

مطالعه دوام ایمنی در افرادی که قبلاً علیه هاری درمان شده‌اند و بررسی تاثیر تزریق واکسن یادآور ضد هاری VERO

دکتر احمد فیاض^{۱*}، دکتر سوسن سیمانی^۱، دکتر علیرضا جنانی^۱، دکتر بهزاد اسفندیاری^۲، دکتر فیروزه فرح تاج^۱، پیوند بیگلری^۱، نادر حویزی^۱، ناصر اسلامی^۱، ویدا فلاحیان^۳، مینا ثابت قدم^۱، سعید کاووسیان^۲

^۱ بخش تحقیقات و مرکز رفانس هاری WHO، انستیتو پاستور ایران
^۲ واحد تشخیص هاری پایگاه تحقیقاتی آمل، انستیتو پاستور ایران
^۳ مرکز درمان-پیشگیری هاری، انستیتو پاستور ایران

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به اهمیت دوام ایمنی در افراد درمان شده علیه هاری وعدم اطلاع از طول دوام آن در کشور، این مطالعه نزد افرادی که ۱۴ تا ۱۷ سال قبل علیه هاری درمان شده بودند بررسی شد و بهترین روش تزریق واکسن هاری یادآور به این افراد در صورت آلودگی مجدد با ویروس هاری، مطالعه گردید.

روش بررسی: این مطالعه در دو مرحله انجام گرفت. برای اجرای مرحله اول، نمونه سرم خون ۱۰۰ نفر از اشخاصی که در استان‌های مازندران و گیلان در ۱۴ تا ۱۷ سال پیش، به دنبال گزش حیوانات هار و یا مشکوک به هاری علیه بیماری هاری واکسینه شده بودند، تهیه شد. در اجرای مرحله دوم، دو گروه ۱۵ نفری به طور داوطلب از بین افراد مرحله اول انتخاب گردیدند. به گروه اول دو دوز واکسن هاری یادآور به فاصله سه روز از طریق بین جلدی و به گروه دوم از طریق داخل عضلانی تزریق شد و ۱۰ روز بعد نمونه سرم خون از افراد دو گروه تهیه شد. میزان آنتی‌بادی اختصاصی ضد هاری به روش RFFIT بررسی و تغییر تیتراژ آنتی‌بادی با آزمون t مورد قضاوت آماری قرار گرفت. یافته‌ها: آنتی‌بادی اختصاصی ضد هاری در سرم کلیه افراد درمان شده متعاقب تزریق ۵ دوز واکسن هاری، وجود داشت و در ۸۵ نفر بیش از ۰/۵ واحد بین‌المللی بود. میزان تغییرات تیتراژ آنتی‌بادی در گروهی که تزریق عضلانی واکسن یادآور را داشتند $11 \pm 6/71$ و در گروهی که تزریق داخل جلدی یادآور داشتند $1/12 \pm 15$ بود ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: به نظرمی رسد که دوام ایمنی در افرادی که قبلاً علیه هاری درمان شده بودند، پس از گذشت حداکثر ۱۷ سال وجود دارد. مقایسه دو روش تزریق واکسن، بیانگر ارجحیت روش تزریق واکسن یادآور به روش بین جلدی می‌باشد.

واژگان کلیدی: هاری، پیشگیری پس از مواجهه، آنتی‌بادی خنثی کننده هاری، اثر واکسن یادآور.

مقدمه^۱

بیماری هاری نوعی آنسفالیت حاد کشنده است. عامل بیماری، RNA ویروس، از خانواده رابدوویروس‌ها و از جنس

لیساویروس می‌باشد. بیماری از طریق بزاق حیوان هار به انسان منتقل می‌شود. اگر علائم بیماری در انسان ظاهر شود مرگ مبتلا حتمی است. ولی در صورتی که بلافاصله با آب و صابون اقدام به شستشوی زخم‌های ناشی از گزش نمایند و سپس ایمونوگلوبین اختصاصی هاری و ۵ دوز واکسن ضد هاری سلولی در روزهای صفر، ۳، ۷، ۱۴ و ۳۰ تزریق شود،

آدرس نویسنده مسئول: تهران، انستیتو پاستور ایران، رئیس بخش تحقیقات و مرکز رفانس هاری WHO، دکتر احمد فیاض (e-mail: fayaz@pasteur.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۳/۱۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۱۰/۲۱

تیترا آنتی‌بادی اختصاصی هاری با روش RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test) بررسی شد. سن این افراد در زمانی که درمان ضد هاری دریافت کرده بودند، بین ۴ تا ۷۳ سال بود. از این ۱۰۰ نفر، ۷ نفر ۱۴ سال قبل، ۴۲ نفر ۱۵ سال قبل، ۳۰ نفر ۱۶ سال قبل، و ۲۱ نفر ۱۷ سال قبل علیه هاری درمان شده بودند. پس از اینکه هدف از این مطالعه برای فرد فرد آن‌ها توضیح داده شد، نمونه سرم خون هر ۱۰۰ نفر تهیه شد.

در مرحله دوم، از بین صد نفر فوق‌الذکر دو گروه ۱۵ نفری که همگی ۱۵ سال قبل درمان شده بودند، به صورت داوطلب انتخاب شدند. به گروه اول دو دوز واکسن هاری Vero به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر به فاصله ۳ روز از طریق بین‌جلدی و به گروه دوم دو دوز از همان واکسن به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از طریق داخل عضلانی تزریق شد. واکسن ضد هاری به کار رفته در این بررسی واکسن هاری Vero ساخت کمپانی Sanofi Pasteur فرانسه بود. ویروس هاری محتوی این واکسن به وسیله بتا پروپیولاکتون کاملاً غیرفعال شده است و در سرنگ محتوی ۰/۵ میلی‌لیتر یک بار مصرف همراه حلال بسته بندی شده است.

نمونه سرم خون افراد هر دو گروه ۱۰ روز پس از تزریق دوز دوم واکسن تهیه گردید. در کل ۱۳۰ نمونه سرم خون تهیه شد. سرم نیم ساعت در حرارت ۵۶ درجه سانتی‌گراد غیرفعال شده و در یخچال ۲۰- در روز آزمایش، نمونه سرم‌ها ذوب و با روش نگهداری شدند. در روز آزمایش، نمونه سرم‌ها ذوب و با روش RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test) از نظر میزان آنتی‌بادی اختصاصی ضد هاری آزمایش شدند.

اساس روش آزمایش RFFIT این است که رقت‌های مختلف سرم مورد آزمایش با مقدار ثابتی از ویروس ثابت هاری CVS (Challenge Virus Standard) مجاور شده و پس از مدت ۶۰ دقیقه به مخلوط رقت‌های سرم و ویروس CVS مقدار معینی سلول BSR حساس به ویروس هاری اضافه می‌شود و پس از قرار دادن در اتو ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و رنگ آمیزی فلورسنت به کمک میکروسکوپ فلورسانت میزان آلودگی سلول‌های BSR بررسی و با مقایسه با نتایج سرم فرانس، تیترا سرم مورد آزمایش محاسبه می‌شود (۳).

در عمل، هر نمونه سرم خون مورد آزمایش از رقت‌های یک‌سوم در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه تا رقت ۱/۷۲۹ تهیه می‌شود و با مقدار ثابتی از ویروس ثابت هاری CVS که بتواند ۸۰ درصد سلول‌ها را آلوده کند مخلوط می‌شود. پس از یک ساعت در اتو ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سلول‌های حساس به

مجروح‌ها گزیده از ابتلا به هاری و مرگ حتمی نجات پیدا خواهد کرد. کمیته کارشناسان هاری سازمان جهانی بهداشت، برای افرادی که قبلاً با واکسیناسیون علیه هاری ایمن شده‌اند، در صورتی که مجدداً مورد گزش حیوان‌ها قرار گیرند، تزریق دو دوز واکسن هاری به فاصله ۳ روز توصیه نموده است، ولی فاصله زمانی بین واکسیناسیون اول و آلودگی مجدد را روشن نکرده است (۱). پزشکان مسئول درمان ضد هاری همیشه سوال می‌کنند دوام ایمنی در اشخاصی که علیه هاری واکسینه می‌شوند چه مدت است؟

در سال ۱۳۵۹، محققین انستیتو پاستور ایران وضعیت ایمنی ناشی از آنتی‌بادی اختصاصی ضد هاری را در ۲۷ نفر هار گزیده که ۴ سال قبل علیه هاری با واکسن کشت سلولی واکسینه شده بودند بررسی کردند. نتایج این بررسی نشان داد پس از گذشت ۴ سال آنتی‌بادی اختصاصی ضد هاری در بدن این افراد وجود دارد و با تزریق یک دوز واکسن یادآور هاری سطح ایمنی به وضع قابل توجهی بالا می‌رود (۲).

تهیه کنندگان واکسن ضد هاری Vero در کشور فرانسه در بروشور تهیه شده به همراه واکسن، توصیه کرده‌اند در صورتی که شخص واکسینه علیه هاری تا پنج سال بعد مجدداً مجروح شود تزریق دو دوز واکسن هاری یادآور به فاصله ۳ روز کافی است و چنانچه بیش از پنج سال از واکسیناسیون گذشته و یا سابقه درمان ناقص را داشته باشد، در صورت گزش مجدد به وسیله حیوان‌ها، درمان کامل با واکسن هاری ضروری است. هدف اصلی در تحقیقات انجام شده توسط مولفین این مقاله این بوده است که اولاً مشخص نمایند آیا آنتی‌بادی اختصاصی ضد هاری که عامل اصلی ایمنی علیه هاری است در اشخاصی که ۱۴ تا ۱۷ سال قبل با واکسن ضد هاری Vero واکسینه شده‌اند وجود دارد؟ و در صورتی که افراد مذکور مجدداً توسط حیوان‌ها گزیده شوند، کدام یک از دو تزریق بین‌جلدی و داخل عضلانی واکسن ضد هاری یادآور به فاصله سه روز آنتی‌بادی بیشتری ایجاد می‌نمایند؟

مواد و روشها

این مطالعه در دو مرحله انجام گرفت. در مرحله اول، نمونه سرم خون ۱۰۰ نفر از افرادی که در ۱۴ تا ۱۷ سال قبل به علت گزش حیوانات‌ها یا مشکوک به هاری در شهرها و روستاهای استان‌های مازندران و گیلان با تزریق ۵ دوز واکسن هاری Vero علیه هاری درمان شده بودند، تهیه و پس از غیرفعال کردن نمونه‌ها (نیم ساعت در ۵۶ درجه سانتی‌گراد)

ویروس (BSR) به هر خانه پلیت اضافه می‌شود و پس از ۲۴ ساعت در اتو ۳۷ درجه سانتی‌گراد خانه‌های محتوی رقت‌های سرم همراه ویروس تخلیه می‌شوند و فقط سلول‌های BSR که به کف پلیت چسبیده‌اند، باقی می‌مانند. پس از ثابت کردن آنها با استن و رنگ‌آمیزی با گونژوگه آنتی‌بادی فلورسانت، سلول‌های آلوده شده به ویروس هاری زیر میکروسکوپ فلورسانت بررسی می‌شوند و با روش Reed & Muench تیتراژ آنتی‌بادی خنثی‌کننده هر نمونه سرم خون محاسبه می‌شود (۳). تغییر تیتراژ آنتی‌بادی با آزمون t مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

سرم همه ۱۰۰ نفر حاوی آنتی‌بادی اختصاصی هاری بوده و مقدار آن حداقل در برخی از آنها ۰/۱ واحد و حداکثر ۷/۵ واحد بین المللی در هر میلی‌لیتر سرم بود. سرم ۸۵ نفر آنها دارای تیتراژ بالاتر از ۰/۵ واحد بین المللی در هر میلی‌لیتر سرم بود. میانگین تیتراژ آنتی‌بادی اختصاصی هاری در ۱۰۰ نفر ۳/۰۹ واحد بوده به طوری که میانگین تیتراژ در ۷ نفر با سابقه درمان ۱۴ سال قبل ۵/۸ واحد، در ۴۲ نفر با سابقه درمان ۱۵ سال قبل ۱/۹ واحد، در ۳۰ نفر با سابقه درمان ۱۶ سال قبل ۲/۴ واحد و بالاخره در ۲۱ نفر با سابقه درمان ۱۷ سال قبل ۵/۶ واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتر سرم بود.

در مرحله دوم این مطالعه، به طور داوطلب از بین ۱۰۰ نفر افراد فوق الذکر دو گروه ۱۵ نفری که همگی در ۱۵ سال قبل علیه هاری درمان شده بودند، انتخاب شدند. به گروه اول که میانگین تیتراژ آنتی‌بادی اختصاصی هاری در آنها ۱/۹ واحد بین‌المللی بود، دو دوز واکسن هاری Vero یادآور به فاصله سه روز به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از طریق بین جلدی و به گروه دوم که میانگین تیتراژ آنتی‌بادی در آنها ۱/۶ واحد بین‌المللی بود دو دوز واکسن هاری Vero یادآور به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر به فاصله سه روز از طریق داخل عضلانی تزریق شد و ۱۰ روز پس از تزریق یادآور دوم از همه افراد دو گروه نمونه سرم خون تهیه شد و پس از غیر فعال کردن در حرارت ۵۶ درجه سانتی‌گراد، با روش RFFIT آزمایش شدند. میانگین تیتراژ آنتی‌بادی اختصاصی ضد هاری اولیه و پس از تزریق دو دوز واکسن یادآور به تفکیک روش تزریق در جدول ۱ ارائه شده است. در گروهی که تزریق عضلانی واکسن داشتند، تیتراژ آنتی‌بادی اختصاصی از $1/6 \pm 2/17$ به $11 \pm 6/71$ و در گروهی که واکسن را به طریق داخل جلدی دریافت کردند از $2 \pm 1/09$ به $15 \pm 8/12$ افزایش یافت که از لحاظ آماری اختلاف

معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/05$). آزمون t نشان داد که تیتراژ آنتی‌بادی اختصاصی ضد هاری در گروهی که واکسن را بین جلدی دریافت نموده بودند به میزان ۴ واحد و یا معادل ۳۵/۵ درصد بیشتر از گروهی بود که واکسن را عضلانی دریافت کرده بودند ($p < 0/05$).

جدول ۱- تیتراژ آنتی‌بادی اختصاصی اولیه و ثانویه افراد مورد مطالعه بر حسب روش تزریق

گروه	تیتراژ آنتی‌بادی اولیه (قبل از تزریق واکسن یادآور)	تیتراژ آنتی‌بادی ثانویه (بعد از تزریق واکسن یادآور)
گروه اول	$1/6 \pm 2/17$	$11 \pm 6/71$ (تزریق عضلانی)
گروه دوم	$2 \pm 1/09$	$15 \pm 8/12$ (تزریق داخل جلدی)

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که دوام ایمنی در افرادی که قبلاً علیه هاری درمان شده‌اند، پس از گذشت ۱۷ سال کم‌کم وجود داشته است. درمان ضد هاری در اشخاص هارگزیده و ایجاد ایمنی کافی و قاطع در بدن مجروحین هارگزیده به علت صد درصد کشنده بودن بیماری هاری دارای اهمیت زیادی است. در کشور ما و برخی کشورهای دیگر که بیماری هاری شیوع دارد، گاهی افرادی که قبلاً به علت هارگزیدگی درمان ضد هاری دریافت کرده‌اند پس از گذشت یک یا چند سال مجدداً مورد گزش حیوانات هار قرار می‌گیرند و برای درمان به مراکز هاری مراجعه می‌کنند. نتایج بدست آمده از این تحقیق بیانگر وجود دوام ایمنی پس از گذشت ۱۷ سال از واکسیناسیون ضد هاری است.

کارشناسان هاری WHO حضور آنتی‌بادی خنثی‌کننده ویروس هاری به مقدار حداقل ۰/۵ واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتر سرم خون را دلیل ایمنی علیه هاری می‌دانند (۱). ولی هنوز جواب قاطعی برای طول دوام ایمنی با واکسن‌های سلولی نظیر واکسن Vero که در حال حاضر در کشور ما مصرف می‌شوند ندارند.

عدم ایمنی کافی پس از درمان کامل در برخی افراد درمان شده با واکسن‌های ضد هاری Semple و مغز موش نوزاد به ثبوت رسیده است (۴). حضور آنتی‌بادی خنثی‌کننده هاری پس از چهار سال درمان با واکسن HDC توسط محققین انستیتو پاستور ایران و متعاقباً در آمریکا اعلام شده است (۲، ۸، ۹) و بالاخره حضور آنتی‌بادی خنثی‌کننده ویروس

در این مطالعه ۱۰۰ نفر داوطلب که در ۱۴ تا ۱۷ سال قبل به علت گزش حیوان هار یا مشکوک به هاری یک دوره کامل واکسن هاری Vero به آنها تزریق شده بود، مورد مطالعه قرار گرفتند. آزمایش آنتی‌بادی اختصاصی در خون این افراد نشان داد که پس از گذشت ۱۴ تا ۱۷ سال آنتی‌بادی اختصاصی ضد هاری در سرم خون همه افراد مذکور وجود دارد و ۸۵ نفر آنها دارای تیتراژ آنتی‌بادی اختصاصی بیش از ۰/۵ واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتر سرم خون بودند.

از بین ۱۰۰ نفر مورد مطالعه مذکور دو گروه ۱۵ نفری که همگی ۱۵ سال از تاریخ واکسیناسیون هاری آنها می‌گذشت و دارای آنتی‌بادی اختصاصی ضد هاری بیش از ۰/۵ واحد بین‌المللی بودند انتخاب شدند. ده روز پس از تزریق دو دوز واکسن هاری Vero به افراد گروه اول از طریق بین‌جلدی و به افراد گروه دوم از طریق داخل عضلانی، تیتراژ آنتی‌بادی هر دو گروه بررسی شد. نتیجه نشان داد میزان آنتی‌بادی اختصاصی هاری در هر دو گروه به طور چشمگیری افزایش یافته است و در گروه اول که از طریق بین‌جلدی و با حجم کمتری واکسن دریافت کرده بودند، میزان آنتی‌بادی بیشتری ایجاد شده است. این امر نشان می‌دهد افرادی که پس از یک واقعه هارگزیدگی علیه هاری درمان می‌شوند، در صورتی که مجدداً بوسیله حیوان هار گزیده شوند، تزریق دو دوز واکسن هاری به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از طریق بین‌جلدی هم آنتی‌بادی بیشتری را ایجاد می‌کند و هم از نظر اقتصادی مقرون به صرفه است.

هاری پس از ده سال درمان با واکسن ضد هاری سلولی Vero نیز توسط Strady و همکارانش به تایید رسیده است (۵). در حال حاضر ۱۷ سال است که واکسن ضد هاری سلولی Vero در ایران برای درمان هارگزیدگان به کار می‌رود. با توجه به مشاهدات Strady (۵) این سوال پیش می‌آید آیا افرادی که در ۱۴ تا ۱۷ سال قبل علیه هاری با واکسن ضد هاری سلولی Vero درمان شده‌اند، هنوز دارای آنتی‌بادی خنثی‌کننده ضدهاری به اندازه کافی هستند؟

از آنجایی که درمان ضد هاری امری فوری است، به همین مناسبت ۳۰۰ مرکز درمان ضد هاری در سراسر کشور برای سرعت بخشیدن به شروع درمان ضد هاری دایر شده است، زیرا برای درمان و پیشگیری مجروحین و نیز افرادی که مجدداً مجروح می‌شوند، فرصتی وجود ندارد تا به تهران بیایند و در انستیتو پاستور ایران در مورد درمان یا عدم درمان آنها تصمیم‌گیری شود.

کمیته کارشناسان هاری WHO در سال ۱۹۸۴ میلادی (۶) توصیه کرد افرادی که قبلاً توسط واکسن ضد هاری سلولی با پتانسی کافی (حداقل ۲/۵ واحد بین‌المللی در هر دوز واکسن) درمان شده‌اند، در صورتی که مجدداً مجروح شوند فقط یک نوبت واکسن به آنها تزریق شود. در سال ۱۹۹۲ کمیته مذکور به علت ناکافی بودن تزریق یک دوز یادآور، برای درمان مجدد تزریق دو دوز یادآور به صورت ID یا IM به فاصله سه روز با واکسن دارای پتانسی کافی را توصیه کرد (۱).

REFERENCES

1. World Health Organization. Technical report series, 824. Geneva: WHO; 1992.
2. Fayaz A, Simani S, Nour-Salehi S, Bahmanyar M. Booster effect of human diploid cell antirabies vaccine in previously treated persons. JAMA 1981; 246: 20.
3. World Health Organization. Laboratory techniques in rabies. 4th edition. Geneva: World Health Organization; 1996.
4. Khawplod P, Wilde H, Yenmuang W, Benjavongkulchai M, Chomchey P. Immune response to tissue culture rabies vaccine in subjects who had previous postexposure treatment with Semple or suckling mouse brain vaccine. Vaccine 1996; 14: 1549-45.
5. Strady A, Lang J, Lienard M, Blondeau C, Jaussaud R, Plotkin SA. Antibody persistence following pre-exposure regimens of cell culture rabies vaccine: 10 year follow up and proposal for new booster policy. J Infect Dis 1998; 177: 1290-95.
6. World Health Organization. Technical report series, 709. Geneva: World Health Organization; 1984.
7. World Health Organization. Technical report series, 931. Geneva: World Health Organization; 2005.
8. Fayaz A, Simani S, Elahi E, Nowrouzian I, Khaksar AA. Reduced regimen for Pre-immunization against rabies. Iranian Biomed J 1997; 1: 61-64.
9. Briggs DJ, Schwenke JR. Longevity of rabies antibody titre in recipients of HDCV Vaccine. Vaccine 1992; 10: 125-29.