

تولید آنتی سرم ضد سرخک با تیترا بالا در بز به منظور بهره‌گیری از آن در کنترل کیفی واکسن‌های MR و MMR و تحقیقات سرواپیدمیولوژی

• مریم کشاورز

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، بخش واکسن‌های ویروسی انسانی

• عباس شفیعی

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، بخش واکسن‌های ویروسی انسانی

• غلامرضا طریقی

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، بخش واکسن‌های ویروسی انسانی

تاریخ دریافت: آبان‌ماه ۱۳۸۵ تاریخ پذیرش: اردیبهشت‌ماه ۱۳۸۵

Email: roshan_keshavarz@yahoo.com

چکیده

ویروس سرخک از فامیل پارامیکسو ویریده (Paramyxoviridae) و جنس موربیلی ویروس‌ها (Morbillivirus) می‌باشد. آنتی سرم پلی کلونال ضد ویروس سرخک هنگام ابتلا به سویه وحشی یا انجام واکسیناسیون علیه ویروس سرخک در میزبان حساس ساخته می‌شود اما به دلیل نیازهای متنوع به آن به روش‌های مختلف ایمن سازی در گونه‌های متنوع حیوانات نظیر گوسفند، بز، خرگوش و خوکچه هندی در آزمایشگاه‌های سراسر دنیا تولید می‌شود. در پروسه تولید واکسن سرخک بدلیل مصرف مداوم آنتی سرم پلی والان ضد سرخک در تست‌های کنترلی تولید واکسن، نیاز به مقادیر فراوان این آنتی سرم وجود دارد. همچنین بدلیل محدودیت‌ها و مشکلات موجود برای واردات این محصول از خارج از کشور، این نیاز با طراحی و اجرای یک برنامه ایمن سازی ساده و کوتاه مدت بر روی بز تامین شد. برای ایمن سازی از دو نوع پادگن استفاده شده است، یکی سویه AIK-C که ویروس زنده سرخک و سویه واکسن می باشد و از آن جهت ساخت واکسن سرخک در موسسه رازی استفاده می شود و دیگری هماگلوتینین ویروس سرخک که از سویه وحشی آن بنام Edmonston در موسسه رازی تهیه می شود. تزریقات هر هفت روز یکبار به صورت زیر جلدی و عضلانی به طور همزمان انجام شد. از تست‌های ممانعت از هماگلوتیناسیون و خنثی سازی سرم به منظور کنترل پروسه ایمن سازی حیوان بهره گرفته شد. در تحقیق حاضر پس از اجرای برنامه ایمن سازی که بر روی بز صورت گرفته است، حیوان هایپر ایمن گردید بطوریکه عیار پادتن ضد سرخک در سرم حیوان ایمن شده ۱/۱۰۲۴ تعیین شد. قبل از تزریق یاور اد جوان به همراه هماگلوتینین سرخک عیار پادتن ضد سرخک ۱/۲ بود و در پایان برنامه ایمن سازی عیار آنتی سرم پلی کلونال ضد سرخک به ۱/۱۰۲۴ افزایش یافت. عیار پادتن ضد سرخک بعد از لیوفیلیزه شدن و طی مدت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا سه سال پایدار باقی ماند.

کلمات کلیدی: سرخک، آنتی سرم هایپر ایمن

Pajouhesh & Sazandegi No 77 pp: 70-77

Production of high titre goat anti measles serum for quality control of MMR and MR vaccines and seroepidemiology researches

By: Keshavarz.M , Shafiyi.A , Tariqi.Gh - Razi Vaccine and Serum Research Institute

Measles virus is a member of morbillivirus genus and paramyxoviridae family. Polyclonal antimeasles serum have been produced by different methods in different species of animals such as: Monkey, sheep , goat , rabbit and guinea pig. In this study , goat as a host was hyperimmunized by a simple and short time program and polyclonal anti measles serum was prepared. Two type of antigens were used: AIK-C strain , a live attenuated and vaccine strain of measles virus that it is used in Razi Institute, and hemagglutinin of Edmonston strain, that is wild type of measles virus For priming the animal, live attenuated AIK-C strain of measles virus was injected intramuscularly and subcutaneously simultaneously. injections repeated 1 time with 1 week interval.

Results: After priming the animal was hyperimmunized by measles hemagglutinin plus complete Freund's adjuvant. Potency of prepared immun serum was 1:1024 by S.N as well as HI test, which corresponding to 320 I.U.

Key words: Measles, Anti- measles Serum, Hyperimmune, AIK-C, Edmonston

مقدمه

ساختار ژنتیکی، شرایط تغذیه، نوع پادگن، راه ورود پادگن، مقدار پادگن وارد شده به موجود، وضعیت هورمونی، مدیاتورهای عصبی و ریز ساختارهایی که در آن محیط پادگن به سیستم ایمنی عرضه می شود بستگی دارد.

آنتی سرم پلی کلونال ضد سرخک در گونه‌های مختلف حیوانات نظیر گوسفند، بز، خرگوش و خوکچه هندی به روش‌های مختلف ایمن سازی و با بکارگیری یاورهای مختلف در سراسر دنیا تولید می‌شود (۱۰، ۹). اما آنتی سرمی مورد نظر است که عیار پادتن اختصاصی بالایی داشته باشد. این آنتی سرم‌ها از هاپرایمونیزاسیون حیوان علیه ویروس سرخک بدست می‌آید. تا کنون از ذرات دست نخورده ویروس سرخک که به صورت کنسانتره در آمد باشد (۱۱) همینطور قطعات تخلیص شده یا نوترکیب ویروس سرخک یا پلاسمید های بیان کننده هم‌گلوپتینین سرخک برای ساخت پادتن ضد ویروس سرخک استفاده شده است (۱۳، ۱۲). ادجوان‌های مختلف به روش‌های مختلف باعث فعال سازی سیستم ایمنی می‌شوند (۱۷) یکی از یاورهایی که برای عرضه پروتئین‌های سطحی ویروس‌ها بسیار کارآمدند iscom ها (Immun stimulating complex) هستند و جهت ساخت پادتن ضد ویروس سرخک بکار رفته است. همچنین یاور فروند از ایام قدیم به عنوان یک محرک قدرتمند سیستم ایمنی شناخته شده است که به دلیل عوارضی که دارد استفاده از آن امروزه محدود شده است.

آنتی سرم ضد ویروس سرخک به عنوان رفرانس مثبت در تست ممانعت از هم‌گلوپتیناسیون به منظور تأیید صحت انجام تست بکار می‌رود. علاوه بر این از آن در کنترل کیفی واکسن سرخک ساخته شده در آزمایشگاه‌های تولید به منظور تأیید هویت ویروس برداشتی استفاده می‌شود، به این نحو که بعد از تخلیق ویروس سرخک بر روی بستری از سلول دیپلوئید ۵-MRC و انکوباسیون در دمای ۳۲ تا ۳۳ درجه سانتیگراد به مدت مناسب اثرات سیتوپاتیک بر روی بستر سلولی ظاهر

سرخک بیماری ویروسی حاد و شدیداً مسری است. عفونت حاد با ویروس سرخک ابتدا راه‌های هوایی فوقانی را درگیر می‌کند و بعد موجب ویرمی می‌شود. اگر چه سرخک بیماری خیلی خطرناکی نمی‌باشد اما عوارض ثانوی آن از قبیل پنومونی و SSPE (Subacute Sclerosing Panencephalitis) می‌تواند منجر به مرگ شود (۲۰). موارد ابتلا به سرخک با انجام واکسیناسیون در اوایل دهه ۱۹۶۰ کاهش یافت و متعاقب آن موارد مرگ و میرناشی از ابتلا به سرخک سریعاً تنزل یافت (۳) اما هنوز سالیانه نزدیک به ۳۰ میلیون مورد ابتلا به سرخک که ۰/۷۷ میلیون آن منجر به مرگ می‌شود از سراسر دنیا گزارش می‌گردد (۴).

اکثر واکسن‌های سرخک رایج در دنیا از تخفیف حدت دادن سویه ادمنستون (Edmonston strain) به دست آمده است (۵) که سویه AIK-C یکی از آنهاست که در سال ۱۹۷۶ در ژاپن تهیه شد (۶، ۷) و از این سویه برای ساخت واکسن‌های MM، MMR و MR در موسسه رازی استفاده می‌شود.

ویروس سرخک دارای اپی‌توپ‌های متعدد و متنوع می‌باشد که به کمک آن‌ها می‌تواند سیستم ایمنی میزبان را تحریک و وادار به ساخت پادتن اختصاصی نماید اما عیار این پادتن معمولاً ۱:۱۶ الی ۱:۳۲ می‌باشد. هنگام مواجهه سیستم ایمنی میزبان با ویروس سرخک لنفوسیت‌های B پاسخگو شروع به تکثیر و تمایز می‌نمایند در صورتیکه تحریک سیستم ایمنی به طور مناسب صورت گیرد لنفوسیت‌های B اختصاصی ویروس سرخک می‌توانند به شدت تکثیر و تمایز یابند به طوری که در یک محدوده زمانی درصد بالایی از کل لنفوسیت‌های B بدن راتشکیل دهند و بنابراین مقدار بیشتری از پادتن ویژه ویروس سرخک در بدن میزبان ساخته می‌شود. به این نوع تحریک و پاسخ شدید سیستم ایمنی هاپرایمونیزاسیون گفته می‌شود. هاپیر ایمن کردن یک میزبان با در نظر گرفتن عوامل مختلفی از جمله

بررسی حضور اثر سایتوپاتیک ویروس سرخک روی سلول Vero شد. به منظور اطمینان از گرفتن جواب صحیح تا روز دهم کشت‌ها در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد و پس از آن عیار ویروس با استفاده از فرمول Kaerber محاسبه گردید.

تهیه مخلوط هم‌گلوٲینین سرخک و یاور کامل فروند

محتویات دو ویال هم‌گلوٲینین لیوفیلیزه سرخک سویه ادمونستون با عیار ۳۲/۱ که بر روی بستر سلولی Vero تهیه شده بود در دو میلی لیتر آب مقطر حل گردید و با همان مقدار یاور کامل فروند آنقدر مخلوط شد تا یکنواخت شود و بطوریکه وقتی یک قطره از آن را بر روی سطح آب قرار می‌دهیم دیگر یاور و هم‌گلوٲینین از هم جدا نشوند.

تهیه سوسپانسیون ۰/۵٪ گلبول قرمز خون میمون

برای تهیه سوسپانسیون ۰/۵٪ گلبول قرمز، خون میمون به صورت مخلوط با Alsever تهیه گردید و پس از شستشوی خون با PBS و تهیه رسوب گلبول قرمز، سوسپانسیون ۰/۵٪ گلبول قرمز میمون در بافر PBS تهیه شد.

برنامه ایمن‌سازی

به منظور اطمینان از عدم وجود پادتن‌های غیر اختصاصی علیه ویروس سرخک قبل از انجام ایمن‌سازی از حیوان مقدار ۵ میلی لیتر خون گرفته شد. پس از جدا سازی سرم تست خنثی سازی سرم (SN) و تست ممانعت از هم‌گلوٲیناسیون (HI) علیه ویروس سرخک بر روی نمونه سرم انجام شد. پس از اطمینان از منفی بودن نتایج تست های SN و HI علیه ویروس سرخک اقدام به اجرای برنامه ایمن‌سازی به شرح زیر گردید:

ویروس از دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر خارج گردید و در محیط آزمایشگاه در محلی دور از نور قرار داده شد تا ذوب شود. پس از آن مقدار ۵ میلی لیتر از ویروس سرخک به کمک سرنگ یک بار مصرف بصورت زیر جلدی در ناحیه گردن و جلوی سینه حیوان و ۵ میلی لیتر به طور عضلانی در ران حیوان تزریق گردید. تزریق های فوق ۳ مرتبه دیگر به فاصله ۷ روز تکرار شد. سپس از حیوان یک نمونه خون تهیه شد که بعد از جدا سازی لخته عیار پادتن ضد سرخک در سرم با روش‌های خنثی سازی سرم و ممانعت از هم‌گلوٲیناسیون تیتراژ گردید.

یک هفته بعد ۲ میلی لیتر از هم‌گلوٲینین سرخک که از سویه وحشی ادمونستون روی سلول Vero با عیار ۳۲:۱ در مؤسسه رازی بخش واکسن‌های ویروسی انسانی مصرف پزشکی تهیه شده بود با ۲ میلی لیتر یاور کامل فروند خوب با هم مخلوط شد. این مخلوط که در شرایط استریل کلاس ۱۰۰ تهیه گردیده بود به دو قسمت مساوی تقسیم گردید و یک قسمت بصورت زیر جلدی و یک قسمت به صورت عضلانی به حیوان تزریق شد. ۳ تزریق دیگر از ویروس سرخک بفاصله ۷ روز طبق روش گفته شده به حیوان تزریق گردید پس از آن یک نمونه خون از حیوان گرفته شد و بر روی آن تست‌های SN و HI علیه ویروس سرخک انجام شد که عیار مطلوبی از پادتن ضد سرخک را نشان می‌داد

می شود که نشانه تکثیر ویروس سرخک در سلول میزبان است. پس از آن اقدام به برداشت ویروس‌های سرخک می‌شود و تست‌های کنترلی از جمله تست تائید هویت بر روی آن انجام شود. برای انجام تست تائید هویت، نمونه ویروس سرخک برداشت شده را با آنتی سرم اختصاصی آن مجاور می‌کنند و برای مدت یک ساعت در دمای ۳۶ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه میکنند، پس از آن مخلوط ویروس با آنتی سرم بر روی سلول Vero کشت می‌شود. سلول Vero یک میزبان حساس به ویروس سرخک است که به دلیل ارزان بودن جهت تست‌های کنترلی بکار می‌رود. بعد از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپری شدن مدت زمان لازم جهت ظهور اثرات سایتوپاتیک ویروس سرخک بستر سلولی را زیر میکروسکوپ نوری معکوس بررسی می‌کنند در صورتیکه ویروس کاشته شده ویروس سرخک باشد از آنجائیکه ویروس‌های سرخک هنگام مجاورت با آنتی سرم اختصاصی سرخک خنثی گردیده است اثرات سایتوپاتیک ویروس سرخک بر روی بستر سلولی نباید مشاهده شود.

همچنین هنگام عیار سنجی ویروس‌های اورپون و سرخجه درواکسن‌های مولتی والان (MR, MMR, MM) از آنتی سرم ضد سرخک به منظور خنثی سازی ویروس‌های سرخک موجود در واکسن استفاده می‌شود زیرا اثر سایتوپاتیک ویروس سرخک بر روی بستر سلولی Vero شدیدتر و سریع‌تر از اثر سایتوپاتیک ویروس های اورپون و سرخجه بر روی بستر سلولی Vero ظاهر می‌گردد که با خنثی سازی ذرات ویروسی سرخک در واکسن های مولتی والان امکان قرائت صحیح اثر سایتوپاتیک ویروس های اورپون و سرخجه فراهم می‌گردد. علاوه بر موارد ذکر شده آنتی سرم ضد سرخک در تکنیک های آزمایشگاهی مربوط به ویروس سرخک نظیر ایمونوفلورسانس، الیزا، بلات، وسترن بلات به عنوان نشانگر کاربرد زیاد دارد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی پادگن‌های مورد نیاز تهیه ویروس

به منظور کاهش پادگن‌های اضافی و ناخواسته ای که در ویروس‌های سرخک برداشتی وجود داشت، ویروس سرخک سویه Aik-C که بر روی سلول MRC-۵ کاشته شده بود بدون Stabilizer برداشت گردید و در مقادیر ۲۰ میلی لیتر بطور استریل تقسیم شد، سپس یک نمونه جهت عیارسنجی برداشته شد و مابقی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا هنگام مصرف نگهداری گردید.

به منظور عیار سنجی ویروس سرخک ابتدا از ویروس رقت های ۰/۰۱ تا ۰/۰۰۰۰۱ با استفاده از محیط DMEM+ تهیه گردید، پس از تلقیح به سلول Vero عیار سنجی ویروس سرخک صورت گرفت. برای این منظور یک راک ۶۴ تایی از کشت سلول‌های Vero در لوله آزمایش فراهم شد. سپس مقدار ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت در هر لوله تلقیح گردید (برای هر رقت ۴ لوله در نظر گرفته شد). به مدت یک ساعت لوله‌ها در محیط آزمایشگاه انکوبه شدند تا ویروس‌ها جذب سلول‌ها شوند. پس از این مدت و بعد از افزودن محیط DMEM+ سلول‌ها در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. از روز چهارم اقدام به

هر میلی لیتر حدود 5×10^{10} TCID₅₀ ویروس سرخک وجود داشته باشد. هر رقت سرم به نسبت یک به یک با سوسپانسیون ویروسی حاوی 5×10^{10} TCID₅₀ ویروس مخلوط گردید و همه رقت‌ها به مدت یک ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد تا واکنش اتصال اختصاصی پادگن و پادتن در این دما صورت گیرد.

مخلوط ویروس با هر رقت سرم بر روی بستری از سلول Vero در لوله آزمایش تلقیح گردید (برای هر رقت سرم ۵ لوله در نظر گرفته شد). لوله‌ها به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. به هر لوله محیط DMEM+ حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین و نئومایسین و همینطور آلبومین گاوی اضافه شد و لوله‌ها در گرمخانه ۳۶ تا ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲-۱۰ روز انکوبه گردید. بعد از آن اثر سایتوپاتیک ویروس سرخک بر روی سلول Vero با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس بررسی گردید، آخرین رقتی از سرم که بستر سلولی در مقایسه با شاهد سلولی سالم مانده باشد عیار سرم ضد سرخک در نظر گرفته شد. برای اطمینان از اینکه در هر میلی لیتر حدود 5×10^{10} TCID₅₀ ویروس سرخک وجود داشته باشد، ویروس رقیق شده بر روی سلول Vero عیار سنجی شد و نتایج آن با استفاده از روش Kaerber محاسبه گردید.

ج- الکتروفورز

نمونه های سرم قبل و بعد از هایپر ایمونیزاسیون الکتروفورز گردید. (تصویر ۱)

محاسبه عیار سرم ضد سرخک بنا بر واحد بین المللی (IU)

برای این کار از سرم استاندارد سازمان بهداشت جهانی (WHO) استفاده شد. هر آمپول از سرم استاندارد (WHO) حاوی یک میلی لیتر سرم لیوفیلیزه می باشد. قدرت پادتن ضد سرخک موجود در هر آمپول طبق بروشور ارسالی سازمان بهداشت جهانی ۵ واحد بین المللی (IU) می باشد. تست ممانعت از هم‌آگلوتیناسیون برای محصول تهیه شده و سرم استاندارد سازمان بهداشت جهانی انجام شد. در کلیه مراحل آزمایش نمونه سرم استاندارد سازمان بهداشت جهانی و نمونه سرم تهیه شده در موسسه رازی همزمان و در تحت شرایط آزمایش مساوی، مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته شدند. هر سری از آزمایش یک نمونه سرم مثبت با تیترا شناخته شده از پادتن ضد سرخک و یک نمونه سرم منفی از نظر آنتی بادی ضد سرخک و همچنین شاهد پادتن گنجائیده شده است.

روش محاسبه و کالیبره کردن سرم تهیه شده در مؤسسه رازی

طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (۲۴) بررسی فوق الذکر حد اقل ۴ مرتبه بر روی سرم استاندارد WHO و سرم ساخته شده بطور همزمان و در شرایط یکسان باید انجام شود. سپس حد متوسط تیترا پادتن GMT (Geometric Mean Titer) سرم ساخته شده به حد متوسط تیترا پادتن سرم فرانس تقسیم می شود تا سرم ساخته شده بنا بر واحد بین المللی (IU) بدست آید. بنا بر این جهت محاسبه GMT ۶ مرتبه تست HI و ۶ مرتبه تست

لذا خون گیری نهایی از رگ گردن حیوان انجام شد. بعد از جدا نمودن لخته سرم در مقادیر ۱ میلی لیتری تقسیم گردید و سپس لیوفیلیزه شد. محصول لیوفیلیزه در دمای ۴ درجه سانتیگراد ذخیره شده و ضمناً برای نمونه سرم قبل و بعد از لیوفیلیزه تست ممانعت از هم‌آگلوتیناسیون و خنثی سازی سرم انجام گردید. همینطور تست های مزبور هر ۶ ماه یکبار بر روی محصول لیوفیلیزه تکرار گردید و پایداری تیترا پادتن ضد سرخک در شرایط نگهداری دمای ۴ درجه سانتیگراد به ثبوت رسید.

تست های کنترلی

الف - روش ممانعت از هم‌آگلوتیناسیون (HI) (Hemagglutination Inhibition Test):

تیمار سرم

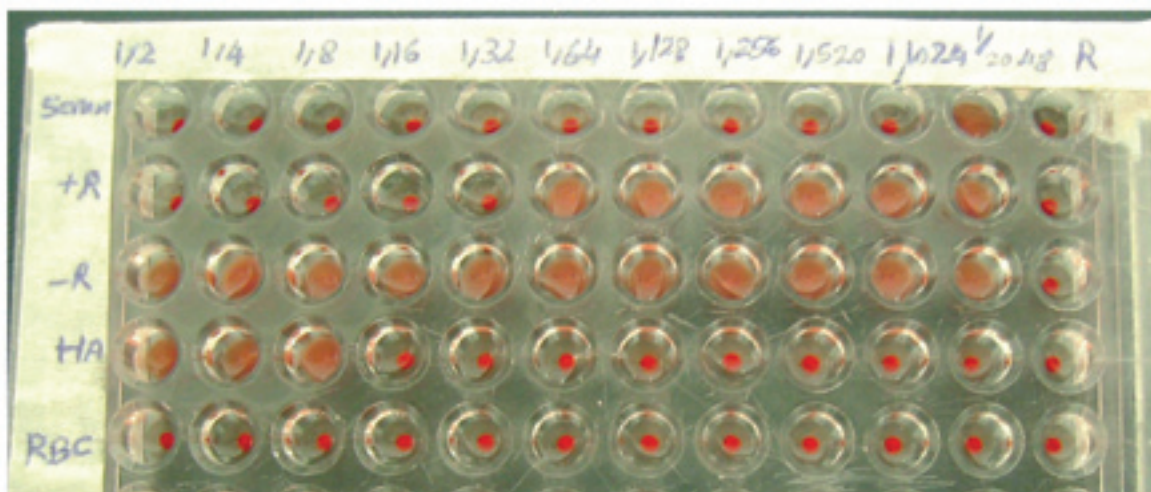
نمونه سرم قبل از آنکه تحت آزمایش HI قرار گیرد به روش زیر تیمار گردید:
ابتدا کمپلمان سرم بانیم ساعت انکوباسیون در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد غیر فعال گردید. سپس به منظور حذف موکوپروتئین ها، سرم با سوسپانسیون خاک چینی ۲۵٪ در PBS مخلوط گردید و مدت ۲۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه تکان داده شد. در مرحله بعد برای حذف آگلوتینین های غیر اختصاصی، سرم با گلبول قرمز شسته شده ۵۰٪ میمون سبز آفریقائی مخلوط شد و مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. در مرحله آخر به منظور حذف رسوب گلبول قرمز مخلوط فوق به مدت ۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد، پس از آن مایع روئی جهت انجام تست جمع آوری شد و رسوب گلبول های قرمز حذف گردید.

روش انجام تست HI

ابتدا در یک پلیت ۹۶ خانه با چاهک های v شکل رقت های مختلف آنتی سرم، از ۱/۸ تا ۱/۲۰۴۸ و همچنین رقت های مختلف سرم شاهد مثبت و سرم شاهد منفی به کمک بافر PBS تهیه گردید سپس هم‌آگلوتینین ۴ واحدی ویروس سرخک به تمام چاهک ها به جز چاهک نمونه شاهد سرم اضافه شد و پلیت به مدت ۱ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا پادتن های ضد ویروس سرخک به پادگن های ویروس سرخک متصل شود. بعد از این مرحله مقدار دو برابر حجم نمونه ای که در یک چاهک ریخته شده بود، گلبول قرمز ۰/۵ درصد میمون به تمامی چاهک ها اضافه گردید و پلیت به مدت ۲ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از آن نتایج تست با بررسی رسوب یا عدم رسوب گلبول های قرمز در ته هر چاهک قرائت شد. آخرین رقت سرم که رسوب گلبول قرمز را نشان میداد عیار پادتن ضد سرخک می باشد.

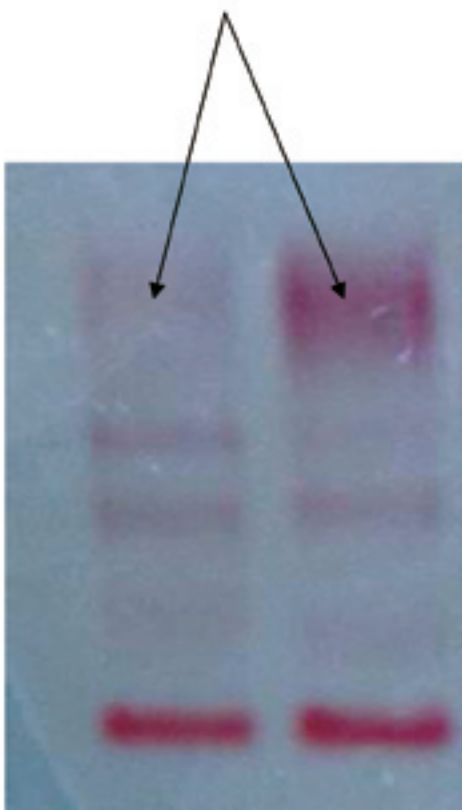
ب- تست خنثی سازی سرم (Serum Neutralization Test) (SN)

از روش آلفابرای انجام تست خنثی سازی سرم استفاده شد، بنا بر این روش از سرمی که کمپلمان آن از طریق نیم ساعت انکوباسیون در بن ماری ۵۶ درجه سانتیگراد غیر فعال گردیده بود، سریال رقت از ۱/۲ تا ۱/۲۰۴۸ با استفاده از بافر PBS تهیه شد. در مرحله بعد ویروس سرخک با عیار معلوم به کمک محیط DMEM+ رقیق شد بطوریکه در



تصویر ۱: تست HI علیه ویروس سرخک بعد از ایمن سازی

منطقه گاما-گلوبولین



قبل

بعد

تصویر ۲: الکتروفورز برای سرم قبل و بعد از ایمن سازی منطقه گاما-گلوبولین

SN بر روی سرم استاندارد WHO و سرم ساخته شده بطور همزمان و در شرایط یکسان انجام شد و محاسبات لازم صورت گرفت.

نتایج

الف- نتایج تست HI

عیار پادتن ضد سرخک قبل از ایمن سازی در نمونه سرم حیوان منفی گزارش شد، پس از آن عیار پادتن ضد سرخک در سرم حیوان پس از چهار تزریق ویروس سرخک و قبل از تزریق مخلوط یاور و هم‌گلوبولین $1/8$ اندازه‌گیری شد. عیار پادتن ضد سرخک در پایان برنامه ایمن سازی در سرم حیوان $1/1024$ اندازه‌گیری شد. عیار پادتن ضد سرخک در مدت ۳ سال در شرایط نگهداری ۴ درجه سانتیگراد $1/1024$ اندازه‌گیری شد (تصویر ۱).

ب- نتایج تست SN

عیار پادتن ضد سرخک در پایان اجرای برنامه ایمن سازی در سرم حیوان قبل و بعد از لیوفیلیزاسیون $1/1024$ بود که حاکی از عدم افت تیتراژ در هنگام لیوفیلیزاسیون بود. عیار پادتن ضد سرخک در مدت ۳ سال در شرایط نگهداری ۴ درجه سانتیگراد حفظ شده بود.

ج- نتیجه الکتروفورز

نتیجه تست الکتروفورز سرم حیوان بعد از اجرای برنامه ایمن سازی گسترش وسیع ناحیه گاماگلوبولین را نشان داد (تصویر ۲).

د- نتایج استاندارد کردن سرم ضد سرخک بر حسب I.U.

هر آمپول سرم استاندارد WHO استفاده شده در تست‌های HI و SN حاوی ۵ واحد بین المللی پادتن ضد سرخک است در حالیکه با

جدول ۱- تایج تست HI برای سرم استاندارد و سرم ساخت مؤسسه رازی

| تیتراژ پادتن ضد سرخک با روش HI | | شماره آزمایش |
|--------------------------------|-------------------|--------------|
| سرم ساخت مؤسسه رازی | سرم استاندارد WHO | |
| ۱۰۲۴ | ۸ | ۱ |
| ۲۰۴۸ | ۱۶ | ۲ |
| ۵۱۲ | ۸ | ۳ |
| ۵۱۲ | ۳۲ | ۴ |
| ۱۰۲۴ | ۱۶ | ۵ |
| ۱۰۲۴ | ۱۶ | ۶ |
| ۱۰۲۴ | ۱۶ | GMT* |

Geometric Mean of Tite*

جدول ۲- تایج تست SN برای سرم استاندارد و سرم ساخت مؤسسه رازی

| تیتراژ پادتن ضد سرخک با روش SN | | شماره آزمایش |
|--------------------------------|-------------------|--------------|
| سرم ساخت مؤسسه رازی | سرم استاندارد WHO | |
| ۲۰۴۸ | ۳۲ | ۱ |
| ۵۱۲ | ۸ | ۲ |
| ۱۰۲۴ | ۱۶ | ۳ |
| ۱۰۲۴ | ۸ | ۴ |
| ۵۱۲ | ۱۶ | ۵ |
| ۱۰۲۴ | ۱۶ | ۶ |
| ۱۰۲۴ | ۱۶ | GMT* |

Geometric Mean of Titer*

کیفیت یک آنتی سرم موثر می باشد. براین مبنا اقدامات مختلفی به منظور تهیه سرم ضد سرخک در دنیا صورت گرفته است؛ سازمان بهداشت جهانی (WHO) استفاده از کنسانتره ویروس سرخک همراه با یاور کامل و ناقص فروند را توصیه کرده است که از راه عضلانی و زیر جلدی ویروس به حیوان تلقیح می شود (۱۱). در تحقیق حاضر از ذرات کامل ویروس سرخک استفاده شده است اما ویروس کنسانتره نگردید، ضمن آنکه تزریقات از دو راه عضلانی و زیر جلدی انجام شد.

در یک بررسی از پلاسمیدهای بیان کننده هم‌گلوتینین یا گلیکوپروتئین‌های فیوژنی سرخک برای ایمن سازی استفاده شده است (۱۳). همینطور سویه AIK-C نوترکیب را با مهندسی

استفاده از رابطه زیر در هر آمپول سرم ساخت مؤسسه رازی ۳۲۰ واحد بین‌المللی پادتن ضد سرخک محاسبه شد (جدول ۱ و ۲).

$$320 = 5 \times (16 \div 1024)$$

همانطور که محاسبات نشان می‌دهد عیار پادتن ضد سرخک تهیه شده از عیار پادتن ضد سرخک محصولی که از طرف سازمان بهداشت جهانی در اختیار مؤسسه رازی قرار می‌گرفت بالاتر می‌باشد.

بحث

چندین فاکتور از جمله سویه، عیار ویروس و نوع پادگن بکار رفته برای ایمن سازی، نوع و حجم یاور استفاده شده، راه ورود پادگن به میزبان، نوع، گونه و شرایط نگهداری و سلامت میزبان در بالا بردن

صورت گیرد. از طرف دیگر سعی کردیم با افزایش راههای ورود پادگن امکان برخورد سیستم ایمنی حیوان را با آنتی ژن هر چه بیشتر نماییم و از سلول‌های عرضه کننده پادگن متنوع تری بهره ببریم. نتیجه اجرای برنامه ایمن سازی ارائه شده ظهور تیترا بالای پادتن ضد سرخک در حیوان تحت آزمایش با بکار گیری امکانات ساده در یک مدت کوتاه گردید.

منابع مورد استفاده

- 1- Redd SC, Markowitz LE, Katz SL. Measles vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. 999; Vaccines. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; p. 222-66.
- 2- Griffin DE, Bellini WJ. 2002; Measles virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2001. p. 1267-312.
- 3- J.S. Rota, J.L. Heath, P.A. Rota et al. 1996; Molecular epidemiology of measles virus: identification of pathways of transmission and implications for measles elimination. J. Infect. Dis. 173; pp. 32-37.
- 4- WHO. 2002; Global measles mortality reduction and regional elimination, 2000-2001; Parts 1 and 2. Wkly Epidemiol Rec 77:50-5, 58-61.
- 5- M. Hirayama, 1983; Measles vaccines used in Japan. Rev. Infect. Dis. 5, pp. 495-503.
- 6- K. Sasaki, 1974; Studies on the modification of the live AIK measles vaccine. I. adaptation of the further attenuated AIK measles virus (the strain AIK-L33) to chick embryo cells. Kitasato Arch. Exp. Med. 47; pp. 1-12.
- 7- S. Makino. 1983; Development and characteristics of live AIK-C measles virus vaccine: a brief report. Rev. Infect. Dis. 5, pp. 504-505.
- 8- T. Nakayama, K. Komase, R. Uzuka, A. Hoshi and T. Okafuji, 2001; Leucine at position 278 of the AIK-C measles virus vaccine strain fusion protein is responsible for reduced syncytium formation. J. Gen. Virol. 82, pp. 2143-2150.
- 9- J. Zhou, M. Fujino, Y. Inou et al. 2003; H1 genotype of measles virus was detected in outbreaks in Japan after 2000; J. Med. Virol. 70, pp. 642-648.
- 10- K. Yang, F. Mustafa, AA. Valsamakis, J.C. Santoro. 1997; Early studies on DNA-based immunization for measles virus Vaccine. vol 15, Jun 888-891
- 11- Atsushi Kumada strain expressing current wild-type hemagglutinin protein, 2004; vaccine, 2 January Pages 309-316.
- 12- Christie M, Endresen C, Haukenes G. 1981; Purification of measles virus H polypeptide and of F polypeptide. Arch Virol.

ژنتیک ساخته‌اند که در آن ژن بیان کننده هم‌گلویتینین سرخک و گلیکوپروتئین فیوژنی به صورت پلاسמיד برای ایمن سازی موشهای BALB/C و خرگوش‌ها بکار رفت (۱۲). در روشی دیگر ژن بیان کننده هم‌گلویتینین سویه وحشی ویروس سرخک را جایگزین ژن سویه واکسن ویروس سرخک نمودند و سپس این ویروس نو ترکیب را تخلیص کردند و همراه با ادجوان کامل فروند برای ایمن سازی خرگوش‌ها استفاده نمودند (۱۴) در تحقیقی دیگر ابتدا هم‌گلویتینین و پروتئین فیوژنی ویروس سرخک را با تیمار ویروس با Tween ۸۰ واتر تهیه کردند سپس با انجام ژل فیلتراسیون روی ستون سفادکس آن را خالص نمودند که برای ایمن سازی خرگوش‌ها استفاده شد (۱۶) در روش به کار رفته شده در این تحقیق هیچ نوع عملیات خاصی روی ویروس صورت نگرفت و ویروس کامل و زنده سرخک از سویه واکسن (AIK-C) به همراه هم‌گلویتینین ویروس که از تیمار با Tween-۸۰ واتر بدست آمده استفاده شد. لذا تمامی پادگن‌های ویروس در اختیار سیستم ایمنی حیوان قرار گرفت و به این ترتیب آنتی سرم پلی کلونال علیه ویروس سرخک تهیه گردید. در هنگام انجام تست‌های کنترولی بر روی روند تولید واکسن ضد سرخک نیاز به آنتی سرم پلی کلونال علیه ویروس سرخک می باشد تا نوع پادتن بیشتری برای شناسایی پادگن‌های مختلف ویروس سرخک در اختیار باشد. از ویژگی‌های این تحقیق انتخاب نوع یاور و استفاده از دو نوع پادگن در ایمن سازی بود که باعث تحریک کامل سیستم ایمنی حیوان و بالا رفتن تیترا پادتن گردید.

از پیتید سنتزی هم‌گلویتینین سرخک برای ساختن iscomهایی که برای ایمن سازی خرگوش‌ها بکار می روند، بهره گرفته‌اند (۱۳، ۱۴، ۱۵) در حال حاضر یک روش موفق برای تهیه آنتی سرم ضد سرخک با استفاده از iscomهای دارای پروتئین فیوژنی و هم‌گلویتینین سرخک ارائه شده است (۱۸، ۱۹) iscom باعث القاء سلولهای T سیستم ایمنی می‌شوند که پاسخ اختصاصی IgA علیه ویروس سرخک را القاء می‌کنند (۱۷). در این تحقیق ما از یاور کامل فروند برای تحریک سیستم ایمنی میزبان استفاده نمودیم. پس از استفاده از یاور کامل فروند افزایش سریع و شدید تیترا پادتن ضد سرخک در میزبان مشاهده گردید.

در بررسی حاضر ایمن سازی بر روی بز انجام شد. بز میزبان ویروس سرخک نیست چون ویروس سرخک از پروتئین‌های سطحی به نام‌های CD۴۶ و CD۱۵۰ به عنوان رسپتورهای سلولی برای ورود به سلول میزبان و آلوده کردن آن استفاده می‌کند که این رسپتورها فقط در سلول‌های انسان و میمون وجود دارد (۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴). بنابراین بز بطور طبیعی به این بیماری هرگز مبتلا نمی‌شود لذا برای جبران این مورد به جهت هایپر ایمنیزاسیون حیوان باید ویروس را نه به عنوان یک پاتوژن بلکه فقط به عنوان یک پادگن در نظر گرفته می‌شد که باید به نحوی سیستم ایمنی حیوان را تحریک می‌کرد که با بکارگیری قدرتمند سیستم ایمنی حیوان منجر به یک پاسخ ایمنی قوی شود. برای این منظور حجم تزریق را زیاد و فاصله‌های زمانی ورود پادگن را کم نمودیم تا تحریک مناسب سیستم ایمنی

69(3-4):177-87.

13-Muller CP, Schroeder T, Tu R, Brons NH, 1993; Analysis of the neutralizing antibody response to the measles virus using synthetic peptides of the haemagglutinin protein. Scand J Immunol. Nov;38(5):463-71

14-Viera Scheibner 2001; adverse effects of adjuvants in vaccines. Mon, 30 Apr 12:29:08 -0700.

15- de Vries P, Van Binnendijk RS, Van der Marel P, van Wezel AL, 1988; Measles virus fusion protein presented in an immune stimulating complex (iscom) induced haemolysis-inhibiting and fusion antibodies, virus-specific T cells and protection in mice. J Gen Virol. Mar;80(Pt 3): 549-59

16-Pedersen IR, Bog-Hansen TC, Dalsgaard K, Heegaard PM. 1992; Iscoms immunization with synthetic peptides representing measles virus hemagglutinin. Virus Res. Jul;24(2):145-59

17-Liashenko VA, Iuminova NV, Krasova VP, Glazkova NV, Svirina VS. 1999; Intra nasal revaccination of children with live measles vaccine: development of local immunity. Vopr Virusol. May-Jun;44(3):124-6

18- Buckland, R., and T. F. Wild. 1997; Is CD46 the cellular

receptor for measles virus? Virus Res. 48:1-9

19- Buckland, R. 1999; Molecular basis of the interaction of measles virus with its cellular receptors: implications for vaccine development. Recent Res. Dev. Virol. 1:467-484.

20-Dörig, R. E., A. Marcil, A. Chopra, and C. D. Richardson. 1993; The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). Cell 75:295-305.

21- Erlenhöfer, C., W. J. Wurzer, S. Löffler, S. Schneider-Schaulies, V. ter Meulen, and J. Schneider-Schaulies. 2002; CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. J. Virol. 75:4499-4505

22-Sato Ta, Yamanouchi K, Shishido A. 1973; presence of neutralizing antibody to canine distemper virus in sera of patients with subacute sclerosing panencephalitis. Aech Gesamte Virusforsch. 42(42):36-41

23-De Vries P, Uytdehaag FG, Osterhaus AD. 1988; Canine distemper virus (CDV) immune stimulating complexes (iscoms), but not measles virus iscoms, protect dogs against CDV infection. J Gen Virol. Aug;69(Pt 8): 2071-83

24- WHO/EPI/GEN-93-9.



Archive