Original Article

بهبود تولید PRP *هموفیلوس آنفلوانزا* تیپ b با استفاده از محیط کشت CY اصلاح شده در مقیاس نیمه صنعتی

فرشاد نجومی[۱]، اشرف محبتی مبارز[۱*]، سید داور سیادت[۲]، علی هاتف سلمانیان[۳]، نیما خرم‌آبادی[۱]

۱- گروه باکتری شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲- گروه ایدز و هپاتیت، انستیتو پاستور، تهران، ایران.
۳- گروه بیوتکنولوژی گیاهی، مؤسسه بین‌المللی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۸/۰۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱۲/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: همـوفیلوس آنفلوانزا، نوعی باسیل گرم منفی است که سویه‌های مختلف آن در دو گروه کپسول‌دار و بدون کپسول طبقه بندی شده‌اند. هموفیلوس آنفلوانزا سروتیپ b، یکی از عوامل شایع مننژیت نوزادان و کودکان زیر ۵ سال در سراسر جهان می‌باشد که از کپسول پلی ساکاریدی آن موسوم به پلی ریبوزیل ریبیتول فسفات (PRP) جهت تولید واکسن‌های کونژوگه گلیکوپروتئینی علیه هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b استفاده شده است. هدف از انجام این مطالعه، بهبود شرایط کشت هموفیلوس آنفلوانزا به منظور افزایش تولید PRP در مقیاس نیمه صنعتی است.

مواد و روش‌ها: سویه استاندارد هموفیلوس آنفلوانزا سروتیپ b ابتدا در فرمانتورهای ۲ لیتری حاوی ۱/۵ لیتر محیط CY (کازآمینواسید- عصاره مخمر) با غلظت‌های عادی و یا اصلاح شده گلوکز، عصاره مخمر، Hemin و NAD (نیکوتینامید آدنین دی نوکلئوتید) کشت داده شد و سپس بذر تلقیحی به طور مجزا وارد فرمانتور ۵۰ لیتری با غلظت‌های عادی و یا اصلاح شده مواد فوق گردید. پس از هر بار فرمانتاسیون، میزان توده سلولی و تولید PRP مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: با استفاده از محیط کشت CY (کازامینواسید- عصاره مخمر) اصلاح شده (گلوکز : ۶، عصاره مخمر: ۲/۵، Hemin: ۰/۰۳ و NAD : ۰/۰۱۵ گرم بر لیتر) و فرمانتاسیون در فرمانتور ۵۰ لیتری، وزن خشک سلولی و غلظت PRP به ترتیب به حدود ۵/۲ و ۱/۱ گرم بر لیتر رسید که در مقایسه با محیط کشت CY معمولی، به طور معنی‌داری افزایش نشان می‌داد.

نتیجه گیری: در مجموع، استفاده از محیط کشت CY اصلاح شده، در کنار کنترل pH و اکسیژن محلول، موجب افزایش و بهبود تولید PRP می‌گردد که بالطبع، کاهش هزینه‌های تولید و در نتیجه، کاهش قیمت تمام شده واکسن‌های کونژوگه هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b را به دنبال دارد.

کلمات کلیدی: هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b، پلی ریبوزیل ریبیتول فسفات، محیط CY، گلوکز، عصاره مخمر

مقدمه

هموفیلوس آنفلوانزا، باسیل گرم منفی هوازی اختیاری، فاقد اسپور و تاژک است که بر اساس وجود یا عدم وجود کپسول پـلی ساکاریدی به ۲ گروه قابل طبقه بندی (کپسول‌دار) و غیرقابل طبقه بندی (فاقد کپسول) تقسیم شده است. این باکتری بر مبنای آنتی ژن کپسولی به سروتیپ‌های a تا f تقسیم شده که در این میان، اهمیت بالینی سروتیپ b از بقیه بیشتر است. از مهم‌ترین عوامل مننژیت باکتریایی در انسان خصوصاً در سنین ۳ ماهگی الی ۳ سالگی می‌باشد. هموفیلوس آنفلوانزا سروتیپ b تا پیش از انجام برنامه‌های مدون واکسیناسیون (حدود ۲۰ سال پیش) بـه عنوان یکـی از عوامل اصلی مرگ و میر نـوزادان در سراسر جهـان به شمار می‌رفت (۱ و ۲) سویه‌های کپسول‌دار هموفیلوس از قدرت تهاجمی بیشتری برخوردار بوده و معمولاً عفونت‌های منتشر و مهاجم در انسان از قبیل مننژیت، آرتریت عفونی، باکتریمی، سپتی سمی و اپی گلوتیت ایجاد می‌نمایند (۳). آنتی ژن کپسولی در این باکتری‌ها ازجنس پلی‌ساکارید است و همانند سایر آنتی ژن‌های پلی ساکاریدی جـزء آنتی ژن‌های غیر وابسته به تیموس و لنفوسیت T می‌باشد که به همین دلیـل، پاسخ ایمنی ضعیفی را خصوصاً در کودکان زیر ۲ سـال بر می‌انگیزد؛ لذا این آنتی ژن‌ها به منظور تولید واکسن باید به صورت کونژوگـه با یک پروتئین حامل مثل توکسوئید دیفتری، توکسوئید کزاز و یا وزیکول غشاء خارجی منـنگوکوک مورد استفاده قرار گیرند (۴ و ۵). واکسن‌های کونژوگه موجب القاء پاسخ ایمنی وابسته به سلول T گردیده و از بروز عفونت‌های

* **نویسنده مسئول: اشرف محبتی مبارز**، گروه باکتری شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۳۸۶۲
Email: mmmobarez@modares.ac.ir

منتشر و مهاجم هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b در اطفال کوچک‌تر از ۱۸ ماه جلوگیری می‌نمایند. با این حال، اکثر واکسن‌های کونژوگه از قیمت بالائی برخوردارند، چرا که مراحل تولید آن‌ها متعدد بوده و هزینه بالائی دارد. اصلاح و بهینه سازی هر یک از مراحل تولید می‌تواند منجر به کاهش قیمت تمام شده واکسن گردد (۶). هدف از انجام این تحقیق، ارتقاء و افزایش تراکم سلول‌های زنده هموفیلوس و به موازات آن تولید بهینه آنتی ژن کپسولی (PRP) در مقیاس نیمه صنعتی به واسطه اصلاح غلظت‌های گلوکز، عصاره مخمر، NAD (dinucleotide) و Hemin در محیط کشت CY (Casaminoacid-Yeast extract) است که در نهایت می‌تواند کاهش قیمت تمام شده واکسن‌های کونژوگه هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b را به دنبال داشته باشد.

مواد و روش‌ها

سویه باکتری: سویه استاندارد هموفیلوس آنفلوانزا سروتیپ b (ATCC 10211) به صورت لیوفیلیزه از انستیتوپاستور ایران تهیه گردید. پس از احیاء اولیه باکتری با تلقیح محیط BHI (Brain Heart Infusion broth) به داخل ویال آن و انکوباسیون به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد CO_2، باکتری به محیط کشت شکلات آگار انتقال یافت. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در جار شمعی در دمای فوق قرار داده شد و پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیائی و آگلوتیناسیون روی لام در مجاورت آنتی سرم اختصاصی PRP، سویه مذکور شناسائی و تأیید شد.

محیط و شرایط کشت: باکتری مورد نظر در یک ارلن حاوی ۲۵۰ میلی لیتر محیط CY کشت داده شد که ترکیبات این محیط در یک لیتر آب مقطر شامل: ۵ گرم عصاره مخمر (مرک، آلمان)، ۱۰ گرم گلوکز (مرک، آلمان)، ۰/۰۲ گرم NAD (مرک، آلمان)، ۰/۰۴ گرم Hemin (سیگما، کانادا)، ۱۰ گرم کازامینواسید (مرک، آلمان)، ۱/۸ گرم NaH_2PO_4 (مرک، آلمان) و ۱۲/۵ گرم Na_2HPO_4 (سیگما، کانادا) بود (۱۱).

پس از تلقیح باکتری به محیط، ارلن مذکور در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۶/۵ درجه سانتی‌گراد با گردش ۲۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. بعد از ورود باکتری‌ها به اواسط فاز لگاریتمی رشد، ۴۰ میلی لیتر از این ارلن برداشته و به ۱/۵ لیتر محیط CY در داخل فرمانتور ۲ لیتری تلقیح گردید. این کار طی ۴ آزمایش مجزا (هر آزمایش با ۳ بار تکرار) انجام گرفت که در هر آزمایش، غلظت ۴ ماده گلوکز، عصاره مخمر، NAD و Hemin از میان مواد تشکیل دهنده محیط CY با سایر آزمایشات متفاوت بود.

آزمایش ۱: گلوکز (۶ گرم)، عصاره مخمر (۲/۵ گرم)، Hemin (۰/۰۳ گرم) و NAD (۰/۰۱۵ گرم) در هر لیتر محیط

آزمایش ۲: گلوکز (۱۰ گرم)، عصاره مخمر (۵ گرم)، Hemin (۰/۰۳ گرم) و NAD (۰/۰۱۵ گرم) در هر لیتر محیط

آزمایش ۳: گلوکز (۶ گرم)، عصاره مخمر (۲/۵ گرم)، Hemin (۰/۰۴ گرم) و NAD (۰/۰۲ گرم) در هر لیتر محیط

آزمایش ۴: گلوکز (۱۰ گرم)، عصاره مخمر (۵ گرم)، Hemin (۰/۰۴ گرم) و NAD (۰/۰۲ گرم) در هر لیتر محیط

پس از شروع فرمانتاسیون و در اوایل فاز لگاریتمی رشد باکتری‌ها، محلول تقویت کننده رشد (feed solution) حاوی گلوکز و عصاره مخمر استریل به میزان ۴۰ میلی لیتر به ازاء هر لیتر محیط کشت پایه به فرمانتورها اضافه گردید که محلول ذخیره آن از انحلال ۲۰۰ گرم گلوکز در ۱ لیتر محلول عصاره مخمر (۱۰۰ گرم بر لیتر) در آب مقطر تهیه شده بود. در اواسط فاز لگاریتمی رشد باکتری‌ها نیز نمونه‌برداری از فرمانتورها به منظور سنجش میزان توده سلولی و PRP صورت گرفت.

به منظور کشت باکتری‌ها در فرمانتور ۵۰ لیتری، در اواسط رشد لگاریتمی باکتری‌ها، ۳۰۰ میلی لیتر از فرمانتور ۲ لیتری برداشت شد و به ۳۶/۷ لیتر محیط کشت CY طی دو آزمایش مجزا افزوده گردید که در آزمایش اول، ترکیب محیط کشت CY به صورت اصلاح شده (مشابه آزمایش اول مرحله قبل) و در آزمایش دوم بدون تغییر (مشابه آزمایش چهارم مرحله قبل) بود. در اواسط فاز لگاریتمی رشد باکتری‌ها نیز نمونه‌برداری از فرمانتورها به منظور سنجش میزان توده سلولی و PRP صورت گرفت.

شرایط فرمانتور: فرمانتور از نوع Contact flow Bilthoven unit با گردش موتور ۴۰۰ الی ۹۰۰ دور در دقیقه، اکسیژن محلول ۳۰ درصد، دمای ۳۶/۵ درجه سانتی‌گراد، pH ۷/۳ و سرعت هوادهی ۰/۶ الی ۰/۸ v.v.m تنظیم گردید.

سنجش توده سلولی: سنجش توده سلولی بر اساس روش مریت و همکارانش صورت گرفت (۱۰)، به این ترتیب که در اواسط فاز لگاریتمی رشد باکتری‌ها، ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت داخل فرمانتور به عنوان نمونه برداشته شد و به یک لوله فالکون که قبلاً توزین گردیده بود، انتقال یافت. نمونه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت با گردش ۶۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ گردید. پس از دور ریختن محلول فوقانی، رسوب باقی‌مانده با استفاده از نرمال سالین به صورت سوسپانسیون درآمد و مجدداً سانتریفیوژ به روش بالا صورت گرفت و مایع فوقانی دور ریخته شد. رسوب حاصل در شرایط خلأ به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از آن توده سلولی خشک شده توزین گردید.

سنجش ریبوز و PRP: سنجش ریبوز و PRP نیز بر مبنای پروتکل مریت و همکارانش انجام شد (۱۰). ابتدا ۱/۵ میلی لیتر از کشت باکتری به مدت ۱۰ دقیقه با گردش ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و ۱ میلی لیتر از محلول فوقانی آن به میکروتیوب جدیدی انتقال یافت. سپس ۵۰ میکرو لیتر ستاولن به آن اضافه گردید. سانتریفیوژ در مدت ۵ دقیقه با گردش ۸۰۰۰ دور در دقیقه صورت گرفت. محلول فوقانی دور ریخته شد و رسوب حاصل در ۱ میلی لیتر کلرید سدیم ۰/۲۵ مولار حل گردید. ۲۵ میکرو لیتر از این محلول به ۱ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر معرف اورسینول و ۱ میلی لیتر کلرید فریک به آن افزوده شد. این مجموعه به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس جذب نوری آن در طول موج ۶۷۰ نانومتر در مقایسه با محلول خالص ریبوز استاندارد (به عنوان شاهد) اندازه‌گیری شد و از ضرب غلظت ریبوز محلول در ضریب ثابت ۲/۵۵، میزان PRP تعیین گردید.

آنالیز آماری: هر آزمایش سه بار تکرار شد. میانگین و انحراف استاندارد تعیین گردید. جهت مقایسه نتایج نمونه‌ها با کنترل نیز از Student t test با استفاده از نرم افزار SPSS 19 انجام گرفت.

نتایج

طی چهار مرحله فرمانتاسیون مجزا در فرمانتور ۲ لیتری (۳ بار تکرار) نتایج زیر بدست آمد:

در آزمایش اول که در آن غلظت‌های گلوکز، عصاره مخمر، NAD و Hemin به صورت اصلاح شده بود (محیط CY اصلاح شده)، حدود ۵ گرم توده سلولی به ازاء هر لیتر محیط کشت به دست آمد و غلظت PRP نیز معادل ۱۰۵۰ میلی‌گرم بر لیتر محاسبه گردید. در دومین آزمایش، غلظت‌های گلوکز و عصاره مخمر با محیط CY عادی هیچ تفاوتی نداشت، ولی غلظت‌های NAD و Hemin به صورت اصلاح شده بود که در نهایت حدود ۴/۱ گرم توده سلولی و ۸۰۵ میلی‌گرم PRP در هر لیتر آن محاسبه و تعیین گردید. آزمایش سوم با غلظت‌های عادی NAD و Hemin و غلظت‌های اصلاح شده گلوکز و عصاره مخمر منتج به استحصال ۴/۵ گرم توده سلولی و ۹۰۲ میلی‌گرم PRP از هر لیتر محیط کشت گردید و بالاخره در چهارمین آزمایش که در آن غلظت هر ۴ ماده تفاوتی با محیط CY عادی نداشت، به ترتیب ۳/۹ گرم و ۷۸۳ میلی‌گرم توده سلولی و PRP در هر لیتر محاسبه شد. نتایج این آزمایشات در جدول ۱ نمایش داده شده است.

جدول ۱: نتایج حاصل از فرمانتاسیون محیط CY با غلظت‌های گلوکز، عصاره مخمر، NAD و Hemin در فرمانتور ۲ لیتری

آزمایش	گلوکز*	عصاره مخمر*	Hemin*	NAD*	وزن خشک سلولی*	PRP**
۱	۶	۲/۵	۰/۰۳	۰/۰۱۵	۵/۱ ± ۰/۲	۱۰۵۰ ± ۲۳
۲	۱۰	۵	۰/۰۳	۰/۰۱۵	۴/۱ ± ۰/۳	۸۰۵ ± ۱۴
۳	۶	۲/۵	۰/۰۴	۰/۰۲	۴/۵ ± ۰/۲	۹۰۲ ± ۱۷
۴	۱۰	۵	۰/۰۴	۰/۰۲	۳/۹ ± ۰/۳	۷۸۳ ± ۱۱

(*: غلظت بر حسب گرم بر لیتر / **: غلظت بر حسب میلی گرم بر لیتر).

بین نتایج حاصل از آزمایش اول با آزمایش‌های دوم و سوم، تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید، اما بین نتایج آزمایش اول (محیط CY اصلاح شده) و چهارم (محیط CY عادی)، اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p<0/01$).

پس از انتقال ۳۰۰ میلی لیتر بذر تلقیحی این دو آزمایش به فرمانتور ۵۰ لیتری در دو نوبت مجزا، به ترتیب ۵/۳ و ۴/۱ گرم توده سلولی از هر لیتر محیط CY اصلاح شده و عادی بدست آمد. غلظت PRP حاصل از این دو فرمانتاسیون نیز به ترتیب معادل ۱۱۶۰ و ۸۵۵ میلی‌گرم در هر لیتر محیط CY اصلاح شده و عادی، محاسبه گردید. در مقایسه میزان وزن خشک سلولی و PRP حاصل از این دو فرمانتاسیون نیز اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت ($p<0/01$).

جدول ۲: نتایج حاصل از فرمانتاسیون محیط CY با غلظت‌های عادی و یا اصلاح شده گلوکز، عصاره مخمر، NAD و Hemin در فرمانتور ۵۰ لیتری

محیط کشت	وزن خشک سلولی (گرم بر لیتر)	PRP (میلی گرم بر لیتر)
CY اصلاح شده	۵/۲ ± ۰/۱۵	۱۱۶۰ ± ۴۵
CY عادی	۴/۱ ± ۰/۳	۸۵۲ ± ۱۶

بحث

امروزه ثابت شده که تولید PRP، صرفاً یک فعالیت وابسته به تراکم باکتری‌ها و میزان توده سلولی در محیط کشت نیست، بلکه مجموعه‌ای از عوامل سلولی و محیطی در این فرایند، اثرگذار هستند (۱۲).

برخی از عوامل محیطی نظیر میزان اکسیژن محلول در محیط و یا pH می‌توانند با تأثیر بر روی تنظیم و یا بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز PRP، تولید آن را کاهش و یا افزایش دهند (۱۱).

گلوکز به عنوان یک قند ساده، نقش بسزائی در تأمین منابع کربن و انرژی مورد نیاز هموفیلوس آنفلوانزا به منظور سنتز PRP ایفاء می‌نماید و غلظت آن در محیط کشت‌های مناسب برای تولید PRP بین ۲ الی ۲۰ گرم در لیتر متغیر می‌باشد. عصاره مخمر نیز از جمله مواد مؤثر بر بیوسنتز PRP است که منبع نسبتاً غنی از ویتامین‌های گروه B، اسیدهای آمینه، عناصرکمیاب و مشتقات اولیگونوکلئوتیدی محسوب می‌شود. غلظت این ماده نیز در محیط کشت‌های مناسب برای تولید PRP بین ۰/۲ تا ۱۵ گرم بر لیتر متغیر می‌باشد. NAD و Hemin هم به عنوان فاکتورهای ضروری برای رشد و متابولیسم هموفیلوس آنفلوانزا شناخته شده‌اند که به صورت محدود به محیط کشت باکتری اضافه می‌گردند.

تاکنون اقدامات متعددی توسط گروه‌های تحقیقاتی مختلف در جهان به منظور بهبود تولید PRP صورت گرفته است. برای نخستین بار اندرسون و همکارانش در سال ۱۹۷۶ میلادی موفق شدند با تغییر در غلظت گلوکز و بافر سدیم فسفات و نیز افزودن ریبوز به محیط کشت، میزان تولید PRP را بین ۶۰ الی ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر افزایش دهند. آن‌ها همچنین اعلام داشتند که چون PRP فقط توسط سلول‌های زنده هموفیلوس تولید می‌شود، لذا هر قدر تراکم سلول‌ها در محیط کشت مایع بیشتر باشد، بالطبع بازده تولید PRP بیشتر خواهد بود و بالعکس (۷). پس از آن محققان تلاش کردند تا با غنی‌سازی هرچه بیشتر محیط کشت هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b و افزودن فاکتورهای رشد مناسب به آن سبب افزایش تراکم سلول‌های زنده و افزایش تولید PRP گردند. کارتی و همکارانش در سال ۱۹۸۵ با جایگزین نمودن محیط کشتی حاوی عصاره مخمر و پپتون ـ سویا به جای محیطBHI مایع، موفق شدند بازده تولید PRP و توده سلولی را به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش دهند (۸ و ۹).

در سال ۲۰۰۰ میلادی، مریت و همکاران وی اظهار داشتند که افزایش غلظت برخی از مواد موجود در محیط کشت از قبیل گلوکز و عصاره مخمر می‌تواند اثرات مهارکننده بر روی ژن‌های دخیل در

تولید PRP داشته باشد. به علاوه آن‌ها با استفاده از تنظیم pH بر روی ۷/۵ و میزان اکسیژن محلول ۵۰ درصد (DOT ۵۰%) و ایجاد اصلاحاتی در محیط کشت CY، موفق شدند تولید PRP را تا حد ۱/۲ گرم بر لیتر افزایش دهند. همچنین نشان دادند که اگر غلظت عصاره مخمر محیط بین ۰/۲ الی ۵ گرم بر لیتر باشد، تولید PRP به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد، اما در غلظت‌های بالاتر از ۵ گرم بر لیتر این ماده، از میزان PRP کاسته می‌گردد و نیز در غلظت‌های بالاتر از ۱۰ گرم بر لیتر گلوکز و ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، به دلیل انباشته شدن برخی متابولیت‌های باکتریایی خصوصاً اسید سوکسینیک در محیط کشت، تولید اختصاصی PRP کاهش می‌یابد (۱۰). تاکاگی و همکارانش در سال ۲۰۰۷ میلادی، با مطالعه بر روی تأثیر pH و هوادهی بر تولید PRP، دریافتند که بهترین pH برای رشد بهینه باکتری و افزایش تولید PRP، محدوده ۷/۲ الی ۷/۶ می‌باشد. آن‌ها با انجام مطالعه بر روی غلظت‌های متغیر NAD و Hemin، اعلام داشتند که در غلظت‌های ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر Hemin و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر NAD در محیط کشت MP اصلاح شده، تولید اختصاصی PRP به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (۱۱).

در سال ۲۰۱۰ میلادی، یرووا (Yeruva) و همکاران وی ۱۱ ماده مختلف موجود در محیط کشت هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b را در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار داده و اظهار داشتند که گلوکز، عصاره مخمر، NAD و نیز Na_2HPO_4 به عنوان مواد اصلی و ضروری، نقش مؤثری در تولید PRP ایفاء می‌نمایند (۱۲).

در مطالعه حاضر، با استفاده از محیط کشت CY با غلظت‌های اصلاح شده گلوکز، عصاره مخمر، NAD و Hemin تولید PRP در مقیاس نیمه صنعتی و با استفاده از فرمانتور ۵۰ لیتری به صورت معنی‌داری در قیاس با محیط CY عادی، افزایش یافت. به علاوه، نتایج این مطالعه حاکی از آن است که در صورت تنظیم pH محیط بر روی ۷/۳ و با اکسیژن محلول ۳۰ درصد، می‌توان فرمانتاسیون را تا ۲۲ ساعت ادامه داد. در این حالت سلول‌های هموفیلوس تا اوایل فاز سکون رشد خود نیز به تولید PRP می‌پردازند، در حالی که چنانچه pH محیط کنترل نشده باشد، حتی در بهترین شرایط نیز حداکثر زمان تولید PRP از ۱۵ ساعت فراتر نخواهد رفت. با توجه به اینکه با استفاده از محیط کشت CY اصلاح شده، غلظت‌های پایه گلوکز، عصاره مخمر، NAD و Hemin تقلیل یافته و تولید PRP در مقایسه با محیط CY معمولی افزایش یافته است؛ لذا استفاده از محیط کشت CY اصلاح شده، می‌تواند با صرفه اقتصادی بیشتر، هزینه‌های تولید صنعتی PRP و در نتیجه، قیمت تمام شده واکسن‌های کونژوگه علیه هموفیلوس آنفلوانزا را کاهش دهد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از دانشگاه تربیت مدرس و انستیتو پاستور ایران که در اجرای این تحقیق از نظر مالی و تکنیکی حمایت کافی را مبذول داشته‌اند.

References

1. Kelly FD, Moxon RE. *Haemophilus influenzae* type b conjugates vaccines. Immunology. 2004;113:163-174.
2. Morris SK, Moss WJ, Halsey N. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine use and effectiveness. Lancet Infect Dis. 2008;8:435-443.
3. Mawas F, Bolgiano B, Rigsby P, Crane D, Belgrave D, Corbel MJ. Evaluation of the saccharide content and stability of the first WHO international standard *for H. influenzae b* capsular polysaccharide. Biologicals. 2007;1-11.
4. Takagi M, Lima RB, Albani SMF, Zangirolami TC, Tanizaki MM, Crespo JC. Purification of capsular polysaccharide produced by *Haemophilus influenzae* type b through a simple, efficient and suitable method for scale up. J Ind Microbiol Bioethanol. 2008;35:1217-1222.
5. Dagan RD, Fraser M, Roitman PS. Effectiveness of a nationwide infant immunization program against *Haemophilus influenzae* type b. Vaccine. 1999;17:134-141.
6. Lindberg A.Glycoprotein conjugates vaccines. Vaccine. 1999;17:s28-s36.
7. Anderson P, Pitt J, Smith DH. Synthesis and release of polyribophosphate by *Haemophilus influenzae* type b in vitro. Infect Immun. 1976;13:581-589.
8. Carty CE, Mancinelli R, Hagopian A, Kovach FX, Rodriguez E, Burke P. Fermentation studies with *Haemophilus influenzae*. Dev Ind Microbiol. 1985;26:763-767
9. Ada G. Carbohydrate protein vaccines. Clin Microbiol Infect. 2003;9:79-85.
10. Merritt J, Allard G, O'Toole L, Swartz R, Licari P. Development and scale-up of a fed-batch process for the production of capsular polysaccharide from H. influenzae. J Biotechnol. 2000;81:189-197.
11. Takagi M, Zangirolami TC, Tanizaki MM, Crespo JC. Improvement of simple cultivation conditions for polysaccharide synthesis by *Haemophilus influenzae* type b. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Microbiology. 2007;602-608.
12. Yeruva S, Mantha S, Tirumalarju A, Rokkam SR. Screening of medium components for Polyribosyl ribitol phosphate production by *Haemophilus influenzae* type b using Plackett-Burman design. J Cell Tissue Res. 2010;10:2349-2352.

Original Article

Improvement of Large-scale PRP Production of *Haemophilus Influenzae* Type b Using Modified CY Medium

Nojoomi F [1], Mohabati Mobarez A[*1], Siadat S D[2], Salmanian A H [3], Khoramabadi N[1]

1- Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2- Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3- Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objective: *Haemophilus influenzae* type b (*Hib*) is a gram negative bacterium which it's serotypes are divided into capsulated and uncapsulated groups. *Hib* is one of the most common causative agents of meningitis in infants and less than 5 years old children worldwide. The *Hib* capsular polysaccharide, polyribosyl ribitolphosphate (PRP), is used for the production of conjugated glycoprotein vaccines against *Hib*. The aim of this study is to improve *Hib* culture situation to increase Large-scale PRP production.

Materials & Methods: *Haemophilus influenzae* type b standard strain (ATCC10211) was cultivated in 2 L fermentors contain 1.5 L CY (casaminoacid yeast extract) medium with normal or modified concentrations of glucose, yeast extract, hemin and NAD (nicotinamide adenine dinucleotide). Then, seeds were separately inoculated to 50 L fermentorin normal or modified concentrations. After each fermentation, range of PRP production and dry cell weight (DCW) were studied.

Results: using modified CY medium (6gl^{-1} Glucose, 2.5 gl^{-1} Yeast extract, 0.03 gl^{-1} Hemin and 0.015 gl^{-1} NAD) with controlled pH at 7.3 and 30% dissolved oxygen tension (DOT) and fermentation in 50 L fermentor resulted to about 5.2 gl^{-1} DCW and 1.1 gl^{-1} PRP that was significantly higher than normal CY medium.

Conclusion: In conclusion, using modified CY medium beside control of dissolved oxygen tension and pH caused the improvement of Large-scale production of PRP and consequently leads to reduce the final cost of *Hib* conjugated vaccines.

Keywords: *Haemophilus influenzae* type b, PRP, CY medium, Glucose, Yeast extract

*** Corresponding author: Mohabati Mobarez Ashraf,** Dept. of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
Tel: +98 21 82883862
Fax: +98 21 82884555
E-mail: mmmobarez@modares.ac.ir