منحنی استاندارد شیب خط برابر $R^2=0.98$ ($P=0.0013$) محاسبه شد. در واکسن‌های انسانی میانگین بین $5/554-7/366$ (انحراف معیار $0/1039-0/463$ به ترتیب) و ضریب تغییرات $2/436-0/778$ و در واکسن‌های حیوانی میانگین $2/293-5/993$ (انحراف معیارها $0/2724-0/0041$) و ضریب تغییرات $4/546-0/182$ تعیین گردید. برای واکسن حیوانی ضریب همبستگی پیرسون $0/99$ و برای واکسن انسانی این ضریب $0/95$ به دست آمد. همچنین ضریب همبستگی توافقی برای واکسن حیوانی $0/98$ و برای واکسن انسانی $0/95$ بود که نشان‌دهنده وجود توافق متوسط رو به بالا در نمونه‌های واکسن‌های انسانی و حیوانی است.

نتیجه‌گیری: کیت الایزای طراحی شده دارای تکرارپذیری، دقت بینابینی و استواری مناسبی برای سنجش میزان گلیکوپروتئینی واکسن هاری بود که ارتباط مستقیمی با ایمنی‌زایی واکسن داشت.

کلمات کلیدی: الایزا، انستیتوی سلامت ملی آمریکا، گلیکوپروتئین و ویروس هاری، قدرت ایمنی‌زایی واکسن.

فرزانه شیخ‌الاسلامی^{۱*}، صفورا غریب‌زاده^۲، احسان مصطفوی^۳، نرگس میاندهی^۴، فرزانه احمدنژاد^۵، سعید جدیری اسلامی^۶، جواد واعظ^۶، علی مرادی^۶

۱- گروه تحقیقات ویروس‌شناسی، مرکز همکاری‌های سازمان بهداشت جهانی برای رفرانس و تحقیقات هاری، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۲- گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۳- بخش واکسن‌های ویروسی، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، کرج، ایران.

۴- بخش کنترل کیفیت، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، کرج، ایران.

۵- بخش ایمنی سلامت و محیط، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، کرج، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، خیابان ۱۲ فروردین جنوبی، پلاک ۷۵، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه مرکز همکاری‌های سازمان بهداشت جهانی برای رفرانس و تحقیقات هاری، گروه تحقیقات ویروس‌شناسی.

تلفن: ۰۲۱-۶۴۱۱۲۲۲۹

E-mail: f_sheikh@pasteur.ac.ir

مقدمه

است که توسط ویروس‌های هاری ایجاد می‌شود. بیماری هاری پس از بروز علائم بالینی مرگ‌آور است.^۱ هاری در بیش از ۱۵۰ کشور گزارش شده است و براساس آمار سازمان بهداشت جهانی در سال

هاری یک بیماری ویروسی مربوط به سیستم اعصاب مرکزی

ایمنی‌زایی واکسن وابسته به مقدار آنتی‌ژن گلیکوپروتئینی ویروس هاری موجود در آن است و این که آنتی‌بادی مونوکلونال تا خوردگی صحیح گلیکوپروتئین ویروس هاری را تشخیص می‌دهد، جزو گلیکوپروتئینی می‌تواند نشان‌دهنده ایمنی‌زایی واکسن باشد، ما از یک الایزای ایمنی-تسخیری (Immune-capture enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) برای تعیین مقدار گلیکوپروتئین ویروسی تولید شده در واکسن‌های هاری متفاوت استفاده کردیم و نتایج را با سنجش ایمنی‌زایی همان واکسن‌ها به روش آزمایشگاهی ارایه شده توسط انستیتوی سلامت ملی امریکا، به‌طور همزمان مقایسه نمودیم.

روش بررسی

این مطالعه کاربردی از شهریور ۱۳۹۵ تا شهریور ۱۳۹۷ در مرکز همکاری با سازمان بهداشت جهانی برای رفرانس و تحقیقات هاری انستیتو پاستور ایران انجام شد. نمونه واکسن‌های استفاده شده در این طرح شامل ۱۰ بچ متفاوت از واکسن‌های هاری دامی و انسانی شرکت‌های معتبر جهانی بود. آزمون روش آزمایشگاهی ارایه شده توسط انستیتوی سلامت ملی آمریکا برای سنجش ایمنی‌زایی از نوع آزمون‌های درون‌تنی می‌باشد. حیوانات استفاده شده در این آزمون از نظر جنس، نژاد (موش سفید آزمایشگاهی غیرهمخون) وزن (۱۴-۱۱ g) و سن (۲۱ روزه) تا حد امکان یکسان بوده و برای ممانعت از نقش تفاوت‌های فردی بر روی نتایج آزمون به‌طور تصادفی درون گروه‌های آزمایشی توزیع شده بودند، تا میانگین وزن، سن و سلامتی در تمام گروه‌ها یکسان باشد. همه موش‌ها در محیطی فاقد پاتوژن نگهداری می‌شدند (دسترسی مناسبی به آب، غذا، نور و غیره داشتند) که تأییدیه کمیته اخلاق پزشکی انستیتو پاستور ایران را کسب کرده بود. هرچند شرایط محیطی در همه جای محل نگهداری حیوانات یکسان بود ولی برای جلوگیری از تاثیر احتمالی شرایط محیطی بر روی گروه‌های آزمایشی مختلف، قفس‌ها به‌صورت تصادفی در نقاط مختلف حیوانخانه قرار داده شده بودند. در این آزمون رقت‌های متوالی از واکسن‌های استاندارد و نمونه با نسبت‌های (۱:۵، ۱:۲۵، ۱:۱۲۵، ۱:۶۲۵) تهیه و به میزان ۰/۵ ml به روش داخل صفاقی از هر رقت به ۱۶ سر موش کوچک سفید

۲۰۱۳، ویروس هاری سالانه جان بیش از ۵۵۰۰۰ نفر را در سراسر جهان می‌گیرد که بیشتر آن‌ها در آسیا و آفریقا می‌باشند. هر ساله بیش از ۱۵ میلیون نفر در سراسر جهان از خدمات واکسیناسیون پس از مواجهه استفاده می‌نمایند که گمان می‌رود از صدها هزار مرگ‌ومیر در سال جلوگیری می‌نماید.^۲ ویروس هاری با گزش حیوان هار منتقل می‌شود و از طریق نورون‌های حرکتی وارد سیستم عصبی شده و در نهایت به مغز می‌رسد. نورون‌های آسیب‌دیده یا عفونی شده با ویروس هاری می‌توانند توسط سلول‌های T مهاجرت کننده به‌وسیله مکانیسم‌های آپوپتوتیکی مانند آزادسازی سایتوکین‌ها و فاگوسیتوز توسط میکروگلیاها (توسط آزادسازی مواد محافظت‌کننده اعصابی چون پلاسمینوژن و اینترلوکین ۶ از بین برده شوند).^۳ پس از پیدایش علائم بیماری هاری، هیچ درمانی برای هاری وجود ندارد و صددرصد کشنده خواهد بود.^۴

روش آزمایشگاهی ارایه شده توسط انستیتوی سلامت ملی آمریکا اولین بار در ۱۹۳۷ ارایه شده و امروزه برای توزیع واکسن در زنجیره فروش گواهی انجام آن لازم است. به‌دلیل گزارش نکردن پاسخ قطعی (قرار گرفتن پاسخ نهایی در فاصله اطمینان بین ۴۰۰-۲۵)، زمان بر بودن، قیمت بالا و فشارهای انجمن‌های حامی حقوق حیوانات و عدم انجام‌پذیری آن در حین تولید، سازمان بهداشت جهانی یکی از اهداف خود را دستیابی به یک تست مناسب برون‌تنی جهت جایگزینی با تست درون‌تنی واکسن هاری قرار داده است.^{۵،۶} از سال ۱۹۷۳ تا سال ۲۰۰۹ انتقادهای فراوانی توسط Kramer و Barth به‌روش آزمایشگاهی ارایه شده توسط انستیتوی سلامت ملی آمریکا وارد شده است، به همین منظور دست‌آوردهای جدید و مناسب برای جایگزینی این روش مورد توجه مجامع معتبر علمی قرار گرفته است و از این‌رو به موازات انتقادات، روش‌های جایگزینی نیز ارایه شده است.^{۷،۸} در کارگاه جهانی سال ۲۰۱۰ آمریکا، توسط کارشناسان مجرب هاری از سراسر جهان پیشنهاد شد برای سنجش ایمنی‌زایی واکسن هاری انسانی و دامی روش دیگری مانند الایزا جایگزین روش آزمایشگاهی ارایه شده توسط انستیتوی سلامت ملی آمریکا شود.^۹ در فارماکوپه ۲۰۱۷ اروپا یک روش جایگزین ایمونولوژیک مانند انتشار یک طرفه شعاعی، یا آزمایشات دیگری براساس اتصال آنتی‌بادی‌های مونوکلونال یا اجزا آنتی‌ژنی (جایگاه‌های ویژه II و III) برای سنجش ایمنی‌زایی پیشنهاد شده‌اند.^{۱۱،۱۰} با پذیرش این نکته که

شده و آنتی‌بادی‌های متصل نشده، حذف شدند. اتصال آنتی‌بادی اولیه به‌وسیله افزودن آنتی‌بادی پلی‌کلونال ثانویه کونژوگه شده با (62- HRP 6520, Invitrogen, USA) درحضور سوبسترای تترامیتیل بنزیدین (ab171523, Abcam, USA) بررسی شد. چگالی نوری نقطه پایانی واکنش در طول موج ۴۵۰ nm توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (BioTek, USA) سنجیده شد. با تعیین مقدار گلیکوپروتئین در واکسن مرجع با این روش و ترسیم منحنی استاندارد، سنجش غلظت جزو گلیکوپروتئینی در نمونه‌های واکسن تولیدی هاری انسانی و دامی انجام شد. پروتکلی برای معتبرسازی تعیین ایمنی‌زایی واکسن هاری به‌روش برون‌تنی طراحی گردید که قابلیت جایگزین شدن به جای روش آزمایشگاهی ارایه شده توسط انستیتوی سلامت ملی آمریکا را دارا باشد. پارامترهایی که در طی معتبرسازی مورد توجه قرار گرفتند عبارتند از: بررسی صحت، با استفاده از واکسن استاندارد ششم سازمان بهداشت جهانی رقت‌های مختلفی ساخته شد و شدت جذب آن‌ها به‌وسیله آزمایش الیزا در طول موج ۴۵۰ nm با دستگاه اسپکتروفوتومتر بررسی گردید. سپس برای واکسن استاندارد سازمان بهداشت جهانی منحنی غلظت براساس چگالی نوری رسم گردید. سپس چگالی نوری نمونه‌های تست نیز با دستگاه اسپکتروفوتومتر سنجیده شده و با توجه به منحنی استاندارد واکسن استاندارد سازمان بهداشت جهانی غلظت‌های جزو گلیکوپروتئینی درون نمونه‌های واکسن‌های گوناگون تعیین شدند. در آنالیز آماری نتایج ناشی از الیزای واکسن‌ها به روش برون‌تنی معادله رگرسیون نمونه‌های استاندارد و تست محاسبه گشتند و با توجه به معادله رگرسیون، شیب خط (ضریب x) به‌دست آمد.

محاسبه تکرارپذیری: تست الیزا برای هر نمونه واکسن سه بار در یک روز و به‌صورت دوتایی انجام شد و میانگین، انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (%CV) محاسبه شد.

یافته‌ها

معادله خط براساس چگالی نوری غلظت‌های استانداردهای ۱۰۰۰، ۶۶۷، ۴۴۵، ۲۹۷ mIU/well رسم شد. در این معادله $Y=2/9769x-6/8457$ ، شیب خط برابر ۲/۹۶ بود و ضریب $R2=0.98$ ($P=0/0013$) بالا نشان دهنده قدرت تبیین

آزمایشگاهی غیرهمخون در روزهای صفر و هفتم تزریق شد. ۱۴ روز پس از اولین تزریق واکسن به موش‌ها، با تزریق داخل مغزی حجمی برابر ۰/۰۳ ml حاوی ۵۰-۱۲ متوسط دوز کشته از ویروس چالش استاندارد هاری سویه ۱۱ (با تیترا مشخص) چالش ویروس با آنتی‌بادی‌هایی که از پیش در بدن موش‌ها ساخته شده بود، صورت پذیرفت.

همزمان با تزریق ویروس چالش در روز چهاردهم، با استفاده از حداقل سه گروه ده‌تایی از همان موش‌ها که دارای سن شش هفته می‌باشند و تهیه رقت سریالی از ویروس چالش، با تزریق داخل مغزی به حجم ۰/۰۳ ml به هر سر موش، تعیین متوسط دوز کشته ویروس چالش به‌کار برده شده نیز، انجام شد. پس از تزریق ویروس چالش در روز چهاردهم، موش‌ها برای ۱۴ دیگر روز نیز مورد پایش قرار گرفتند و تعداد موش‌هایی که پنج روز پس از اولین تزریق داخل مغزی ویروس، با علائم هاری مرده بودند به دقت ثبت گردید. پس از پایان آزمون به یکی از روش‌های Reed and Munch و یا Spearman-Kärber، متوسط دوز موثر (برای واکسن) و متوسط دوز کشته (برای ویروس) برآورد شد.^۶

آزمون الیزا برای سنجش گلیکوپروتئین ویروس هاری و بررسی ارتباط آن با ایمنی‌زایی واکسن طراحی شده از نوع آزمون‌های برون‌تنی می‌باشد. از آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی تولید شده علیه گلیکوپروتئین ویروس هاری (MyBioSource, o, MBS1491332 (USA) در کف چاهک‌های پلیت الیزا (SPL life sciences, South Korea) برای نمونه‌های دوتایی شاهد و تست استفاده کردیم، سپس پلیت یک شب در $4^{\circ}C$ انکوبه شد. روز بعد چاهک‌ها تخلیه شده و جایگاه‌های پروتئینی اضافی با محلول شیرخشک کم‌چربی (Fluka, Germany) ۱٪ (یک ساعت در $37^{\circ}C$) بلوک گردید. پس از آن چاهک‌ها سه بار و هر بار پنج دقیقه با بافر شستشو حاوی توپین ۲۰ (دترجنت) ۰/۵٪ شسته شدند. ۱۰۰ μl از نمونه‌ها به هر چاهک اضافه گردید. نمونه‌های سرم کنترل منفی و نمونه‌های سرم کنترل مثبت نیز استفاده شدند. پلیت الیزا یک ساعت در $37^{\circ}C$ انکوبه شد. پس از آن چاهک‌ها ۳-۵ بار شسته شدند تا مواد اضافی از محیط حذف شوند. پس از آن ۱۰۰ μl آنتی‌بادی مونوکلونال علیه گلیکوپروتئین (ab82460, Abcam, USA) به هر چاهک افزوده گشت و پلیت الیزا یک ساعت در $37^{\circ}C$ انکوبه شد و باز هم چاهک‌ها ۳ تا ۵ بار شسته

گردید. با وجود شباهت ظاهری مطالعه حاضر با برخی از پژوهش‌ها، بیشتر آن‌ها یا سویه‌های ویروس هاری انسانی و یا سویه‌های هاری حیوانی را به طور جداگانه برای سنجش ایمنی‌زایی انتخاب کرده بودند، درحالی‌که در این مطالعه برای ارزیابی کیت طراحی شده از هر دو نوع واکسن‌های هاری سویه حیوانی و انسانی استفاده شد.^{۱۶،۱۷} Cliquet و همکاران (با استفاده از سویه G52 ویروس هاری سویه حیوانی) یک کیت الایزای غیرمستقیم ساده طراحی نمودند و آن را با نمونه‌های گردآوری شده از سگ و گربه امتحان کردند. آن‌ها ادعا کردند، کیت طراحی شده او قابلیت رقابت با تست خنثی شدن ویروس هاری با آنتی‌بادی فلوروسنت را دارد.^{۱۷} Welch و Feyssaguet و همکارانشان با استفاده از کیت طراحی شده توسط Perrin برای شرکت Bio-Rad روی سرم افرادی که علیه هاری واکسینه شده بودند آزمایش‌هایی را انجام داده و ادعا نمودند که این کیت الایزا که از گلیکوپروتئین سویه PV استفاده می‌کند، از لحاظ صحت و دقت قابل مقایسه با تست خنثی شدن ویروس هاری با آنتی‌بادی‌های فلوروسنت و یا تست مهارتی فلوروسنت متمرکز سریع می‌باشد.^{۱۸،۱۹} در مطالعه اخیر در طراحی الایزا از آنتی‌بادی‌های به دام اندازنده، اولیه و ثانویه تجارتي که به راحتی توسط تمام مراکز آزمایشگاهی قابل خرید است، استفاده شد. گذشته از آن نمونه‌های متفاوت واکسن‌های هاری دامی و انسانی با سویه‌های گوناگون، به‌عنوان آنتی‌ژن به‌کار برده شدند که در دسترس تمامی مراکز تحقیقاتی جهان قرار داشتند، بنابراین نتایج مطالعه با نتایج روش آزمایشگاهی ارایه شده توسط انستیتوی سلامت ملی آمریکا از همبستگی بسیار بالایی برخوردار بودند. دقت کیت الایزای طراحی شده پژوهش اخیر به سه پارامتر تکرارپذیری، دقت بینایی و استواری وابسته است. برای کیت طراحی شده، تکرارپذیری با محاسبه میانگین، انحراف‌معیار و ضریب تغییرات انجام گرفت و در واکسن‌های انسانی و حیوانی درصد ضریب تغییرات زیر ۱۰٪ محاسبه گردید که نشان از تکرارپذیری مناسب آزمون‌ها بود. در بررسی دقت بینایی با محاسبه ضریب همبستگی توافقی برای واکسن‌های حیوانی و انسانی مشخص گردید که توافق متوسط رو به بالا در نمونه‌های واکسن‌های انسانی و حیوانی وجود دارد و وجود فاصله اطمینان در نمونه‌های واکسن انسانی و حیوانی نشان‌دهنده انحراف جدی از توافق نتایج نبود. همچنین مقدار R2، ۰/۹۸، به‌دست آمد که معیار

قابل قبول مدل است) شد. مقدار عددی چگالی نوری به جای Y قرار داده شده و در نهایت مقدار X حاصل شد و زمانی که از آن Antilog گرفته شد، محتوای گلیکوپروتئینی واکسن به‌دست آمد. میانگین، انحراف‌معیار (SD) و ضریب تغییرات (%CV) بدون توجه به شرکت سازنده واکسن، برای هر بیج از واکسن‌های آزمایش شده محاسبه شد. در واکسن‌های انسانی میانگین بین ۷/۳۶۶-۵/۵۵۴، (انحراف‌معیار ۰/۱۰۳۹-۰/۰۴۶۳) و ضریب تغییرات ۲/۴۳۶-۰/۷۷۸، به‌دست آمد، درحالی‌که در واکسن‌های حیوانی میانگین ۵/۹۹۳-۲/۲۹۳، (انحراف‌معیارها ۰/۲۷۲۴-۰/۰۰۴۱) و ضریب تغییرات ۴/۵۴۶-۰/۱۸۲ محاسبه شد.

بحث

در مطالعه حاضر، نوعی الایزای غیرمستقیم برای سنجش محتوای گلیکوپروتئینی واکسن ویروسی هاری طراحی شد و نتایج ایمنی‌زایی‌های به‌دست آمده از این آزمایشات با نتایج ایمنی‌زایی‌های حاصل از آزمایشات انجام شده به روش ارایه شده توسط انستیتوی سلامت ملی آمریکا مقایسه گردید. دلیل انتخاب گلیکوپروتئین ویروس هاری به‌عنوان آنتی‌ژن کوت شونده در کف پلیت این بود که کمابیش ۸۳٪ آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده علیه دومین III این آنتی‌ژن (به دلیل ساختار فضایی سه بعدی گلیکوپروتئین) تولید می‌شوند.^{۲۰،۲۱} برخلاف برخی از مطالعات، در این مطالعه از گلیکوپروتئین تخلیص شده از ویروس استفاده نگردید، چون حالیت این گلیکوپروتئین خالص سبب کاهش ایمنی‌زایی آن نسبت به گلیکوپروتئین در حالت اصلی متصل به ویروس هاری می‌شد.^{۱۳،۱۴} از سوی دیگر چون توالی گلیکوپروتئین ویروس هاری در بین سویه‌های گوناگون ویروس هاری تنوع بسیار کمی دارد از پروتئین‌های دیگر ویروس هاری استفاده نگردید.^{۱۵}

نکته دیگر این که در این پژوهش برخلاف برخی از روش‌ها که گلیکوپروتئین به فرم خالص یا حالت اصلی را در کف پلیت کوت می‌کنند، از آنتی‌بادی به دام اندازنده گلیکوپروتئین متصل به ذره ویروسی استفاده شد و برای افزودن بر دقت روش، از آنتی‌بادی مونوکلونال اولیه (بر ضد گلیکوپروتئین ویروس هاری) و ثانویه متصل به آنزیم پراکسیداز (آشکارساز) بر ضد آنتی‌بادی اولیه استفاده

کیت Immuno-capture ELISA برای سنجش محتوای گلیکوپروتئینی واکسن هاری " مصوب انستیتو پاستور ایران در سال ۱۳۹۵ با شماره ۱۹ می باشد که با حمایت مرکز همکاری های سازمان بهداشت جهانی برای رفرائس و تحقیقات هاری، انستیتو پاستور ایران در تهران و بخش واکسن های ویروسی، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران در کرج انجام شده است.

بسیار مناسبی برای نشان دادن خطی بودن کیت طراحی شده بود. کیت طراحی شده براساس الایزای (ایمنی-تسخیری) به دام اندازنده آنتی ژن ویروس هاری برای سنجش ایمنی زایی واکسن هاری دارای عملکرد مناسب بوده و می تواند برای سنجش سنجش ایمنی زایی واکسن هاری (انسانی و دامی) استفاده گردد. سپاسگزاری: این مطالعه حاصل طرح پژوهشی با عنوان " طراحی

References

- Warrell MJ, Warrell DA. Rabies and other lyssavirus diseases. *Lancet* 2004;363(9413):959-69.
- WHO Expert Consultation on Rabies. 3rd Report. Geneva: World Health Organization; 2018.
- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci* 2002;25(6):313-9.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recovery of a patient from clinical rabies: Wisconsin, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004;53(50):1171-3.
- Statistical Analysis of Results of Biological Assays and Tests (Parallel Line Analysis Described in Section 3.2). European Pharmacopeia Monograph 5.3 (01/2008). in Section 3.2.2008.
- Wilber LA, Aubert MFA. The NIH test for potency. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editors. *Laboratory Techniques in Rabies*. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996. P. 360-8.
- Barth R, Diderrich G, Weinmann E. NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine. *Vaccine* 1988;6(4):369-77.
- Krämer B, Kamphuis E, Hanschmann KM, Milne C, Daas A, Duchow K. A multi-dose serological assay suitable to quantify the potency of inactivated rabies vaccines for veterinary use. *Biologicals* 2013;41(6):400-6.
- Isbrucker R, Levis R, Casey W, McFarland R, Schmitt M, Arciniega J, et al. Alternative methods and strategies to reduce, refine, and replace animal use for human vaccine post-licensing safety testing: state of the science and future directions. *Procedia Vaccinol* 2011;5:47-59.
- Gibert R, Alberti M, Poirier B, Jallet C, Tordo N, Morgeaux S. A relevant in vitro ELISA test in alternative to the in vivo NIH test for human rabies vaccine batch release. *Vaccine* 2013;31(50):6022-9.
- Gamoh K, Senda M, Itoh O, Muramatsu M, Hirayama N, Koike R, et al. Use of ELISA for in vitro potency test of rabies vaccines for animal use. *Biologicals* 1996;24(2):95-101.
- Kramer RA, Marissen WE, Goudsmit J, Visser TJ, Clijsters-Van der Horst M, Bakker AQ, et al. The human antibody repertoire specific for rabies virus glycoprotein as selected from immune libraries. *Eur J Immunol* 2005;35(7):2131-45.
- Bunschoten H, Gore M, Claassen IJ, Uytdehaag FG, Dietzschold B, Wunner WH, et al. Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the rabies virus glycoprotein. *J Gen Virol* 1989;70 (Pt 2):291-8.
- Dietzschold B, Wiktor TJ, Wunner WH, Varrichio A. Chemical and immunological analysis of the rabies soluble glycoprotein. *Virology* 1983;124(2):330-7.
- Piza AT, Pieri KM, Lusa GM, Caporale GM, Terreran MT, Machado LA, et al. Effect of the contents and form of rabies glycoprotein on the potency of rabies vaccination in cattle. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97(2):265-8.
- Holmes EC, Woelk CH, Kassir R, Bourhy H. Genetic constraints and the adaptive evolution of rabies virus in nature. *Virology* 2002;292(2):247-57.
- Cliquet F, McElhinney LM, Servat A, Boucher JM, Lowings JP, Goddard T, et al. Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus-specific antibodies from vaccinated dogs and cats. *J Virol Methods* 2004;117(1):1-8.
- Welch RJ, Anderson BL, Litwin CM. An evaluation of two commercially available ELISAs and one in-house reference laboratory ELISA for the determination of human anti-rabies virus antibodies. *J Med Microbiol* 2009;58(Pt 6):806-10.
- Feyssaguet M, Dacheux L, Audry L, Compoint A, Morize JL, Blanchard I, et al. Multicenter comparative study of a new ELISA, PLATELIA RABIES II, for the detection and titration of anti-rabies glycoprotein antibodies and comparison with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) on human samples from vaccinated and non-vaccinated people. *Vaccine* 2007;25(12):2244-51.

Designing of immuno-capture ELISA assay kit for rabies vaccine potency

Farzaneh Sheikholeslami
Ph.D.^{1*}
Safoora Gharibzadeh Ph.D.²
Ehsan Mostafavi Ph.D.²
Nargess Miyandehi M.Sc.³
Farzaneh Ahmadnejad Ph.D.³
Saeed Godeyri Eslami D.V.M.⁴
Javad Vaez M.Sc.⁴
Ali Moradi M.Sc.⁵

1- Department of Virology, WHO Collaborating Center for Reference and Research on Rabies, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

2- Department of Epidemiology and Biostatistics, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

3- Department of Viral Vaccines, Research and Production Complex of Pasteur Institute of Iran, Karaj, Iran.

4- Department of Quality Control, Research and Production Complex of Pasteur Institute, Karaj, Iran.

5- Department of Health, Safety and Environment, Research and Production Complex of Pasteur Institute of Iran, Karaj, Iran.

* Corresponding author: Department of Virology, WHO Collaborating Center for Reference and Research on Rabies, Pasteur Institute of Iran, No.75, 12 Farvardin St., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-64112229
E-mail: f_sheikh@psateur.ac.ir

Abstract

Received: 10 Oct. 2019 Revised: 17 Oct. 2019 Accepted: 10 Mar. 2020 Available online: 18 Mar. 2020

Background: Potency evaluation of rabies vaccine is a cheap, fast, high precision and consistent with ethical values is critical, so researchers have modified a variety of methods such as: National Institute of Health (NIH) method, Single Radial Immunodiffusion (SRID) and so on. The purpose of the present study was to replace an in vitro method consistent with medical ethics criteria instead of an in vivo method. By recognizing that the potency of the rabies vaccine depends on the amount of glycoprotein antigen content and the monoclonal antibody detect the correct folding of antigen of the rabies virus, then the glycoprotein content could be represent of vaccine potency.

Methods: In this study, we designed an immune-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with three antibodies (capture, primary and secondary) to determine the existent amount of viral glycoprotein in different rabies vaccines, and compared the results at the same time with measuring potency of those vaccines using the NIH method. This applied study was conducted from September 2016 to September 2018 at the Research Laboratory of the World Health Organization Collaborating Center for reference and research on rabies at the Pasteur Institute of Iran in Tehran.

Results: The slope of the standard line was calculated to $R^2=0.98$ ($P=0.0013$). In the humans' vaccines, the mean lied between 5.554-7.336 ($SD=0.0463-0.1039$) and the coefficient of variation was 0.778-2.436 ($SD=0.0041-0.2724$), at the same time in the animals' vaccines the mean were 2.293-5.993 ($SD=0.0041-0.2724$) and the coefficient of variation was calculated 0.182-4.546. For animal vaccines the Pearson correlation coefficient is 0.99 and for the human vaccines this coefficient was 0.95. Also, the concordance correlation coefficient for animal vaccines was 0.98 and for human vaccines is 0.95, indicating a moderate to high concordance in both animals and humans vaccines.

Conclusion: The designed Immuno-capture ELISA kit had a proper acceptance criterion, intermediate precision, good linearity and robustness for measuring the glycoprotein level of the vaccine, which was directly related to the vaccine potency.

Keywords: enzyme-linked immunosorbent assay, National Institutes of Health (U.S.), rabies virus glycoprotein, vaccine potency.