بررسی روش‌های مورد استفاده در جستجوی عوامل خارجی در واکسن‌ها و دیگر محصولات بیولوژیک

● دکتر مجید جمشیدیان مجاور
استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، ایران
m.jamshidian@rvsri.ac.ir

● دکتر حمیدرضا فرزین
استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، ایران

❑ خلاصه

با توجه به واردات واکسن‌ها از کشورهای مختلف با سطوح تکنولوژیک متفاوت، ضرورت تکوین و توسعه سیستم‌های کنترل کیفی واکسن در داخل کشور از ضروریات بی بدیل کشور می‌باشد. تست‌های هماهنگ تعیین عدم حضور عوامل خارجی به عنوان یک موضوع اصلی در عرصه بین‌المللی برای واکسن‌های دامپزشکی مطرح می‌باشد. عوامل خارجی مانند ویروس نیوکاسل، ویروس لکوز پرندگان، ویروس لارنگوتراکئیت عفونی، ویروس بیماری بورس عفونی، ویروس برونشیت عفونی، ویروس کم خونی جوجه، ویروس آنتریت‌هموراژیک و ویروس رتیکولواندوتلیوز می‌باشد. روش‌های شناسایی این عوامل خارجی ویروسی شامل سرولوژی برای آنتی بادی‌های اختصاصی ویروس در پرندگان تلقیح شده، جداسازی ویروس در پرندگان تلقیح شده، جداسازی ویروس در تخم مرغ‌های جنین دار یا کشت‌های سلولی می‌باشد. در این مقاله به بررسی اجمالی این روش‌ها خواهیم پرداخت.

کلمات کلیدی: کنترل کیفی، مواد بیولوژیک، آلودگی واکسن، عوامل خارجی

❑ مقدمه

عاری بودن واکسن‌ها و دیگر محصولات بیولوژیک از عوامل خارجی آلوده کننده، یک ضرورت مهم می‌باشد. منظور از عوامل خارجی کلیه عوامل باکتریایی، ویروسی قارچی، مایکوپلاسمایی و ... است که به طور ناخواسته و به طرق مختلف وارد محصولات بیولوژیک و از جمله واکسن‌ها می‌شود. تعدادی از این آلودگی‌ها که در منابع ذکر شده است، بدین قرار است.

آلودگی واکسن‌های انسانی: مایکوپلاسما (۴-۱)، پستی ویروس (۸-۵)، (۹) SV20، لکوز پرندگان (۱۰)، رتیکولواندوتلیوز پرندگان (۱۱، ۱۲).

آلودگی واکسن‌های دامی: BVD (۶، ۸، ۱۵-۱۳)، پلیوماگاوی (۱۹-۱۶)، ویروسی از خانواده پارووویروس (۲۰، ۲۱)، ویروس رینوتراکئیت گاوی عفونی و ویروس پاراآنفلوانزا تیپ ۳ (۲۲)، زبان آبی (۲۳).

آلودگی واکسن‌های طیور: نیوکاسل (۲۴)، برونشیت، مایکوپلاسما (۱، ۴)، ویروس لکوز (۱۰)، رئوویروس، ویروس گامبورو، ویروس آنفلوانزا در واکسن‌های امولسیفیه روغنی (۲۲، ۲۵)، ویروس رتیکولواندوتلیوز (۱۱، ۱۲)، ویروس لارنگوتراکئیت عفونی طیور و ویروس کم خونی عفونی (۲۶).

تخم مرغ‌های عاری از پاتوژن های خاص (SPF)، به عنوان یکی از پرمصرف‌ترین مواد اولیه جهت تهیه واکسن‌های انسانی، دامی و طیور مطرح می‌باشد، از این رو پاک بودن این تخم مرغ‌ها از عوامل آلوده کننده بسیار مهم و حیاتی می‌باشد. Murray در سال ۲۰۰۳ در سخنرانی

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-11-23]

خـــود تحت عنوان «منابع جهانی تهیـــه تخم مرغ عاری از عوامل خاص» در گردهمایی علمی AVPA معضل آلودگی تخم مرغ‌های SPF را با وضوحی خاص مطرح کرده اســـت (۲۷). شـــدت آلودگـــی در تخم مرغهـــای SPF به حدی فراگیر بـــوده که ســـال ۲۰۰۳ را به عنوان ســـال آلودگی (2003, the year of contamination) نامگـــذاری نموده‌اند. در این ســـال سه تولید کننده معظم جهانی تخم مرغ عاری از پاتـــوژن های خاص (SPF)، از جمله لوهمان (Lohman)،Charles River Laboratories SPAFAS، Sunrise Farms Inc. حداقل بـــه یکی از ویروس‌های لکـــوز لنفوئید، آدنوویروس پرنـــدگان یا رئوویـــروس پرندگان آلوده بودنـــد. این پدیده صنعت تولید واکسن را با مشـــکلی مواجه ساخت که برای تولید واکســـن، تخم مرغ کافی در اختیـــار تولید کنندگان واکسن وجود نداشت. با این وجود به دلیل اهمیت موضوع و استراتژیک بودن بحث تولید واکسن در بازار جهانی، احتمالاً با اهداف سیاســـی، اطلاع رسانی لازم در این خصوص انجام نشـــد و تنها اطلاعـــات اندکی به صورت بســـیار محدود و پراکنده در دســـترس قرار گرفت. نکتـــه قابل توجه آن که انتشـــار ویروس در بعد جهانی می‌توانـــد از طریق آلودگی واکســـن‌ها صورت پذیـــرد. نمونه‌های مشـــخصی را در این خصوص می‌توان ذکر نمود (۲۷).

آلودگی واکســـن‌ها در زنجیـــره تولیـــد، می‌تواند از نظر تئوریـــک به طـــرق مختلفی حادث شـــود کـــه می‌توان به آلودگی‌های ایجاد شـــده در مواد اولیه (کشت سلول، تخم مرغهـــای جنین دار، مواد افزودنی مانند ســـرم گاو و ...) و مراحل تولید اشاره کرد. واکسن‌های دامپزشکی عمدتاً توسط کشـــت میکروارگانیسم‌های زنده در سلول‌های بافت زنده با منشأ حیوانی (کشت ســـلول، تخم مرغ جنین دار و ...)، به عنوان سوبســـترا، تهیه می‌شوند. علاوه بر این محیط کشت غالباً با ترکیبات اختصاصی با منشـــأ حیوانی، مشخصاً سرم، همراهی می‌شـــوند تا رشد رضایت بخش میکرو ارگانیسم‌ها تضمین گردد. ضمناً در خود پروســـه تولید موادی با منشأ حیوانی، همانند تریپســـین نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتیجتـــاً همواره یک خطر بالقوه برای آلودگی واکســـن‌ها با عوامل خارجی وجود دارد (۲۸).

شـــاید بتـــوان ادعا کرد که میـــزان ایـــن آلودگی‌ها در واکسن‌های طیور بیشتر از دیگر واکسن‌ها می‌باشد. علت آن هم فراوانی جمعیت طیور، گستردگی این صنعت در سطوح ملی و بین المللی در مقایسه با دیگر گونه‌های دامی می‌باشد. با این وجود در مورد آلودگی‌های واکسن‌های دامپزشکی به خصوص واکسن‌های طیور، در مقایسه با واکسن‌های انسانی پژوهش فراوانی صورت نگرفته است (۲۹).

به هر حـــال در طول ســـالیان اخیر خلوص واکســـن‌ها نیز به عنوان یک عنصر بســـیار مهـــم در تجارت بین الملل واکسن‌ها مطرح شـــده است. تســـت‌های هماهنگ تعیین عدم حضور عوامـــل خارجی به عنوان یک موضوع اصلی در عرصه بین المللی برای واکســـن‌ها مطرح می‌باشد. در عین حال تضمین فقدان عوامل خارجی در واکســـن‌ها نمی‌تواند صرفاً با تســـت‌های آزمایشـــگاهی تضمین گردد. تست‌های آزمایشـــگاهی صرفاً بخشی از ابزارهایی است که جهت نیل به این هدف ضروری اســـت. روش‌های شناسایی این عوامل خارجی شـــامل سرولوژی، جداســـازی ویروس و جداسازی ویروس در تخم مرغ‌های جنین دار یا کشـــت‌های ســـلولی می‌باشد.

❑ روش‌های جســـتجوی عوامـــل خارجی در محصولات بیولوژیک

الف) کشت سلول

به منظور شناســـایی و کنترل به هر بذر سلولی اصلی یک کد ویژه داده می‌شـــود. بذر سلول اصلی به صورت حجم‌های کوچک در دمای ۷۰- درجه یا پایین تر نگهداری می‌شـــوند. معمولاً واکسن‌ها از سلول‌هایی با بیش از ۲۰ پاساژ از بذر سلول اصلی، تهیه نمی‌شوند. هنگامی که از کشت‌های سوسپانسیون استفاده می‌شود افزایش ۳ برابر جمعیت سلول‌ها به عنوان یک پاساژ در نظر گرفته می‌شود. اگر قرار است سلول‌هایی با بیش از ۲۰ پاســـاژ در تولید واکسن‌ها مصرف شود، بایستی نشان داده شـــود که از نظر خصوصیات بیولوژیک تولید کشت‌های ســـلولی مشابه بذر سلولی اولیه می‌باشد و این که استفاده از چنین سلول‌هایی اثر نامناسبی در تولید واکسن ندارد (۱۸). اطلاعات مربوط به تیره سلولی باید مشخص و با جزئیات ثبت شود. سلول‌ها باید در محیط استریل تهیه شده و نباید آلوده به ویروس و مایکوپلاسماها باشند (۳،۳۰).

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-11-23]

ب) کشت تخم مرغ

تخم مرغ‌هـــای جنین دار در تولید مواد بیولوژیک کاربرد وســـیعی دارند. تقریبـــاً در تمام موارد، ایـــن تخم مرغ‌ها از گله‌های SPF که به طور وسیعی از نظر عوامل عفونی تحت مراقبت گسترده قرار داشته و هرگز واکسینه نشده‌اند، منشاء می‌گیرند. راه تلقیح تخم مرغ و انتخاب محل تکثیر بســـته به ارگانیسم خاص که تحت کشـــت قرار می‌گیرد، متفاوت می‌باشـــد. تست تلقیح تخم مرغ در غشـــاء کوریوالانتوئیک (CAM) و کیســـه آلانتوئیـــک (AS) انجـــام می‌شـــود. تخم‌مرغ‌ها باید SPF بوده و از نظر برخی عوامل سرونگاتیو باشـــند (۲۷). مانند: نیوکاسل، CELO، برونشیت عفونی، مارک، Egg Drop Syndrome، Mycoplasma gallisepticum، Mycoplasma synoviae و Salmonella pullorum

ج) یافتن عوامل خارجی توسط روش‌های تکثیر اسید نوکلئیک

روش‌های مبتنی بر جستجوی اسید نوکلئیک اساساً بر دو رهیافت مختلف استوارند:

۱- تکثیر یک توالی اسید نوکلئیک هدف: مانند polymerase chain reaction (PCR)، ligase chain reaction (LCR)، isothermal ribonucleic acid (RNA) amplification

۲- تکثیـــر ســـیگنال‌های هیبریدیزاســـیون: مانند روش branched DNA (bDNA) برای جســـتجوی DNA. در این تست بسط سیگنال بدون کاربرد چرخه مکرر تکثیر اسید نوکلئیک حاصل می‌شود.

به کمک PCR، توالی‌های DNA معین قابل تشخیص است. توالی‌های RNA هم توسط رونوشت برداری معکوس RNA به DNA مکمـــل (cDNA) و تکثیر متعاقب آن قابل رهگیری است (۴، ۱۲، ۱۷، ۱۸).

به جهت دست یابی به حداکثر حساسیت PCR، نمونه‌ها باید به طور مطلوب در برابر آلودگی خارجی توسط توالی‌های هدف محافظت شوند. نمونه برداری، ذخیره سازی و انتقال مواد آزمایش باید تحت شـــرایطی انجام شـــود که کمترین تجزیه توالی هـــدف رخ دهد. در مـــورد توالی‌های RNA باید موارد احتیاط به خوبی رعایت شـــود زیرا RNA بسیار به تجزیه توســـط ریبونوکلئازها حساس می‌باشد. به منظور مقابلـــه با دو نوع آلودگـــی: ۱- cross contamination ۲- Carry-over contamination بایـــد محـــل تهیه master mix و انجـــام PCR و انجـــام ژل الکتروفورز از هم جدا باشند.

به خاطر حساســـیت خیلی بالای روش PCR و ریسک ذاتی آلودگی، ضروری اســـت تا نتایج مثبت توســـط تکرار مجدد کل آزمایش مـــورد تأیید قرار گیرد. نمونه ای مثبت تلقی می‌شـــود که حداقل توسط یک تکرار نتیجه آن تأیید گـــردد. کلیه مواد مورد اســـتفاده در آزمایش باید توســـط روش‌هـــای معمول کنترل اولیه شـــوند و پذیـــرش و یا رد کردن، باید معیـــار کار قرار گیرد. پرایمرها از ترکیبات مهم PCR به شـــمار می‌روند و نحـــوه طراحی، میزان خلوص و اعتبار ســـنجی اســـتفاده از آن‌ها در PCR باید مورد توجه قرار گیرد. هر بچ جدید پرایمر باید برای اختصاصیت، کارایی تکثیر و ناخالصی‌های ممانعت کننده مورد تست قرار گیرد.

د- الکتروفورز با ژل پلی‌آکریل آمید و سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE)

پلی‌اکریل آمیـــدژل الکتروفورز جهت تعیین مشـــخصات کیفی پروتئین‌ها در موارد بیولوژیک به منظور کنترل خالص بـــودن و تعیین کمیت به کار می‌رود. ژل الکتروفورز روشـــی مناســـب جهت شـــناختن و ارزیابی تجانـــس پروتئین‌ها در ساخت داروها می‌باشد. این روش به طور معمول برای تخمین جرم زیـــر واحدهای مولکول پروتئین‌ها و برای تعیین ترکیب زیر واحدهای پروتئین‌های خالص شده به کار می‌رود (۳۱).

جـــرم مولکولی پروتئین‌ها توســـط مارکرهـــای مولکولی بـــا وزن مولکولی مشـــخص، تعیین می‌گـــردد. مخلوطی از پروتئین‌ها با جرم مولکولی مشخص بر روی ژل قابل رویت خواهد بود. محلول‌های غلیظ ذخیره شـــده پروتئین با وزن مولکولی مشخص در بافر نمونه مناسب رقیق شده و بر روی ژل لود می‌شود. بعد از رنگ آمیزی میزان مهاجرت مارکر و نمونه‌ها از لبه ژل جدا کننده سنجیده می‌شود (۳۱).

بحث و نتیجه گیری

به منظور حفاظت از ریســـک‌های مرتبـــط با تولید داخل و واردات محصولات بیولوژیک به خصوص واکســـن‌ها، غربالگری

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-11-23]

این محصولات الزامی به نظر می‌رسد. لذا با توجه به واردات واکسن‌ها از کشورهای مختلف با سطوح تکنولوژیک متفاوت، از جمله اروپای شرقی و غربی، آمریکای شمالی و بعضاً آمریکای مرکزی و تفاوت‌های موجود در این کشورها از لحاظ قوانین نظارتی بر کنترل کیفی واکسن‌ها و همچنین واردات تخم مرغ‌های SPF از کشورهای با سطوح تکنولوژیک و نظارت کیفی متفاوت، جهت تولید واکسن‌ها در داخل کشور، ضرورت تکوین و توسعه سیستم‌های کنترل کیفی واکسن در داخل کشور از ضروریات بی بدیل کشور می‌باشد. در این راستا توسعه سیستم‌های غربالگری و تأیید نهایی آلودگی‌های جستجو شده با روش‌های تکمیلی می‌تواند از اولویت بالایی برخوردار باشد.

References

1- Thornton DH. A survey of mycoplasma detection in veterinary vaccines. Vaccine. 1986;4(4):237-40.

2- Erickson GA, Landgraf JG, Wessman SJ, Koski TA, Moss LM. Detection and elimination of adventitious agents in continuous cell lines. Dev Biol Stand. 1989.66-70:59.

3- Jung H, Wang SY, Yang IW, Hsueh DW, Yang WJ, Wang TH, et al. Detection and treatment of mycoplasma contamination in cultured cells. Chang Gung Med J. 2003;26(4):250-8.

4- Uphoff CC, Drexler HG. Detecting mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. Methods Mol Biol. 2011;731:93-103.

5- Vannier P, Leforban Y, Carnero R, Cariolet R. Contamination of a live virus vaccine against pseudorabies (Aujeszky's disease) by an ovine pestivirus pathogen for the pig. Ann Rech Vet. 1988;19(4):283-90.

6- Harasawa R, Mizusawa H. Demonstration and genotyping of pestivirus RNA from mammalian cell lines. Microbiol Immunol. 1995;39(12):979-85.

7- Harasawa R, Mizusawa H, editors. Detection of Pestiviruses from Mammalian Cell Cultures by the polymerase chain reaction. Proceeding of 3rd internet World Congress on Biomedical Sciences; 1996; Tsukuba,Japan.

8- Vilcek S. Identification of pestiviruses contaminating cell lines and fetal calf sera. Acta Virol. 2001;45(2):81-6.

9- von Mettenheim AE. [Studies on simian viruses as possible contaminants of inactivated virus vaccines. I. Direct and serologic detection of simian adenovirus SV20 (author's transl)]. Zentralbl Bakteriol Orig A. 1975;232(2-3):131-40.

10- Fadly Aly, Silva Robert – bob, Henry H, editors. Detection of exogenous and endogenous avian leucosis viruses in commercial marek's disease vaccines. Proceedings of the 170th Annual Meeting of the United States Animal Health Association; 2003 October 9-16; San Diego, California.

11- Wozniakowski G, Mamczur A, Samorek-Salamonowicz E. Common occurrence of Gallid herpesvirus-2 with reticuloendotheliosis virus in chickens caused by possible contamination of vaccine stocks. J Appl Microbiol. 2015;118(4):803-8.

12- Luan H, Wang Y, Li Y, Cui Z, Chang S, Zhao P. Development of a real-time quantitative RT-PCR to detect REV contamination in live vaccine. Poult Sci. 2016;95(9):2023-9.

13- Bolin SR, Matthews PJ, Ridpath JF. Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhea virus and antibodies against bovine viral diarrhea virus. J Vet Diagn Invest. 1991;3(3):199-203.

14- Yanagi M, Bukh J, Emerson SU, Purcell RH. Contamination of commercially available fetal bovine sera with bovine viral diarrhea virus genomes: implications for the study of hepatitis C virus in cell cultures. J Infect Dis. 1996;174(6):1324-7.

15- Zabal O, Kobrak AL, Lager IA, Schudel AA, Weber EL. [Contamination of bovine fetal serum with bovine viral diarrhea virus]. Rev Argent Microbiol. 2000;32(1):27-32.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-11-23]

16- Schuurman R, van Steenis B, Sol C. Bovine polyomavirus, a frequent contaminant of calf serum. Biologicals. 1991;19(4):265-70.

17- Schuurman R, van Steenis B, van Strien A, van der Noordaa J, Sol C. Frequent detection of bovine polyomavirus in commercial batches of calf serum by using the polymerase chain reaction. J Gen Virol. 1991;72 (Pt 11):2739-45.

18- Kappeler A, Lutz-Wallace C, Sapp T, Sidhu M. Detection of bovine polyomavirus contamination in fetal bovine sera and modified live viral vaccines using polymerase chain reaction. Biologicals. 1996;24(2):131-5.

19- Strickler HD, Rosenberg PS, Devesa SS, Hertel J, Fraumeni JF, Jr., Goedert JJ. Contamination of poliovirus vaccines with simian virus 40 (1955-1963) and subsequent cancer rates. JAMA. 1998;279(4):292-5.

20- Nettleton PF, Rweyemamu MM. The association of calf serum with the contamination of BHK21 clone 13 suspension cells by a parvovirus serologically related to the minute virus of mice (MVM). Arch Virol. 1980;64(4): 359-74.

21- Hughes B. Key points from Nettleton and Rweyemamu (1980): association of calf serum with parvovirus infection. Dev Biol Stand. 1996;88:205-6.

22- Bennett S, MacLean AR, Reynolds A, von Wissmann B, Gunson RN. False positive influenza A and B detections in clinical samples due to contamination with live attenuated influenza vaccine. J Med Microbiol. 2015;64(Pt 4):466-8.

23- O'Toole D, Van Campen H, Woodard L. Bluetongue virus: contamination of vaccine. J Am Vet Med Assoc. 1994;205(3):407-8.

24- Farsang A, Wehmann E, Soos T, Lomniczi B. Positive identification of Newcastle disease virus vaccine strains and detection of contamination in vaccine batches by restriction site analysis of the matrix protein gene. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2003;50(7):311-5.

25- Murata H, Macauley J, Lewis AM, Jr., Peden K. Plaque purification as a method to mitigate the risk of adventitious-agent contamination in influenza vaccine virus seeds. Vaccine. 2011;29(17):3155-61.

26- Amer HM, Elzahed HM, Elabiare EA, Badawy AA, Yousef AA. An optimized polymerase chain reaction assay to identify avian virus vaccine contamination with Chicken anemia virus. J Vet Diagn Invest. 2011;23(1):34-40.

27- Murray G, editor Global SPF Supplies. AVPA Scientific Meeting; 213-12003 November; Melbourne.

28- McRearden B. What Is Coming Through That Needle? The Problem of Pathogenic Vaccine Contamination 2003 [Available from: https://rense.com/general32/thrur.htm.

29- Scudellari M. Vaccine contamination prompts safety review. Nat Med. 2010;16(5):493.

30- Meeusen EN, Walker J, Peters A, Pastoret PP, Jungersen G. Current status of veterinary vaccines. Clin Microbiol Rev. 2007;20(3):489-510, table of contents.

31- Bruckner L, Bongers J, Castle P, Flore PH, Guittet M, Halder M, et al. Three rs approaches in the production and quality control of avian vaccines. Altern Lab Anim. 2000;28(2):241-58.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2025-11-23]