

# 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](mailto: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 آنتریت هموراژیک و ویروس رتیکولاندوتلیوز می‌باشد. روش‌های شناسایی این عوامل خارجی و 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، میکوپلاسمایی 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:** میکوپلاسم (۴-۱)،

پستی ویروس (۸-۵)، SV20 (۹)، لکوز پرندگان (۱۰)، رتیکولاندوتلیوز پرندگان (۱۱، ۱۲).

**آلودگی واکسن‌های دامی:** BVD (۶، ۸، ۱۵-۱۳)،

پلیوماگای (۱۹-۱۶)، ویروسی از خانواده پارووایروس (۲۰، ۲۱)، ویروس رینوتراکئیت گاوی عفونی و ویروس پاراآنفلوانزا تیپ ۳ (۲۲)، زبان آبی (۲۳).

**آلودگی واکسن‌های طیور:** نیوکاسل (۲۴)، برونشیت،

میکوپلاسم (۱، ۴)، ویروس لکوز (۱۰)، رتووایروس، ویروس گامبورو، ویروس آنفلوانزا در واکسن‌های امولسیفیه روغنی (۲۲، ۲۵)، ویروس رتیکولاندوتلیوز (۱۱، ۱۲)، ویروس لارنگوتراکئیت عفونی طیور و ویروس کم خونی عفونی (۲۶).

تخم مرغ‌های عاری از پاتوژن‌های 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



واکسن‌های طیور بیشتر از دیگر واکسن‌ها می‌باشد. علت آن هم فراوانی جمعیت طیور، گستردگی این صنعت در سطوح ملی و بین‌المللی 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 حال در طول سالیان اخیر خلوص واکسن‌ها نیز به عنوان یک عنصر بسیار مهم در تجارت بین‌الملل واکسن‌ها مطرح شده است. تست‌های هماهنگ تعیین عدم حضور عوامل خارجی به عنوان یک موضوع اصلی در عرصه بین‌المللی برای واکسن‌ها مطرح می‌باشد. در عین حال تضمین فقدان عوامل خارجی در واکسن‌ها نمی‌تواند صرفاً با تست‌های آزمایشگاهی تضمین گردد. تست‌های آزمایشگاهی صرفاً بخشی از ابزارهایی است که جهت نیل به این هدف ضروری است. روش‌های شناسایی این عوامل خارجی شامل سرولوژی، جداسازی ویروس و جداسازی ویروس در تخم مرغ‌های جنین دار یا کشت‌های سلولی می‌باشد.

## □ روش‌های جستجوی عوامل خارجی در محصولات بیولوژیک

### الف) کشت سلول

به منظور شناسایی و کنترل به هر بذری سلولی اصلی یک کد ویژه داده می‌شود. بذری سلولی اصلی به صورت حجم‌های کوچک در دمای ۷۰- درجه یا پایین‌تر نگهداری می‌شوند. معمولاً واکسن‌ها از سلول‌هایی با بیش از ۲۰ پاساژ از بذری سلولی 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 پاساژ در تولید واکسن‌ها مصرف شود، بایستی نشان داده شود که از نظر خصوصیات بیولوژیک تولید کشت‌های سلولی مشابه بذری 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 میکوپلاسماها باشند (۳۰، ۳۱).

خود تحت عنوان «منابع جهانی تهیه تخم مرغ عاری از عوامل خاص» در گردهمایی علمی AVPA معضل آلودگی تخم مرغ‌های SPF را با وضوحی خاص مطرح کرده است (۲۷). شدت آلودگی در تخم مرغ‌های SPF به حدی فراگیر بوده که سال ۲۰۰۳ را به عنوان سال آلودگی (2003, the year of contamination) نامگذاری نموده‌اند. در این سال سه تولیدکننده معظم جهانی تخم مرغ عاری از پاتوژن‌های خاص (SPF)، از جمله لوهمان (Lohman) Charles River Laboratories SPAFAS، Sunrise Farms Inc. حداقل به یکی از ویروس‌های لکوز لنفوئید، آدنوویروس پرندگان یا رتوویروس پرندگان آلوده بودند. این پدیده صنعت تولید واکسن را با مشکلی مواجه ساخت که برای تولید واکسن، تخم مرغ کافی در اختیار تولیدکنندگان واکسن وجود نداشت. با این وجود به دلیل اهمیت موضوع و استراتژیک بودن بحث تولید واکسن در بازار جهانی، احتمالاً با اهداف سیاسی، اطلاع‌رسانی لازم در این خصوص انجام نشد و تنها اطلاعات اندکی به صورت بسیار محدود و پراکنده در دسترس قرار گرفت. نکته قابل توجه آن که انتشار ویروس در بعد جهانی می‌تواند از طریق آلودگی واکسن‌ها صورت پذیرد. نمونه‌های مشخصی را در این خصوص می‌توان ذکر نمود (۲۷).

آلودگی واکسن‌ها در زنجیره تولید، می‌تواند از نظر تئوریک به طرق مختلفی حادث شود که می‌توان به آلودگی‌های ایجاد شده در مواد اولیه (کشت سلول، تخم مرغ‌های جنین دار، مواد افزودنی مانند سرم گاو و ...) و مراحل تولید اشاره کرد. واکسن‌های دامپزشکی عمدتاً توسط کشت میکروارگانیسم‌های زنده در سلول‌های بافت زنده با منشأ حیوانی (کشت سلول، تخم مرغ جنین دار و ...)، به عنوان سوبسترا، تهیه می‌شوند. علاوه بر این محیط کشت غالباً با ترکیبات اختصاصی با منشأ حیوانی، مشخصاً سرم، همراهی می‌شوند تا رشد رضایت بخش میکروارگانیسم‌ها تضمین گردد. ضمناً در خود پروسه تولید موادی با منشأ حیوانی، همانند تریپسین نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتیجتاً همواره یک خطر بالقوه برای آلودگی واکسن‌ها با عوامل خارجی وجود دارد (۲۸). شاید بتوان ادعا کرد که میزان این آلودگی‌ها در

## ب) کشت تخم مرغ

تخم مرغ‌های جنین دار در تولید مواد بیولوژیک کاربرد وسیعی دارند. تقریباً در تمام موارد، این 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 بسته به ارگانیزم خاص که تحت کشت قرار می‌گیرد، متفاوت می‌باشد. تست تلقیح تخم مرغ در غشاء کوریولانتوئیک (CAM) و کیسه آلانتوئیک (AS) انجام می‌شود. تخم‌مرغ‌ها باید SPF بوده و از نظر برخی عوامل سرونگاتیو باشند (۲۷). مانند: نیوکاسل، CELO، برونشیت عفونی، مارک، Mycoplasma gallisepticum، Mycoplasma synoviae و Salmonella pullorum، Egg Drop Syndrome.

## 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- تکثیر سیگنال‌های هیبریدیزاسیون: مانند روش branched DNA (bdDNA) برای جستجوی 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 مکمل (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 شرایطی انجام شود که کمترین تجزیه توالی هدف رخ دهد. در مورد توالی‌های RNA باید موارد احتیاط به خوبی رعایت شود زیرا RNA بسیار به تجزیه توسط ریبونوکلازها حساس می‌باشد. به منظور

مقابله با دو نوع آلودگی: ۱- cross contamination  
۲- Carry-over contamination باید محل تهیه master mix و انجام PCR و انجام ژل الکتروفورز از هم جدا باشند.

به خاطر حساسیت خیلی بالای روش PCR و ریسک ذاتی آلودگی، ضروری است تا نتایج مثبت توسط تکرار مجدد کل آزمایش مورد تأیید قرار گیرد. نمونه ای مثبت تلقی می‌شود که حداقل توسط یک تکرار نتیجه آن تأیید گردد. کلیه مواد مورد استفاده در آزمایش باید توسط روش‌های معمول کنترل اولیه شوند و پذیرش و یا رد کردن، باید معیار کار قرار گیرد. پرایمرها از ترکیبات مهم PCR به شمار می‌روند و نحوه طراحی، میزان خلوص و اعتبار سنجی استفاده 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 سولفات (SDS-PAGE)

پلی‌آکریل آمید ژل الکتروفورز جهت تعیین مشخصات کیفی پروتئین‌ها در موارد بیولوژیک به منظور کنترل خلوص بودن و تعیین کمیت به کار می‌رود. ژل الکتروفورز روشی مناسب جهت شناختن و ارزیابی تجانس پروتئین‌ها در ساخت داروها می‌باشد. این روش به طور معمول برای تخمین جرم زیر واحدهای مولکول پروتئین‌ها و برای تعیین ترکیب زیر واحدهای پروتئین‌های خالص شده به کار می‌رود (۳۱).

جرم مولکولی پروتئین‌ها توسط مارکرهای مولکولی با وزن مولکولی مشخص، تعیین می‌گردد. مخلوطی از پروتئین‌ها با جرم مولکولی مشخص بر روی ژل قابل رویت خواهد بود. محلول‌های غلیظ ذخیره شده 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 ریسک‌های مرتبط با تولید داخل و واردات محصولات بیولوژیک به خصوص واکسن‌ها، غربالگری



نظارت کیفی متفاوت، جهت تولید واکسن‌ها در داخل کشور، ضرورت تکوین و توسعه سیستم‌های کنترل کیفی واکسن در داخل کشور از ضروریات بی‌بدیل کشور می‌باشد. در این راستا توسعه سیستم‌های غربالگری و تأیید نهایی آلودگی‌های جستجو شده با روش‌های تکمیلی می‌تواند از اولویت بالایی برخوردار باشد.

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

## 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.

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.

