Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 33, No. 4, Winter 2024 ORIGINAL ARTICLE

Comparison of the ATP-bioluminescence assay and the standard colony counting method for evaluation BCG products

***Hamidreza Hozouri*[1], *Delaram Doroud*[2], *Mohammadhossein Hedayati*[3]**
[1] *Assistant professor, Pasteur Institute of Iran, Production and Research Complex*
[2] *Associate Professor, Pasteur Institute of Iran, Production and Research Complex*
[3] *Expert in Cell Biology Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Production and Research Complex*

Abstract

Background: The conventional method of evaluating the efficacy of BCG vaccine products is through colony count, which is very slow and cumbersome. A rapid test for estimating viable bacilli is necessary for vaccine quality control. ATP is a reliable marker for cell viability, and the amount of emitted light during bioluminescence reactions is directly proportional to the ATP content of the bacilli. In this study, the correlation between these two methods was evaluated.
Materials and methods: CFU (colony-forming unit) value and bioluminescence signal (RLU) of BCG products were determined by microbiological conventional method and the special kit respectively. ATP content of the products were estimated based on ATP content and CFU value of standard NIBSC vaccine. Linear regression analysis were done by Graph Pad Prism 8.0 software to determine the extent of correlation between two methods. The coefficient K was determined to calculate the CFU value of BCG products.
Results Linear relationship and significant correlation were obtained between two methods for BCG Bulk (r^2= 0.9874) and Vaccine (r^2= 0.9417) compared to Pastocys (r^2= 0.7692). The coefficients K were determined for BCG and Bulk vaccine (0.447 and 0.26 respectively) and can be used to predict and estimate the CFU value of new bathes of products.
Conclusion: The study suggests that an optimized ATP bioluminescence assay is a rapid, sensitive, and reliable alternative method that can accelerate the quality control process for BCG vaccine.
Keywords: *BCG vaccine, Colony forming units, Bioluminescence ATP assay.*

Cited as: Hozouri HR, Doroud D, Hedayati MH. Comparison of the ATP-bioluminescence assay and the standard colony counting method for evaluation BCG products. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2024; 33(4): **365-371.**

Correspondence to: Hamidreza Hozouri
Tel: *+98 912 121 3439*
E-mail: h_hozouri@pasteur.ac.ir
ORCID ID: 0000-0002-1912-9395
Received: 20 Jun 2023; **Accepted:** 21 Oct 2023

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۳، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۲، صفحات ۳۶۵ تا ۳۷۱

Original Article

مقایسه روش سنجش ATP بیولومینسانس و روش استاندارد شمارش کلنی جهت ارزیابی محصولات ب ث ژ

حمیدرضا حضوری[۱]، دلارام درود[۲]، محمدحسین هدایتی[۳]

[۱] استادیار، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران
[۲]دانشیار، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران
[۳]کارشناس آزمایشگاه بیولوژی سلولی مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران

چکیده

سابقه و هدف: *روش مرسوم سنجش کارایی محصولات واکسن ب ث ژ از طریق شمارش کلونی است که بسیار کند و طاقت فرسا است. به منظور کنترل کیفی واکسن، روشی سریع جهت تخمین باسیل های زنده مورد نیاز است. ATP شناساگر قابل اعتمادی برای قابلیت زنده مانی سلول است و میزان نور ساطع شده در واکنش بیولومینسانس بطور مستقیم وابسته به میزان ATP باسیل ها است. در مطالعه حاضر رابطه میان دو روش فوق مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *تعداد کلونی‌های زنده (CFU) و سیگنال بیولومینسانس (RLU) محصولات BCG به ترتیب با استفاده از روش مرسوم میکروبیولوژیک و کیت اختصاصی تعیین شد. میزان ATP محصولات بر اساس میزان ATP و CFU واکسن استاندارد NIBSC تخمین زده شد. آنالیز رگرسیون خطی جهت تعیین میزان همبستگی دو روش با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism 8.0 انجام پذیرفت. ضریب K جهت محاسبه تعداد کلونی محصولات BCG تعیین شد.*

یافته‌ها: *ارتباط خطی و همبستگی قابل توجهی میان دو روش برای بالک (r^2= ۰/۹۸۷۴) و واکسن BCG (r^2= ۰/۹۴۱۷) در مقایسه با پاستوسیس (r^2= ۰/۷۶۹۲) بدست آمد. ضریب K برای واکسن و بالک BCG تعیین شد که می‌توان از آن جهت پیش بینی و تخمین تعداد کلونی سری ساخت های جدید محصولات استفاده کرد.*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه اشاره می‌کند که روش بهبود یافته بیولومینسانس، روشی سریع، حساس و قابل اعتماد جهت تسریع فرایند کنترل کیفی واکسن BCG است.*

واژگان کلیدی: *واکسن ب ث ژ، واحد تشکیل کلونی، سنجش ATP بیولومینسانس.*

مقدمه

مایکو باکتریوم توبرکلوزیس، باکتری میله ای شکل و عامل بیماری سل یا توبرکلوزیس در انسان است. این بیماری در درجه اول ریه، اما می‌تواند سایر قسمت های بدن را نیز مورد حمله قرار دهد. بیماری سل جزء ده عامل نخست مرگ و میر در سرتاسر جهان است. بیماران مبتلا به سل که به طور هم زمان با ویروس HIV 1 یا مالاریا آلوده می‌شوند، از امکان بهبودی کمتری برخوردار هستند. بنا بر اعلام سازمان جهانی بهداشت (WHO) تا سال ۲۰۱۷ میلادی ۱۰ میلیون نفر به این بیماری مبتلا شدند و تقریبا ۱/۶ میلیون نفر از آنها در اثر بیماری های مرتبط با سل جان خود را از دست دادند. با توجه به میزان بالای مرگ و میر ناشی از بیماری، ضرورت پیشگیری موثر از بیماری با استفاده از واکسن‌های موثر، روش‌های تشخیصی بهتر و نیز درمان با کمک آنتی بیوتیک های موثرتر

آدرس نویسنده مسئول: کرج، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران ، حمیدرضا حضوری
(**email**: h_hozouri@pasteur.ac.ir)
ORCID ID: 0000-0002-1912-9395
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۳/۳۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۷/۲۹

الزامی است. واکسیناسیون با استفاده از سویه تخفیف حدت یافته مایکو باکتریوم بوویس (M.bovis) با ایجاد ۸۰ درصد محافظت در مقایسه با افراد غیر واکسینه، موثرترین روش پیشگیری و کاهش میزان شیوع سل در انسان است. واکسن در کودکان بیشترین اثر را در مقایسه با افراد بالغ و بزرگسال به همراه دارد. ایمنی ایجاد شده در مقابل با سیل توبرکلوزیس اولین بار توسط دو دانشمند فرانسوی به نام های Calmette و Guérin کشف شد و متعاقباً نام واکسن تهیه شده از سویه تخفیف حدت یافته باسیل مایکو باکتریوم بوویس کالمت و گرین یا به اختصار(BCG: Bacillus Calmette–Guérin) نامیده شد (۱, ۲).

از جمله آزمون‌های ضروری جهت کنترل کیفیت واکسن BCG، تعیین تعداد جرم زنده یا به عبارتی فعالیت ویژه واکسن است که با استفاده از روش کشت میکروبی در محیط اختصاصی و شمارش چشمی تعداد کلنی‌ها در رقت‌های استانداردی از واکسن انجام می‌پذیرد. با توجه به محدودیت-های روش فوق معرفی روش‌های جایگزین برای تعیین تعداد باسیل‌های زنده که از سرعت و تکرار پذیری بیشتری در مقایسه با روش کشت میکروبی برخوردار باشد مورد توجه قرار گرفت.

بر این اساس از سال ۱۹۷۰ میلادی روش سنجش میزان ATP بطور موفقیت آمیزی جهت مطالعه فعالیت ویژه سویه های مختلف BCG مورد استفاده قرار گرفت (۳). در سال ۲۰۰۸ میلادی روش ATP بیولومینسانس جهت ارزیابی واکسن لیوفیلیزه ب ث ژ به کار رفت و جزئیات آن به همراه معتبرسازی روش منتشر شد. با استفاده از این روش، مدت زمان آزمون از چند هفته به دو روز کاهش یافت (۴). این روش طی یک مطالعه بین المللی توسط سازمان جهانی بهداشت و در شش آزمایشگاه از کشور های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت و در سال ۲۰۱۶ میلادی پروتکل جدیدی از آن با میزان همبستگی خوبی در مقایسه با آزمون شمارش کلنی تدوین شد (۵).

در روش ATP بیولومینسانس ابتدا ATP درون سلولی به شیوه های مختلف از نمونه استخراج گردیده سپس با افزودن مخلوطی از آنزیم و سوبسترا (لوسیفراز و د- لوسیفرین) واکنش اکسیداسیون سوبسترا در حضور ATP صورت می گیرد. در طی این واکنش تابش لومینسانسی ایجاد می شود که شدت آن متناسب با میزان ATP در نمونه مورد آزمون می باشد. از آنجا که ATP خارج سلولی منحصرا توسط باسیل های زنده تولید می شود لذا شدت لومینسانس ایجاد شده متناسب با تعداد جرم زنده در نمونه واکسن خواهد بود (۶, ۷). این روش بعد ها توسط Kolibab و همکارانش با افزودن آنزیم آپیراز جهت حذف ATP خارج سلولی تغییر نمود و از حساسیت بیشتری برخوردار گشت. روش بیولومینسانس به عنوان روش سریع بیوشیمیایی در صنایع مختلف از جمله کنترل کیفیت نوشیدنی های تخمیری از نقطه نظر وجود باکتری و مخمر و همچنین تصویر برداری توموگرافی، کاربرد دارد(۶, ۷). در این مطالعه امکان استفاده از روش سنجش ATP بیولومینسانس در مقایسه با روش مرسوم کشت میکروبی و شمارش کلونی، جهت تخمین تعداد باسیل‌های زنده در نمونه‌های بالک، محصول نهایی و واکسن اینتراوزیکال (پاستوسیس) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

در این مطالعه پنج سری ساخت مختلف از محصولات ب ث ژ تولیدی مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران شامل بالک و واکسن و نیز سه سری ساخت از محصول ب ث ژ اینتراوزیکال (پاستوسیس) انتخاب گردید. از هر سری ساخت سه ویال بصورت تصادفی مورد آزمون قرار گرفت.

- شمارش جرم زنده به روش Colony count

به منظور به دست آوردن CFU (Colony-Forming Unit) بالک، واکسن و ب ث ژ اینتراوزیکال (پاستوسیس)، از روش کشت مرسوم در محیط لوون اشتاین جانسون (LJ) استفاده می‌شود (۷). با توجه به نوع نمونه مورد آزمون، رقت‌های لازم را با استفاده از محلول سوتون (رقیق کننده) تهیه کرده و از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت LJ تلقیح می‌گردد. با چرخش سوسپانسیون تلقیح شده داخل لوله‌های کشت، نمونه سوسپانسیون به طور کامل در سطح محیط کشت پخش و جذب می‌گردد. لوله های تلقیح شده برای مدت ۳ تا ۵ هفته در دمای ۳۷ درجه داخل انکوباتور قرار می‌گیرند، سپس کلنی‌های ایجاد شده کرم رنگ، مسطح با اطراف مضرس، شمارش و تعداد جرم زنده در رقت‌های تهیه شده از هر سری ساخت تعیین و توسط نرم افزار مربوطه تعداد نهایی باسیل‌های زنده در هر ویال از نمونه محاسبه می‌گردد.

روش ATP bioluminescence

در این مطالعه از کیت ENLITEN® ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurement محصول شرکت Promega جهت سنجش میزان ATP درون

سلولی به روش بیولومینسانس استفاده شد. معرف rL/L (rLuciferase/Luciferin) در این کیت امکان سنجش 10^{-16}-10^{-11} مول ATP را فراهم می کند. در این روش آزمون لوسیفراز نوترکیب جهت کاتالیز واکنش شیمیائی زیر به کار می رود:

$$\text{Luciferase} + \text{ATP} + \text{Luciferin} + O_2 \xrightarrow[Mg^{2+}]{} \text{Oxy-Luciferin} + \text{AMP} + \text{PPi} + \text{Light quantum}$$

سنجش شدت نور لومینسانس ایجاد شده درون میکروپلیت سیاه رنگ جهت جلوگیری از انتشار جانبی نور لومینسانس ایجاد شده و توسط دستگاه میکروپلیت لومینومتر LUMO Autobio انجام گردید. ابتدا معرف rL/L را که به صورت لیوفیلیزه است با استفاده از حلال موجود در کیت به آرامی حل گردید. این محلول باید قبل از استفاده به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگه داشته شود و از تکان دادن آن خودداری گردد. محلول فوق به مدت ۸ ساعت در دمای اتاق قابل نگهداری است و جهت نگهداری کوتاه مدت، باید آن را در حجم‌های کمتر تقسیم و در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور از نور، نگهداری کرد. فعالیت این معرف پس از دو روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد حدود ۱۵ ٪ کاهش می-یابد؛ لذا جهت نگهداری دراز مدت باید ویال‌های تقسیم شده را درون فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده و از ذوب شدن و یخ زدن مکرر آن جلوگیری کرد. فعالیت این معرف در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد پس از دو هفته ۵۰ ٪ کاهش می‌یابد.

به منظور استخراج ATP درون سلولی با حداقل تخریب، معرف-های استخراج مختلفی وجود دارند (۸, ۹). واکنش لوسیفراز بسیار سریع است و بلافاصله بعد از افزودن معرف آغاز می‌شود (۱۰, ۱۱). لذا نمونه‌ها برای جلوگیری از کاهش میزان لومینسانس به صورت جداگانه، آماده و بلافاصله پس از واکنش، قرائت می‌شوند. میزان لومینسانس نمونه بلانک حاوی rL/L و محلول استخراج از کلیه نمونه های واکسن مورد آزمون کسر گردید. در این روش از محلول DMSO (Dimethyl Sulfoxide) ۸۰ ٪ حجمی/حجمی جهت استخراج ATP درون سلولی استفاده شد (۱۲).

ویال‌های حاوی واکسن و پاستوسیس به ترتیب در ۱ و ۳ میلی لیتر رقیق کننده مخصوص (سوتون)، حل شدند. نمونه‌ها جهت خروج هر نوع گاز احتمالی موجود در ویال که اثر ممانعتی در واکنش بیوشیمیائی فوق دارد، به مدت ۱۵ دقیقه پس از انحلال، زیر هود با درب باز نگهداری شدند. لازم به ذکر است نمونه‌های واکسن و محلول سوتون را قبلا به دمای اتاق رسانده شده بودند.

از واکسن ب ث ژ حاوی سویه Danish 1331 ،که توسط NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) به عنوان رفرانس معتبر استاندارد استفاده گردید. ویال فوق در یک میلی لیتر آب (ATP free) در دمای اتاق حل شد. سوسپانسیون‌های حاصل (واکسن ،پاستوسیس ، بالک واکسن و نمونه ی استاندارد) را به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به منظور یکنواخت شدن سوسپانسیون حاصل و فعال شدن فعالیت متابولیکی باکتری ،در انکوباتور شیکردار (۳۰۰-۴۰۰ rpm) انکوبه شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه (نمونه مجهول و استاندارد) برداشته شد و زیر هود با ۱ میلی لیتر DMSO ۸۰٪ حجمی/حجمی سترون ، جهت استخراج ATP مخلوط کردیم. ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های استخراج شده را پس از مخلوط کردن، برداشته شد و با ۱۰۰ میکرولیتر از معرف لومینسانس کیت rL/L (Reagent که حاوی لوسیفرین/ لوسیفراز نوترکیب است، درون چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای از نوع Black مخلوط شدند. بلافاصله میکرو پلیت در دستگاه قرار گرفته و با استفاده از دستگاه لومینومتر و به کمک نرم افزار مربوطه، مقدار لومینسانس حاصل را بر حسب واحد RLU (Relative Light Unit) قرائت شد. سپس با توجه به انجام آزمایش مشابه بر روی نمونه استاندارد NIBSC که از CFU و میزان ATP مشخصی برخوردار است، ابتدا غلظت ATP نمونه‌های مجهول با توجه به میزان RLU مربوطه در مقایسه با استاندارد محاسبه شد. آنالیزهای آماری جهت بررسی میزان همبستگی نتایج حاصل از دو روش فوق و معنی‌دار بودن مدل رگرسیونی به دست آماده با استفاده از نرم افزار Graphpad Prism 8.0 به انجام رسید و طبق رابطه

ATP (ng/mg) =K ضریب 10^6 (CFU/mg) (ضریب تناسب K میان میزان ATP و فعالیت ویژه محاسبه شده به روش شمارش کلونی) برای هر یک از محصولات محاسبه شد.

یافته‌ها

با توجه به مشخص بودن میزان ATP ویال واکسن استاندارد NIBSC سویه دانمارک (۲۸/۰۵ ng/mg)، محاسبه مقدار ATP حاصل از نمونه‌های مورد آزمون با توجه به نتایج RLU به دست آمده در مقایسه با استاندارد و با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (جدول ۱).

$$\text{ATP (ng/mg)} = \text{ATP (NIBSC)} \times \text{RLU of sample/RLU of NIBSC}$$

با استفاده از ضریب K محاسبه شده و رابطه به دست آمده می‌توان میزان جرم زنده باسیل BCG را با استفاده از روش بیولومینسانس و میزان ATP بدست آمده بطور محاسباتی از پیش تخمین زد.

آنالیز رگرسیون

رابطه آماری میان دو متغیر وابسته (میزانATP) و مستقل (شمارش کلونی) با استفاده از نرم افزار Graphpad Prism 8.0 و با ترسیم نمودار رگرسیون خطی مربوطه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مطابق مدل‌های آماری ترسیم شده و معادلات مربوطه امکان تعیین ضریب K و پیش بینی تعداد کلونی بر اساس میزان ATP میسر خواهد بود (نمودارهای ۱-۳).

تعیین ضریب همبستگی

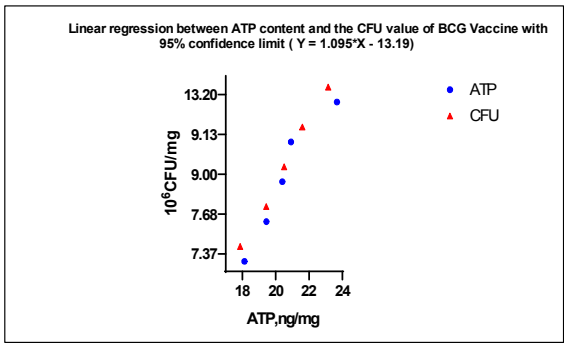
جهت سنجش شدت رابطه بین متغیرهای وابسته و مستقل فوق می‌توان از آزمون تعیین ضریب همبستگی استفاده کرد. هر چه ضریب همبستگی به ۱ نزدیک‌تر باشد، شدت رابطه خطی بین متغیرهای مستقل و وابسته شدیدتر و رابطه بین آن دو مستقیم است. طبق نتایج به دست آمده، میزان R square (r^2) و P value برای محصولات مورد آزمون طبق جدول ۲ است.

تعیین میانگین ضریب K

میزان ATP (ng/mg) مستقیماً متناسب با میزان جرم زنده به روش شمارش کلونی (10^6 CFU/mg) است. این دو متغیر طبق رابطه زیر و با ضریب تناسب K به هم مرتبط می‌شوند:

$$10^6 \text{ (CFU/mg)} = K \times \text{ATP, (ng/mg)}$$

طبق نتایج جدول ۱ میانگین ضریب K در رابطه فوق برای دو محصول واکسن ب ث ژ و بالک واکسن که از نتایج معنی‌داری بر خوردار بودند به ترتیب ۰/۴۴۷ و ۰/۰۲۶ محاسبه شد.



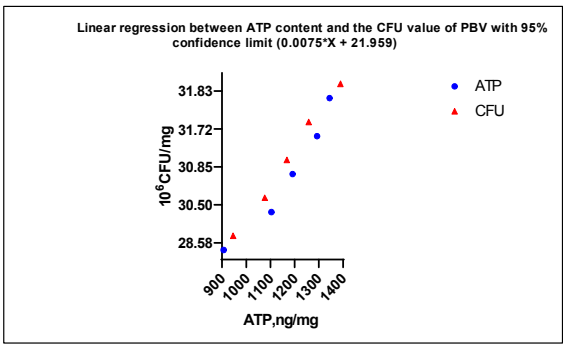
نمودار۱. نمودار رگرسیون خطی میزان ATP و تعداد کلونی واکسن BCG با محدوده اطمینان ۹۵ ٪

جدول ۱. محاسبه میزان ATP بر اساس استاندارد NIBSC و تعیین ضریب K در نمونه های مورد آزمون

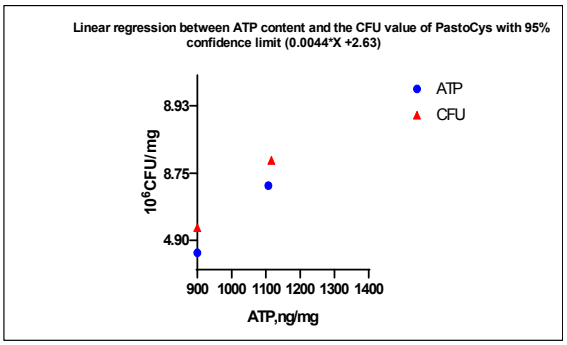
Batch No	Colony count (×10^6 CFU/mg)	Average of Bioluminescence (RLU)	ATP based on NIBSC Standard (ng/mg)	K
400BC02	۷/۳۷	۴۱۳۶/۲	۱۸/۱۳	۰/۴۰۷
400BC03	۱۳/۲	۵۴۰۱/۸۳۳	۲۳/۶۸	۰/۵۵۷
400BC04	۹/۱۳	۴۷۷۲/۱۶۷	۲۰/۹۲	۰/۴۳۶
400BC05	۹	۴۶۵۵	۲۰/۴	۰/۴۴۱
400BC06	۷/۶۸	۴۴۳۷/۶	۱۹/۴۵	۰/۳۹۵
PBV40003	۳۰/۵	۲۵۱۹۱۱/۳	۱۱۰۴/۰۸	۰/۰۲۸
PBV40004	۳۰/۸۵	۲۷۱۸۲۲	۱۱۹۱/۳۴	۰/۰۲۶
PBV40005	۳۱/۷۲	۲۹۵۰۲۹/۲	۱۲۹۳/۰۵	۰/۰۲۵
PBV40010	۲۸/۵۸	۲۰۶۷۹۹	۹۰۶/۳۶	۰/۰۳۲
PBV40011	۳۱/۸۳	۳۰۶۸۰۲/۷	۱۳۴۴/۶۵	۰/۰۲۴
99IN025	۴/۹	۱۵۱۸۷۹/۸	۶۶۵/۶۶	۰/۰۰۷
99IN027	۸/۹۳	۳۵۹۴۷۹	۱۵۷۵/۵۳	۰/۰۰۶
400IN01	۸/۷۵	۲۵۲۶۰۰/۷	۱۱۰۷/۱	۰/۰۰۸
NIBCS Danish 1331	۷/۳×۱۰^۶	۶۴۰۰	۲۸/۰۵	-

جدول ۲. مقایسه میزان همبستگی دو روش سنجش میزان ATP و شمارش کلونی در محصولات مختلف

	واکسن BCG	PBV (بالک واکسن)	PastoCys
R Square (r^2)	۰/۹۴۱۷	۰/۹۷۸۴	۰/۷۶۹۲
P value	۰/۰۰۶۱	۰/۰۰۱۴	۰/۳۱۹۱



نمودار۲. نمودار رگرسیون خطی میزان ATP و تعداد کلونی بالک واکسن (PBV) با محدوده اطمینان ۹۵ ٪



نمودار۳. نمودار رگرسیون خطی میزان ATP و تعداد کلونی پاستوسیس با محدوده اطمینان ۹۵ ٪

بحث

به منظور تعیین اثر بخشی واکسن در افراد، تعیین تعداد باسیل‌های زنده در واحد واکسن ضروری است. در شکل معمول و روتین، برای تعیین تعداد باکتری‌های زنده از روش شمارش کلنی باسیل استفاده می‌شود. شمارش جرم زنده با روش‌های کلنی، بسیار وقت گیر (۳ تا ۵ هفته) و پر زحمت است. اندازه گیری غیرمستقیم میزان جرم زنده با استفاده از روش بیولومینسانس بر اساس واکنش بین لوسیفرین و لوسیفراز در حضور ATP،کوتاه کردن مدت زمان آزمایش و تکرارپذیری آن را ممکن می‌سازد.

همچنین سازمان جهانی بهداشت از سال‌ها قبل به این روش بیو شیمیائی به عنوان یک روش جایگزین مناسب روش کشت میکروبی جهت تعیین تعداد جرم زنده واکسن اشاره کرده است (۱۸-۱۳).

در مطالعه حاضر مطابق نمودارهای ۳-۱ و جدول ۲ میزان همبستگی دو روش فوق به ترتیب در مورد بالک واکسن (PBV) ۰/۹۷۸۴، واکسن ب ث ژ ۰/۹۴۱۷و پاستوسیس ۰/۷۶۹۲ به دست آمده است که نشان می‌دهد بالک واکسن از حداکثر همبستگی و واکسن ب ث ژ در رتبه دوم و در نهایت محصول پاستوسیس در جایگاه سوم قرار می‌گیرند. از طرفی میزان P value در مورد محصول پاستوسیس ۰/۳۱۹۱ به دست آمده که بیش از ۰/۰۵ است و رابطه همبستگی در این مورد تایید نمی‌گردد. بدیهی است با افزایش تعداد نمونه‌های مورد آزمون میزان همبستگی دو روش در محصولات مختلف بهبود یافته و میانگین معتبرتری از ضرایب K جهت تخمین تعداد جرم زنده در محصولات به دست خواهد آمد.

در مجموع، مطالعه حاضر چشم‌انداز روشنی را در خصوص امکان استفاده از روش بیولومینسانس و استاندارد سازی آن با کمک نمونه های واکسن بین المللی نشان می‌دهد. سرعت روش بیولومینسانس، امکان استفاده سریع‌تر از نتایج حاصله را نه تنها در مورد سری ساخت‌های روتین محصولات فراهم می‌کند، بلکه امکان بررسی‌های کنترل کیفیت حین تولید و حتی فرمولاسیون‌های جدید را نیز میسر می‌نماید و در مورد باسیل ب ث ژ که طبیعتی کند رشد دارد جایگزین بسیار مناسبی خواهد بود.

کاهش زمان و هزینه های انجام آزمون از دیگر مزایای این روش است که با استفاده از حلال مناسب DMSO، عدم استفاده از روش جوشاندن با توجه به حساس بودن باسیل به حرارت و نیز استفاده از سایر محلول‌ها و بافرهایی با شرایط اسیدی یا قلیائی و محتویات ممانعت کننده واکنش بیوشیمیائی فوق، میسر گردید. در این روش مدت زمان آزمون از ۳ تا ۵ هفته در آزمون های شمارش جرم زنده روتین به حد اکثر ۱/۵ ساعت کاهش می‌یابد.

تاثیر عوامل محیطی، شرایط انکوباسیون، فرمولاسیون محیط کشت باکتری و نیز نقش تکنسین در انجام آزمون میکروبی تعیین جرم زنده با توجه به زمان طولانی آزمون از اثر تعیین کننده‌ای برخوردار هستند که در روش بیولومینسانس بسیار محدود می‌شود.

عوامل تاثیر گذار در تکرار پذیری این آزمون نیمه عمر محدود معرف (سوبسترای) لومینسانس و نیز عدم وجود محلول لیز کننده (استخراج کننده ATP) و آنزیم آپیراز در کیت مورد استفاده بود که باعث ایجاد تغییرات محسوسی در نتایج آزمون می‌شد که در این خصوص استفاده از کیت‌های معتبرتر مثل کیت شرکت Roche تا حدود زیادی مشکلات فوق را مرتفع نموده و نتایج معتبرتری به دنبال خواهد داشت. استفاده از استاندارد بین المللی NIBSC دانمارک با تعداد جرم و میزان ATP مشخص، عامل موثری در تایید صحت

آزمون و یکی از نقاط قوت روش طراحی شده است که در صورت تکرار آزمون با نمونه‌های بیشتر و نیز استفاده از استانداردهای دیگری مثل NIBSC روسیه و توکیو و حتی محصولات مشابه خارجی، نتایج بهتری را به همراه خواهد داشت.

به طور کلی با توجه به اینکه مقالات و پژوهش‌های داخلی و بین المللی در زمینه استاندارد سازی و معتبرسازی روش لومینسانس به عنوان جایگزین مناسب روش کشت میکروبی و شمارش تعداد جرم زنده باسیل ب ث ژ ، در دسترس است و از طرفی کیت اختصاصی برای استخراج ATP از باسیل ب ث ژ وجود ندارد؛ لذا تجربیات به دست آمده با توجه به اطلاعات کلی حاصل از مقالات و با تکیه بر تجربیات آزمایشگاهی موجود در این زمینه و علیرغم تمام محدودیت‌های موجود بر روی محصولات ب ث ژ کشور مورد آزمون و ارزیابی قرار گرفت و امید است با شناختی که از نقاط قوت و ضعف این تکنیک در مطالعه و تجربیات حاصل به دست آمده است بتوانیم به روشی استاندارد و معتبر برای محصولات تولید داخل دست پیدا کنیم.

REFERENCES

1. Tan YZ, Chong YQ, Khong E, Liew YK, Chieng NJ. Effect of disaccharide-polyol systems on the thermal stability of freeze-dried Mycobacterium bovis. Int J Pharm 2019;566:400-9.

2. Hendon-Dunn CL, Doris KS, Thomas SR, Allnutt JC, Marriott AA, Hatch KA, et al. A flow cytometry method for rapidly assessing Mycobacterium tuberculosis responses to antibiotics with different modes of action. J Antimicrob Chemother 2016;60:3869-83.

3. Crispen R, editor. Rapid testing of freeze dried BCG vaccine for stability and viability. Symp Ser Immunobiol Stand 1971;17:205–210.

4. Jensen SE, Hubrechts P, Klein BM, Hasløv KR. Development and validation of an ATP method for rapid estimation of viable units in lyophilized BCG Danish 1331 vaccine. J Biol Stand 2008;36:308-14.

5. Ho MM, Markey K, Rigsby P, Hockley J, Corbel MJ. Report of an International collaborative study to establish the first WHO reference reagents for BCG vaccines of three different sub-strains. Vaccine 2011;29:512-8.

6. Kolibab K, Derrick SC, Jacobs WR, Morris SL. Characterization of an intracellular ATP assay for evaluating the viability of live attenuated mycobacterial vaccine preparations. J Microbiol Methods 2012;90:245-9.

7. World Health Organization. Sixty second report. Geneva WHO, Annex. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. Geneva: WHO Technical Report Series No. 979, 2013.

8. Liang, X., Tian, L., Shen, P., & Luo, Z. Recent advances in ATP bioluminescence imaging. Anal Methods 2021;13: 1116-28.

9. Zhang C, Xu Q, Tang L, Wu X. ATP bioluminescence assay for rapid detection of bacteria in water and food samples. Food Control 2020;107:106798.

10. McElroy W, DeLuca M. Firefly and bacterial luminescence: basic science and applications. J Med Entomol 1983;5:197-209.

11. Lundin A, Thore A. Analytical information obtainable by evaluation of the time course of firefly bioluminescence in the assay of ATP. Anal Biochem 1975;66:47-63.

12. Karl DM. Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. Microbiol Rev 1980;44:739-96.

13. Stanley PE. Extraction of adenosine triphosphate from microbial and somatic cells. Methods Enzymol 1986;133:14-22.

14. Lomakina GY, Ugarova NN. Bioluminescent test systems based on firefly luciferase for studying stress effects on living cells. Biotechnol Rep 2022;1-6.

15. Ugarova NN, Lomakina GY, Modestova Y, Chernikov SV, Vinokurova NV, Otrashevskaya EV, et al. A simplified ATP method for the rapid control of cell viability in a freeze-dried BCG vaccine. J Biotechnol 2016;130:48-53.

16. Phumiamorn S, Sapsutthipas S, Chimee SJ. Suitability of alternative adenosine triphosphate potency assay for lot release of Tokyo bacilli Calmette-Guerin-172-1 Vaccines in Thailand. J Pharm Sci 2018;42.

17. World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for freeze-dried BCG vaccine. Geneva: World Health Organization; 1987. P.60-92.

18. Jin T, Qu T, Raina A, Alexander P, Tsao E. Improvements of ATP assay as a substitute for the CFU method in estimating viable cell count for BCG/rBCG vaccine preparations. J Vaccine Vaccin 2016;7:2