

استفاده از مشتقات آزیریدین ها در غیر فعال کردن ویروس تب برفکی جهت ساخت واکسن کشته در مؤسسه رازی

● عبدالمحمد طالب شوشتری ● همایون مهروانی ● محمود فرشپور رضایی، اعضاء هیات علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی

تاریخ دریافت: آذرماه ۱۳۷۹ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۱۳۷۹

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 51 PP: 62-64

Application of azaridine derivatives to inactivation of FMDV for vaccine production in Razi Institute.

By: A.M. Talebshoushtari, H. Mehravani & M. Farshpour Rezaii, Members of Scientific Board of Razi Inst.

The most widely used inactivant for the preparation of foot and mouth disease (FMD) vaccine has been formaldehyde, although the inactivation kinetics with this agent seem too complex for predicting the degree of inactivation (Graves, 1963, Wesslen and Dinter, 1966). The inactivation of FMDV by aziridines derivatives has received increased attention, because they are derivatives of aziridine are good inactivants for FMDV as they inactivate according to first order kinetics. However they are highly toxic and this makes their application in vaccine production procedures potentially dangerous. The application of these agents in the form of binary would greatly reduce the danger of handling the inactivant (Bahneman, 1975). In this project we have used 2-bromo ethylen amine hydrobromid (BEA), that it change to binary bromo ethylenimine (BEI) with alkaline media (NaOH). The rates of inactivation for foot and mouth disease virus (FMDV) type O and A grown in BHK21, Suspension and monolayer cell culture system were determined with 0.01 M and 0.001 M of BEI. In another test rates of inactivation determined with different temperature and different pH. It is observed that in case of different pH values and also type of FMD viruses there was no significant change. The most suitable concentration of BEI was 0.01 M in 25°C (inactivant) used.

Key words: FMD, FMDV, BEA, BEI, Azaridine, Inactivation.

چکیده

استفاده از فرمالدئید به عنوان غیرفعال‌کننده جهت ساخت واکسن FMD در سطح جهان به طور گسترده‌ای معمول بوده (۶) ولی به خاطر پیچیدگی درجه غیرفعال‌کنندگی این ماده و طولانی بودن زمان غیرفعال شدن و تخریب بیشتر پارتنیکولهای ایمنی‌زا استفاده از مشتقات آزیریدین مورد توجه روزافزون محققین قرار گرفته است (۷). آزیریدین‌ها غیرفعال‌کننده‌های خوبی برای ویروس FMD هستند، چرا که این ویروس را در ساعات اولیه غیرفعال کرده و پارتنیکولهای ایمنی‌زا را حفظ می‌نمایند. مشتقات آزیریدین به شدت توکسیک هستند و این مسئله استفاده از آنها را در فرآیند تولید واکسن FMD با خطر مواجه می‌کند ولی استفاده از این ترکیبات به صورت Binary (حلقوی) به مقدار زیادی از خطرات آنها می‌کاهد (۱). در این طرح از ۲- برومواتیلن آمین هیدروبروماید استفاده شده است که در محیط قلیایی (هیدروکسید سدیم) به صورت حلقوی در می‌آید و محصول نهایی عاری از خطر می‌باشد. این ماده در رفتهای مختلف و در دماهای متفاوت و نیز pHهای مختلف، در ویروس‌های تیپ O, A، تب برفکی مورد بررسی قرار گرفته است. غلظت ۰/۰۱M آن در مدت کوتاهی ویروس FMD را غیرفعال می‌نماید. آزمایش‌های انجام شده با این ماده نشان داد که رقت ۰/۰۱M ویروس FMD را در مدت ۸ ساعت و غلظت ۰/۰۱M این ماده، ویروس مزبور را پس از ۸۰ دقیقه غیرفعال می‌نماید. (در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد). آزمایش‌های انجام شده نشان داد که روند غیرفعال سازی ویروس FMD در pHهای ۷/۵، ۷/۹، ۸/۱ تقریباً مشابه است. در حالی که غیرفعال سازی در دماهای مختلف کاملاً متفاوت است. لازم به ذکر است که کلیه نمونه‌هایی که در ساعات مختلف گرفته شده علاوه بر تیتراژ آنها به تعداد ۳ پاساژ روی سلول کلیه خوک برده شده که نتایج حاصله کاملاً با نتایج تیتراژ و همچنین زمان غیرفعال شدن کامل ویروس مطابقت می‌نمود. بنابراین ماده مزبور خالی از خطر بوده و ضمناً کار غیرفعال کردن ویروس را نیز انجام می‌دهد. کلمات کلیدی: بیماری تب برفکی، ویروس تب برفکی، ۲-برومواتیلن آمین، آزیریدین‌ها، غیرفعال‌سازی

جدول شماره ۲- اثر غیرفعال کنندگی فرمالدئید بر روی ویروس تیپ O در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد با رقت ۰/۵ در هزار

شاهد	۲۰ ساعت	۱۸ ساعت	۱۶ ساعت	۱۴ ساعت	۱۲ ساعت	۱۰ ساعت	۸ ساعت	۶ ساعت	۴ ساعت	۲ ساعت	ساعت نمونه برداری
۷/۱	۲/۵	۲/۷	۲/۱	۲/۱	۳/۵	۳/۵	۲/۷	۴/۱	۴/۳	۴/۷	TCID ₅₀ %ml

جدول شماره ۳- مقایسه اثر غیرفعال کنندگی BEI با رقت ۰/۱ مولار بر روی تیپ A ویروس FMD در درجات حرارت ۲۷ و ۲۵ و ۴ درجه سانتی گراد

۲۷ درجه سانتی گراد		۲۵ درجه سانتی گراد		۴ درجه سانتی گراد		شاهد
زمان نمونه برداری (پس از شروع آزمایش)	TCID ₅₀ %ml	زمان نمونه برداری (پس از شروع آزمایش)	TCID ₅₀ %ml	زمان نمونه برداری (پس از شروع آزمایش)	TCID ₅₀ %ml	TCID ₅₀ %ml
۲۰ دقیقه	۲/۵	۲۰ دقیقه	۷/۵	۴ ساعت	۶/۷	
۴۰ دقیقه	۰/۸۵	۴۰ دقیقه	۷/۵	۱۲ ساعت	۶/۵	
۶۰ دقیقه	۰	۶۰ دقیقه	۴/۳۵	۲۰ ساعت	۶/۵	
۸۰ دقیقه	۰	۸۰ دقیقه	۴/۲۵			۷/۵ (در ابتدای آزمایش)
۱۰۰ دقیقه	۰	۱۰۰ دقیقه	۴/۲۰			pH=۸/۱۰
		۲ ساعت	۲/۸۵			
		۴ ساعت	۲/۱			
		۵ ساعت	۰/۸			
		۷ ساعت	۰			
		۱۰ ساعت	۰			۵/۵ (در انتهای آزمایش)
		۱۰ ساعت	۰			--
		۱۴ ساعت	۰			--

بحث

ایمنی زایی واکسن اثر سوء نداشته باشد. در صورتی که غیرفعال کردن ویروس FMD با فرمالین باعث تغییر زیاد و گاه تخریب پروتئینهای سطحی ویروس شده و نهایتاً در ایمنی زایی اثر منفی به جای می گذارد (۸). لازم به توضیح است که اثر فرمالین عمدتاً روی پروتئین های سطحی است یکی از عوامل ایمنی زایی پروتئین سطحی ویروس FMD به نام VP₁ می باشد که در مجاورت با فرمالین احتمال آسیب دیدگی بیشتری نسبت به BEI دارد.

سیاسگزاری

لازم می دانیم از مساعدتهای صمیمانه کلیه همکاران بخش تب برفکی بالاخص آقایان دکتر آمیغی ریاست محترم بخش، دکتر خراسانی، دکتر ایزدی، مهدی صالحی زاده، علی کمالزارع... که در انجام کار ما را یاری کردند تشکر و قدردانی نماییم.

منابع مورد استفاده

- 1- Bahnemann H.G. 1975. Archives of virology 47, pp 47-56.
- 2- Bahnemann H.G. 1990. Vaccine, Vol. 8, pp 299-303.
- 3- Butchiah, G.A.K. Sen and B.U. Rao, 1985. In dianvet j. 62, pp 635-642.
- 4- Brown F., Cartwright B. and Doreen L. Stewart, 1962. J. Gen. Microbiol, 31, pp 179-186.
- 5- Brown F., Hyslop N. ST. G., Jooan Crick and Morrow A.W, 1963. J. Hyg, Camb. 61, 337.
- 6- Dermer, O.C. and Ham, G.El, 1969. New York: Acadmic press, 453-458.
- 7- Barteling S.J. and R. Wort Meyer 1983. Archive of virology 80, 103-117.
- 8- Bahnemann, H.G. 1997, Vaccine manual (FAO Publication) Noel Mowat and Mark Rweyemamu. 267-271.

در این پروژه به چند نکته مهم به شرح زیر دست یافتیم.
 ۱- pHهای متفاوت به کار رفته در این آزمایش تأثیر چندانی بر روند غیرفعال سازی نداشتند.
 ۲- مدت غیرفعال سازی برای تیپ های مختلف ویروس تب برفکی (O, A) تفاوتی نداشت.
 ۳- تیترو ویروس به کار برده شده تأثیر چندانی در مدت غیرفعال سازی نداشت.
 ۴- با توجه به نتایج به دست آمده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رقت ۰/۱ مولار، ویروس در مدت کوتاهی غیرفعال می شود (در مدت یک ساعت). بهترین دمای توصیه شده و عملی جهت غیرفعال سازی ویروس تب برفکی در مراکز واکسن سازی ۲۵ درجه سانتی گراد و رقت ۰/۱ مولار است. زیرا که دمای ۳۷ درجه سانتی گراد ممکن است باعث تغییر و تخریب پروتئین های ویروس تب برفکی گردد (۴).

۵- امتیاز عمده BEI نسبت به فرمالین این است که مدت زمان کوتاهی با پروتئین های سطحی ویروس درگیر است و این مسئله باعث می شود تا عوامل آنتی ژنتیکی ویروس تغییر ننموده و نتیجتاً بر قدرت

تیپ A تب برفکی در دماهای ۴، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد بود (جدول شماره ۳). نتیجه این آزمایش نشان داد که در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد این ویروس پس از ۶۰ دقیقه کاملاً غیرفعال شد در صورتی که در ۲۵ درجه سانتی گراد این ویروس پس از گذشت ۷ ساعت غیرفعال گردید و در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد پس از ۲۰ ساعت هنوز ویروس تیترو معادل ۵/۵ TCID₅₀ ml داشته است.

آزمایش چهارم

در آزمایش چهارم اثر غیرفعال کنندگی BEI روی ویروس FMD در pHهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت (جدول شماره ۴). همانطور که نتایج نشان می دهد خاصیت غیرفعال کنندگی BEI در pHهای ۷/۵، ۷/۹ و ۸/۱ تقریباً یکسان است.

توضیح

آزمایش شماره ۴ تحت شرایط ۳۵ درجه سانتی گراد انجام شده و pH مورد نظر نیز مربوط به مخلوط ویروس و غیرفعال کننده بوده است.

جدول شماره ۴- مقایسه غیرفعال کنندگی BEI روی تیپ A ویروس FMD در pHهای مختلف

زمان نمونه برداری	TCID ₅₀ %			شاهد ویروس
	رقت ۰/۱ مولار	رقت ۰/۰۱ مولار	رقت ۰/۰۰۱ مولار	
پس از شروع آزمایش	pH = ۷/۵	pH = ۷/۹	pH = ۸/۱	شاهد ۵۰ ml TCID ₅₀
۲۰ دقیقه	۲/۸۵	۳	۳	۷/۱ (ابتدای آزمایش)
۴۰ دقیقه	۱/۴۵	۱/۴۵	۱/۴۵	
۶۰ دقیقه	۰/۱۵	۰/۳۵	۰/۳۵	
۸۰ دقیقه	۰	۰/۰۵	۰	
۱۰۰ دقیقه	۰	۰	۰	
۱۲۰ دقیقه	۰	۰	۰	
۴ ساعت	۰	۰	۰	
۶ ساعت	۰	۰	۰	۶/۹ (انتهای آزمایش)