پژوهش و سازندگی
در
امور دام و آبزیان شماره ۷۷ زمستان ۱۳۸۶

تولید آنتی سرم ضد سرخک با تیتر بالا در بز به منظور بهره گیری 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 (Paramyxo viridae) و جنس موربیلی ویروس‌ها (Morbillivirus) می‌باشد.آنتی سرم پلی کلونال ضدویروس 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 وخوکچه هندی در آزمایشگاه‌های سراسر دنیا تولید می‌شود. در پروسه تولید واکسن سرخک بدلیل مصرف مداوم آنتی سرم پلی والان ضدسرخک در تست های 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 بنامEdmonston در موسسه رازی تهیه می شود. تزریقات هر هفت روز یکبار به صورت زیر جلدی و عضلانی به طور همزمان انجام شد. از تست های 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 ۱/۱۰۲۴تعیین شد. قبل از تزریق یاور ادجوان به همراه هماگلوتینین سرخک عیار پادتن ضد سرخک ۱/۲بود 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 , Shafyi.A , Tariqi.Gh - Razi Vaccine and Serum Research Institute

Measles virus is a member of morbilivirus genus and paramyxoviridae family. Polycolonal 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 polycolonal anti measles serum was prepered.Two type of antigens were used: AIK-C strin , a live attenuated and vaccine strain of measles virus that it is used in Razi Institute, and heamagglutinin of Edmonston strain, that is wild type of measles virus For priming the animal, live attenuated AIK-C strain of measles virus was injeced intramusculary and subcutaneously simultaneously. injections reapeted 1 time with 1 week interval.

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

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

مقدمه

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 نمی باشد اما عوارض ثانوی آن از قبیل پنومونی و SSPE (Subacute Sclerosing Panencephalitis) می‌تواند منجربه مرگ شود(۲،۱). 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 ادمونستون (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، MMRوMR در موسسه رازی استفاده می شود.

ویروس سرخک دارای اپی‌توپ‌های متعدد و متنوع می باشد که به کمک آن‌ها می تواند سیستم ایمنی میزبان را تحریک و وادار به ساخت پادتن اختصاصی نمایند اما عیار این پادتن معمولاً ۱:۱۶ الی ۱:۳۲ می باشد. 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 طوریکه در یک محدوده زمانی درصد بالائی ازکل لنفوسیت‌های B بدن راتشکیل دهند و بنابراین مقدار بیشتری از پادتن ویژه ویروس سرخک در بدن میزبان ساخته می شود. به این نوع تحریک و پاسخ شدید سیستم ایمنی هایپرایمنوزاسیون گفته می‌شود. هایپر ایمن کردن یک میزبان با در نظر گرفتن عوامل مختلفی از جمله ساختار ژنتیکی، شرایط تغذیه ، نوع پادگن ، راه ورود پادگن، مقدار پادگن وارد شده به موجود، وضعیت هورمونی، مدیاتورهای عصبی و ریز ساختارهائی 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 وخوکچه 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 هایپرایمونیزاسیون 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 هماگلوتینین 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) هستندو 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 هماگلوتیناسیون به منظور تائید صحت انجام تست بکار می‌رود. علاوه بر این از آن درکنترل کیفی واکسن سرخک ساخته شده در آزمایشگاه‌های تولید به منظور تایید هویت ویروس برداشتی استفاده می شود، به این نحو که بعد از تلقیح ویروس سرخک بر روی بستری از سلول دیپلوئید MRC-۵ و انکوباسیون در دمای ۳۲ تا ۳۳ درجه سانتیگراد به مدت مناسب اثرات سیتوپاتیک بر روی بستر سلولی ظاهر

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 ازآن مخلوط ویروس با آنتی سرم برروی سلولVero 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 سیتوپاتیک 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 سیتوپاتیک ویروس سرخک بر روی بستر سلولی نباید مشاهده شود.

همچنین هنگام عیار سنجی ویروس‌های اوریون و سرخجه درواکسن‌های مولتی والان (MR,MMR, MM) از آنتی سرم ضد سرخک به منظور خنثی سازی ویروس‌های سرخک موجود در واکسن استفاده می شود زیرا اثر سایتوپاتیک ویروس سرخک بر روی بستر سلولی Vero شدیدتر و سریع‌تر از اثر سایتوپاتیک ویروس های اوریون و سرخجه بر روی بستر سلولی Vero ظاهر می‌گردد که با خنثی سازی ذرات ویروسی سرخک در واکسن های مولتی والان امکان قرائت صحیح‌تر اثر سایتوپاتیک ویروس های اوریون 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 زیا دی دارد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی پادگن‌های مورد نیاز تهیه ویروس

به منظور کاهش پادگن‌های اضافی و ناخواسته ای که در ویروسهای سرخک برداشتی وجودداشت ، ویروس سرخک سویه AIk-C که بر روی سلول MRC-۵ کاشته شده بود بدون Stabilizer برداشت گردید و در مقادیر ۲۰میلی‌لیتر بطور استریل تقسیم شد، سپس یک نمونه جهت عیارسنجی برداشته شد ومابقی دردمای 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 هررقت در هر لوله تلقیح گردید(برای هررقت 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 وبعد از افزودن محیط DMEM+ سلول‌ها در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. از روز چهارم اقدام به 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 هماگلوتینین سرخک و یاورکامل فروند

محتویات دو ویال هماگلوتینین لیوفیلیزه سرخک سویه ادمونستون با عیار۱/۳۲ که بر روی بستر سلولی Vero تهیه شده بود در دو میلی لیتر آب مقطر حل گردید و با همان مقدار یاورکامل فروند آنقدر مخلوط شد تا یکنواخت شود و بطوریکه وقتی یک قطره از آن را برروی سطح آب قرار می‌دهیم دیگر یاور و هماگلوتینین از هم جدا نشوند.

تهیه سوسپانسیون۰/۵٪ گلبول قرمز خون میمون

برای تهیه سوسپانسیون۰/۵٪ گلبول قرمز، خون میمون به صورت مخلوط با Alsever تهیه گردید و پس از شستشوی خون با PBS و تهیه رسوب گلبول قرمز، سوسپانسیون۰/۵٪ گلبول قرمز میمون در بافر PBSتهیه شد.

برنامه ایمن‌سازی

به منظور اطمینان از عدم وجود پادتن‌های غیر اختصاصی علیه ویروس سرخک قبل از انجام ایمن سازی از حیوان مقدار ۵ میلی لیتر خون گرفته شد. پس از جدا سازی سرم تست خنثی سازی سرم (SN) و تست ممانعت از هماگلوتیناسیون (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 ایمن سازی 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 مقدار۵ میلی لیتر از ویروس سرخک به کمک سرنگ یک بار مصرف بصورت زیر جلدی در ناحیه گردن و جلوی سینه حیوان و۵ میلی لیتر به طور عضلانی در ران حیوان تزریق گردید. تزرق 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 هماگلوتیناسیون تیتراژگردید.

یک هفته بعد ۲ میلی لیتر از هماگلوتینین سرخک که از سویه وحشی ادمونستون روی سلول Vero با عیار ۱:۳۲ در مؤسسه رازی بخش واکسن‌های ویروسی انسانی مصرف پزشکی تهیه شده بود با ۲ میلی‌لیتر 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

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 هماگلوتیناسیون و خنثی سازی سرم انجام گردید. همینطور تست های مزبور هر ۶ ماه یکبار بر روی محصول لیوفیلیزه تکرار گردید و پایداری تیتر پادتن ضد سرخک در شرایط نگهداری دمای ۴ درجه سانتیگراد به ثبوت رسید.

تست‌های کنترلی

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

تیمار سرم

نمونه سرم قبل از آنکه تحت آزمایشHI قرار گیرد به روش زیر تیمار گردید:

ابتدا کمپلمان سرم بانیم ساعت انکوباسیون دردمای۵۶ درجه سانتیگراد غیر فعال گردید.سپس به منظور حذف موکوپروتئین ها، سرم با سوسپانسیون خاک چینی۲۵٪ درPBS 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 جمع‌آوری شدو رسوب گلبول‌های قرمز حذف گردید.

روش انجام تست HI

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

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

از روش آلفابرای انجام تست خنثی سازی سرم استفاده شد، بنا بر این روش ازسرمی 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 بافرPBS تهیه شد. در مرحله بعد ویروس سرخک با عیار معلوم به کمک محیط DMEM+ رقیق شد بطوریکه در هر میلی لیترحدود۵۰۱۰۰۰TCID ویروس سرخک وجود داشته باشد. هر رقت سرم به نسبت یک به یک با سوسپانسیون ویروسی حاوی ۵۰۱۰۰۰TCID 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 +DMEMحاوی آنتی بیوتیک کانامایسین و نئو مایسین 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 نظرگرفته شد. برای اطمینان از اینکه در هر میلی لیترحدود۵۰۱۰۰۰TCID 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 وبعد از هایپر ایمونیزاسیون الکتروفورز گردید. (تصویر ۱)

محاسبه عیار سرم ضد سرخک بنابر واحد بین المللی (IU)

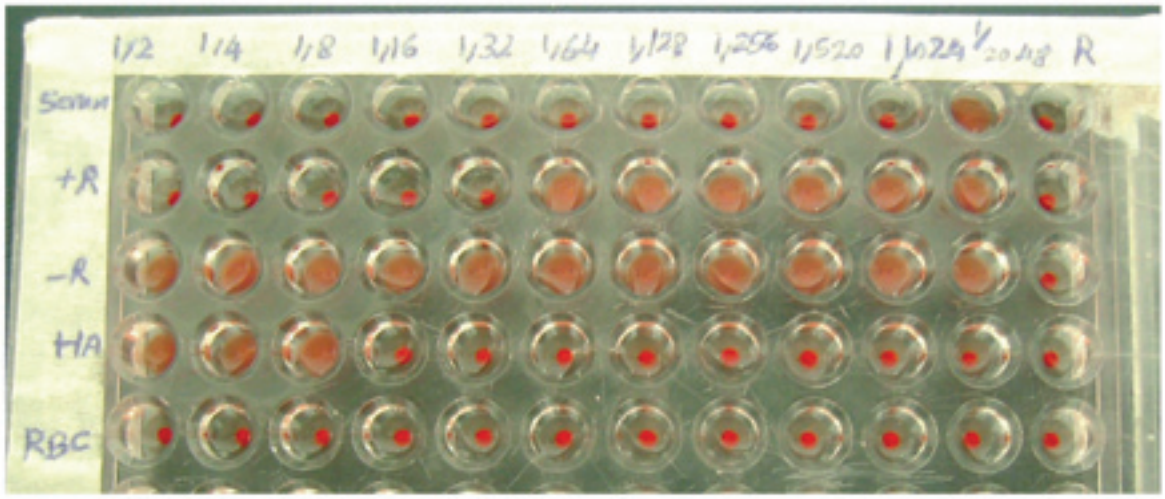
برای این کار از سرم استاندارد سازمان بهداشت جهانی (WHO) استفاده شد.هرآمپول از سرم استاندارد (WHO) حاوی یک میلی لیتر سرم لیوفیلیزه می باشد. قدرت پادتن ضد سرخک موجود درهر آمپول طبق بروشور ارسالی سازمان بهداشت جهانی ۵ واحد بین المللی (I.U)می باشد.

تست ممانعت از هماگلوتیناسیون 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 ودر تحت شرایط آزمایش مساوی، مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته شدندودر هر سری از آزمایش یک نمونه سرم مثبت با تیتر شناخته شده از پادتن ضد سرخک و یک نمونه سرم منفی از نظر آنتی بادی ضد سرخک و همچنین شاهد پادتن گنجانیده 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 WHOو سرم ساخته شده بطور همزمان و در شرایط یکسان باید انجام شود.سپس حد متوسط تیتر پادتن GMT (Geometric Mean Titer) سرم ساخته شده به حد متوسط تیتر پادتن سرم رفرانس تقسیم می شود تا سرم ساخته شده بنا بر واحد بین المللی (IU) بدست آید.

بنابر این جهت محاسبه ۶ GMT مرتبه تستHI و ۶ مرتبه تست



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

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

نتایج

الف- نتایج تست HI

عیار پادتن ضد سـرخک قبل از ایمن سـازی در نمونه سرم حیوان منفی گزارش شد، پس از آن عیار پادتن ضد سرخک در سرم حیوان پـس از چهـار تزریق ویروس سـرخک و قبل از تزریـق مخلوط یاور و هماگلوتینیـن۱/۸ اندازه‌گیری شـد. عیار پادتن ضد سـرخک در پایان برنامه ایمن سازی در سرم حیوان_۱/۱۰۲۴اندازه گیری شد. عیار پادتن ضد سـرخک درمدت ۳ سـال در شرایط نگهداری ۴ درجه سـانتیگراد ۱/۱۰۲۴اندازه گیری شد (تصویر۱).

ب- نتایج تست SN

عیار پادتن ضد سرخک در پایان اجرای برنامه ایمن سازی در سرم حیوان قبل و بعد از لیوفیلیزاسـیون۱/۱۰۲۴ بود که حاکی از عدم افت تیتر در هنگام لیوفیلیزاسیون بود.

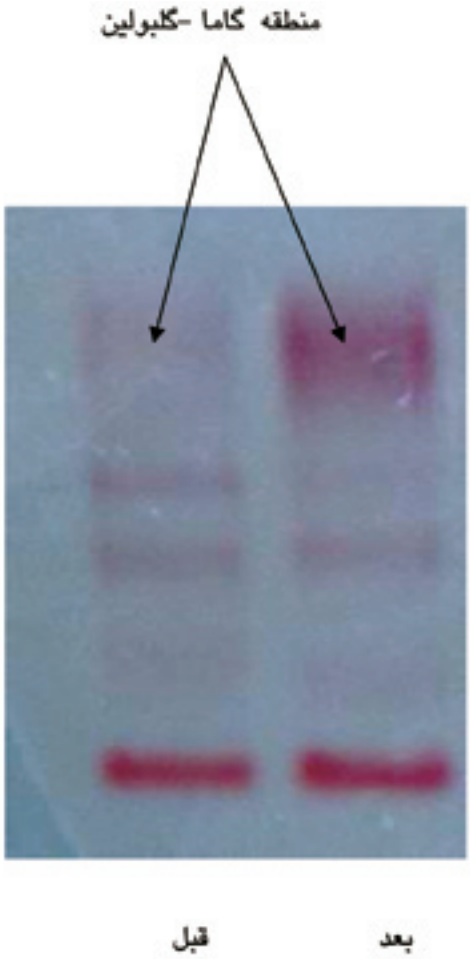
عیار پادتن ضد سرخک درمدت ۳ سال در شرایط نگهداری ۴ درجه سانتیگراد حفظ شده بود.

ج- نتیجه ا الکتروفورز

نتیجه تست الکتروفورزسرم حیوان بعد از اجرای برنامه ایمن سازی گسترش وسیع ناحیه گاماگلوبولین را نشان داد (تصویر۲).

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

هر آمپول سرم اسـتاندارد WHO استفاده شده در تست‌های HI و SN حاوی ۵ واحد بین المللی پادتن ضد سـرخک اسـت در حالیکه با



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

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

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

*Geometric Mean of Tite

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

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

*Geometric Mean of Titer

استفاده از رابطه زیر در هر آمپول سرم ساخت مؤسسه رازی ۳۲۰ واحد بین‌المللی پادتن ضد سرخک محاسبه شد(جدول ۱و۲).

(۱۰۲۴÷۱۶)×۵=۳۲۰

همانطور که محاسبات نشـان میدهد عیار پادتن ضد سرخک تهیه شـده از عیار پادتن ضد سرخک محصولی که از طرف سازمان بهداشت جهانی در اختیار موسسه رازی قرار می گرفت بالاتر می‌باشد.

بحث

چندین فاکتور از جمله سویه، عیار ویروس و نوع پادگن بکار رفته برای ایمن سـازی، نوع و حجم یاور استفاده شـده ، راه ورود پادگن به میزبان، نوع، گونه و شرایط نگهداری و سلامت میزبان در بالا بردن 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 کنسانترهٔ ویروس سـرخک همراه با یاورکامل و ناقص فروند را توصیه کرده است کـه از راه عضلانی و زیر جلدی ویروس به حیوان تلقیح می‌شـود(۱۱). در تحقیق حاضر از ذرات کامل ویروس سـرخک استفاده شده است اما ویروس کنسـانتره نگردید، ضمن آنکه تزریقات از دو راه عضلانی و زیر جلدی انجام شد.

در یـک بررسـی از پلاسـمیدهای بیـان کننـده هماگلوتینین یـا گلیکوپروتئین‌های فیوژنی سـرخک برای ایمن سـازی اسـتفاده شـده اسـت(۱۳). همینطورسـویه AIK-C نوترکیب را با مهندسی

ژنتیک ساخته‌اند که در آن ژن بیان کننده هماگلوتنینین سرخک و گلیکوپروتئین فیوژنی به صورت پلاسمید برای ایمن سازی موشهای BALB/C و خرگوش‌ها بکار رفت(۱۲). در روشی دیگر ژن بیان کننده هماگلوتنینین 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 هماگلوتینین 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 نمودندکه 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 زندهٔ سرخک از سویه واکسن (AIK-C) به همراه هماگلوتینین 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 تنوع پادتن بیشتری برای شناسائی 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 وبالا رفتن تیتر پادتن گردید.

از پپتید سنتزی هما گلوتینین سرخک برای ساختن iscomهایی که برای ایمن سازی خرگوش‌ها بکارمی 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 هماگلوتنینین سرخک ارائه شده است(۱۸،۱۹) iscomها 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 تیتر 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 CD۴۶وCD۱۵۰ 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 هایپرایمونیزاسیون 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 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 تیتر 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 Rec77:50–5, 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.

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 adjuvantsin vaccines. Mon, 30 Apr 12:29:08 -0700.
15- de Vries p,Van Binnendijk RS<Van der Marel P,van Wezel AL,19880; Measles virus fusion protein presented in an immune stimulating complexes (iscoms) induced haemolysis –inhibiting and fusion antibodies , virus –specific T cells and protection in mice.J JGen 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):145-59v
17-.Liashenko VA,Iuminova NV,Krasona VP ,Glazkova NV,Svirina VS.1999; Intra nasal revaccination of children with live measles vaccine:development of locale 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. Loffler, 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 viruse iscoms, protect dogs against CDV infection.J Gen Virol. Aug;69(Pt 8): 2071-83
24- WHO/EPI/GEN-93-9.