

ارزیابی طول عمر محلول توبرکولین انسانی ساخت مؤسسه تحقیقاتی رازی

- کیوان تدین، کارشناس بخش تهیه توپرکولین و مالتین، مؤسسه تحقیقاتی رازی
 - امیر حسین شاهمرادی، عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقاتی رازی
 - نادر مصوری، عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقاتی رازی
- تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۷۷

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 40, 41, 42 PP: 110-113

A study on lifetime and potency of Razi PPD tuberculin.

By: Tadayon K., Shahmoradi A.H. and Mosavvari N., PPD tuberculine department, Razi vaccine and serum research institute.

Razi vaccine and serum research institute is the only centre in Iran provides PPD. During the present decade the rate of production in Tub. department of this centre has increased for every year. since 1997 this department has been comitted to provide all consuming human PPD in Iran. In the past the potency of Razi human PPD was guaranteed for one month but it was not sufficient for consumers in the farthest parts of the country. the authers designed this study to know how long can R .H. ppD be potent if keep in ideal situations. we can show this product is useable at least till six month after production.

چکیده
مؤسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی تنها مرکز تولید کننده توپرکولین مورد استفاده در توپرکولیناسیون انسان و دامها در ایران می باشد. طی سالهای اخیر حجم تولیدات متنوع بخش تهیه و تولید توپرکولین و مالتین این مؤسسه همواره روند افزایشی داشته است. اگر چه تولید و عرضه محلول توپرکولین آماده مصرف انسانی توسط این مرکز در گذشته نیز انجام می پذیرفته است، با این حال از ابتدای سال ۱۳۷۶ عرضه این فرآورده در سراسر کشور رسماً بر عهده این مؤسسه سپرده شده است. در این مقاله نگارندگان کوشیده اند تا بطور مختصر خلاصه ای از اقدامات انجام شده در این مرکز راجهت عرضه محصولی با کیفیت و پایداری قابل قبول به بازار مصرف ارائه دهند.

جدول شماره ۲- خلاصه نتایج (ابعاد بر حسب میلیمتر می باشد)

ردیف	شماره کوچک	حساسیت کوچک	سری توپرکولین	قطر واکنش	میانگین	میانگین کل
۱	۵۷۷۱	حساس شده	۱	۰	۰	۰
۲	۵۷۷۱	۰	۲	۱۱	۹/۱۷	۷/۸ ± ۱/۶۵
۳	۵۷۷۱	۰	۳	۹	۷/۸۳	۷/۸ ± ۱/۶۵
۴	۵۷۷۱	=	۴	۰	۵/۵	۷/۸ ± ۱/۶۵
۵	۵۷۷۱	=	۵	۶/۷۵	۷/۵۸	۷/۸ ± ۱/۶۵
۶	۵۷۷۱	=	۶	۸/۵	۹	۷/۸ ± ۱/۶۵
۷	۵۷۷۱	=	placebo	۰	۰	۰
۸	۵۷۷۱	=	استاندارد	۷	۹/۹۱	۹/۹۱
۹	۵۷۸۱	=	۱	۰	۰	۰
۱۰	۵۷۸۱	=	۲	۸/۵	۹/۱۷	۷/۸ ± ۱/۶۵
۱۱	۵۷۸۱	=	۳	۶/۵	۷/۸۳	۷/۸ ± ۱/۶۵
۱۲	۵۷۸۱	=	۴	۹	۵/۵	۷/۸ ± ۱/۶۵
۱۳	۵۷۸۱	=	۵	۸/۵	۷/۵۸	۷/۸ ± ۱/۶۵
۱۴	۵۷۸۱	=	۶	۷	۹	۷/۸ ± ۱/۶۵
۱۵	۵۷۸۱	=	placebo	۰	۰	۰
۱۶	۵۷۸۱	=	استاندارد	۹	۹/۹۱	۹/۹۱
۱۷	۵۷۵۷	=	۱	۰	۰	۰
۱۸	۵۷۵۷	=	۲	۸	۹/۱۷	۷/۸ ± ۱/۶۵
۱۹	۵۷۵۷	=	۳	۸	۷/۸۳	۷/۸ ± ۱/۶۵
۲۰	۵۷۵۷	=	۴	۷/۵	۵/۵	۷/۸ ± ۱/۶۵
۲۱	۵۷۵۷	=	۵	۷/۵	۷/۵۸	۷/۸ ± ۱/۶۵
۲۲	۵۷۵۷	=	۶	۱۱/۵	۹	۷/۸ ± ۱/۶۵
۲۳	۵۷۵۷	=	placebo	۰	۰	۰
۲۴	۵۷۵۷	=	استاندارد	۱۳/۷۵	۹/۹۱	۹/۹۱
۲۵	۶۶۶۲	حساس نشده	۱	۰	۰	۰
۲۶	۶۶۶۲	=	۲	۰	۰	۰
۲۷	۶۶۶۲	=	۳	۰	۰	۰
۲۸	۶۶۶۲	=	۴	۰	۰	۰
۲۹	۶۶۶۲	=	۵	۰	۰	۰
۳۰	۶۶۶۲	=	۶	۰	۰	۰
۳۱	۶۶۶۲	=	placebo	۰	۰	۰
۳۲	۶۶۶۲	=	استاندارد	۰	۰	۰

جدول ۱- مشخصات ۶ سری توپرکولین مورد آزمایش

ردیف	سری توپرکولین	تاریخ انقضای مصرف	مدت نگهداری (روز)
۱	۱	6.3.98	۳۱۷
۲	۲	9.8.98	۲۸۶
۳	۳	15.10.98	۲۲۰
۴	۴	23.10.98	۲۱۲
۵	۵	10.11.98	۱۹۵
۶	۶	10.1.98	۱۳۴

مقدمه

بیش از یک قرن از زمان معرفی توپرکولین توسط دکتر کخ می گذرد، در اواخر قرن نوزدهم میلادی اهمیت و ارزش این ماده در تشخیص عارضه سل بر محققین روشن گردید و از اوایل قرن بیستم به تدریج جایگاه مهمی را در مبارزه با این بیماری پیدا نمود. اگر چه در طول سالهای پس از کشف این ماده انواع مختلفی از آن نظیر توپرکولین بروت^۱ و توپرکولین HCSM^۲ تهیه و به بازار مصرف عرضه گردید اما نهایتاً توپرکولین PPD به عنوان خالص ترین و معتبرترین انواع آن مورد پذیرش جهانی قرار گرفت. اصولاً هر فرآورده بیولوژیکی پس از تولید می بایست تحت شرایط مناسبی از نظر نور و دمای محیط نگهداری شود که در اکثر موارد دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد و محیط تاریک و بدون نور مد نظر می باشد. هیچ فرآورده بیولوژیکی وجود ندارد که طول عمر نامحدود داشته باشد و این به خاطر وقوع فعل و انفعالات شیمیائی نظیر اکسیداسیون می باشد که به تدریج در فرآورده تولیدی ایجاد می گردد. توپرکولین نیز از این امر مستثنی نمی باشد. علاوه بر شرایط نگهداری، نوع توپرکولین تولیدی که می تواند به شکل لیوفیلیزه و یا محلول باشد نیز در طول عمر آن موثر است. براساس عرف بین المللی محلول های غلیظ توپرکولین حداقل برای مدت ۲ سال و نمونه های لیوفیلیزه آن به مدت

تحت آزمایش توسط پودر موبیر، عاری از مو و توسط آب گرم خوب شسته و سپس به کمک حوله تمیز خشک گردید. آنگاه در هر پهلوی هر سرخوکیه پس از ضدعفونی کردن محل تزریق توسط پنبه آغشته به الکل در امتداد ستون فقرات حیوان چهار تزریق انجام شد، تزریقات براساس جدول اعداد تصادفی به گونه‌ای تنظیم گردیده بود که بدون اطلاع عامل از نوع ماده تزریقی به هر خوکیه ۶ نمونه توبرکولین، یک نمونه توبرکولین استاندارد شده به عنوان استاندارد و یک نمونه تامپون فسفات به عنوان ماده بی‌اثر^۳ تزریق گردد. تزریقات توسط یک عامل و با استفاده از سرنگهای مخصوص تست توبرکولین و به صورت داخل جلدی صورت گرفت، به هر سر خوکیه ۱/۱ سانتیمتر مکعب از هر نمونه پس از همزدن ویال مربوط تزریق و صحت عمل تزریق به کمک رویت برآمدگی در محل تزریق مشخص می‌گردید (عکس شماره ۱).

قرائت پاسخ تست

۲۴ ساعت پس از تزریق اندازه و نوع واکنش حاصله

M.tuberculosis که توسط حرارت (بخار آزاد با دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۳ ساعت) کشته شده و سپس توسط فور خشک گردیده بود، توزین گردید و درون یک هاون استریل ریخته شد و به آن ۴۰۰ میلی گرم پودر سنگ پای استریل افزوده گردید آنگاه همزمان با افزودن چند قطره پارافین مایع استریل (برای تهیه این سوسپانسیون کلاً ۵۰ سانتیمتر مکعب پارافین مایع استریل مورد نیاز است) محتویات هاون سائیده و نهایتاً با افزودن باقیمانده پارافین عمل سایش تکرار گردید. انجام صحیح این روش منجر به تهیه سوسپانسیونی با غلظت ۴ میلی گرم باکتری در هر سانتیمتر مکعب می‌گردد، به هر سر خوکیه ۰/۵ سانتیمتر مکعب از این سوسپانسیون به صورت داخل عضلانی و در ران پای راست تزریق گردید.

محلول‌های توبرکولین

شش ویال انسانی توبرکولین مشتمل برشش نمونه محلول توبرکولین عرضه شده به بازار و یک نمونه محلول توبرکولین استاندارد شده که همگی واجد ۵ IU

عکس شماره ۲



مورد بررسی قرار گرفت (عکس شماره ۲)، در این تست واکنش‌هایی که به صورت هاله قرمز رنگ ظاهر گردند مثبت تلقی می‌شوند، به کمک خط کش مدرج و پرگار ابعاد واکنش‌های پدید آمده اندازه‌گیری و به واحد میلیمتر ثبت گردید، برای این کار اندازه دو قطر قائم بر هم از منطقه مورد نظر انتخاب و اندازه‌گیری می‌شد و بالاخره میانگین دو عدد به دست آمده به عنوان اندازه نهائی ثبت می‌گردید.

پژوهش و سازندگی ۱۱۱

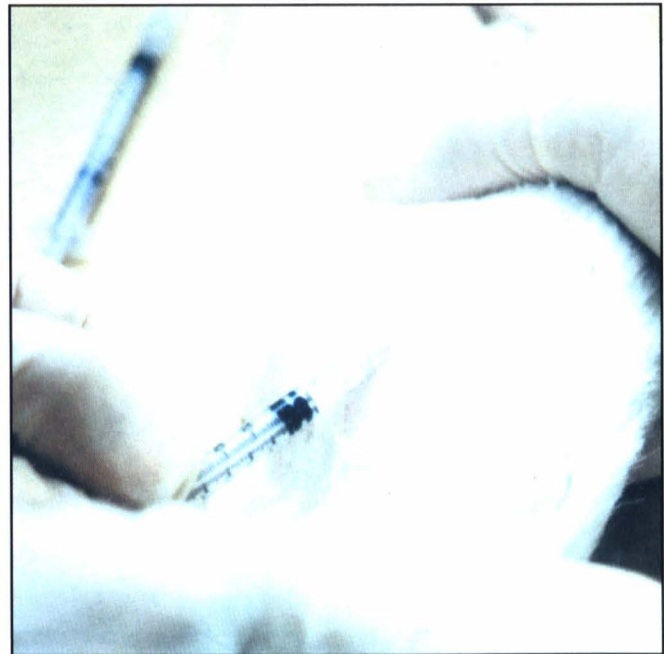
دست‌کم ۵ سال تحت شرایط مناسب از نظر نور و دما قابل نگهداریند. آنچه به عنوان فرآورده قابل مصرف انسانی به بازار مصرف ایران عرضه می‌گردد محلول در هر توبرکولین PPD است که با غلظت ۵ IU در هر دز تولید می‌شود. در سالهای گذشته مؤسسه رازی محلول توبرکولین آماده مصرف خود را در ویال‌های شیشه‌ای سفید و شفاف بامدت اعتبار حدود یک ماه روانه بازار می‌نمود، همگام با افزایش حجم تولید، جنس شیشه ویال‌های مصرفی نیز از سفید شفاف به قهوه‌ای تغییر یافت و با توجه به تقاضاهای مکرر مصرف‌کنندگان در سراسر کشور، تحقیق ذیل به منظور ارزیابی طول عمر توبرکولین تولیدی این مؤسسه صورت گرفت. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که افزایش طول عمر تضمین شده محلول توبرکولین انسانی ساخت این مؤسسه از یک ماه به شش ماه منطقی و موجه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

خوکیه هندی

۴ سر خوکیه هندی سفید از نژاد آلبینو به وزن بین ۳۰۰-۵۰۰ گرم انتخاب شدند. طبق پروتکل مؤسسه

عکس شماره ۱



توبرکولین PPD در هر دز بودند و یک نمونه تامپون فسفات (بعنوان ماده رقیق کننده و فاقد ترکیب مؤثره) انتخاب گردیدند. شرایط نگهداری هر شش ویال یکسان و مشتمل بر سردخانه تاریک با دمای ۵ درجه سانتیگراد بود (جدول شماره ۱).

انجام تزریقات روی خوکیه‌ها

در تاریخ ۷۷/۸/۳۰ هر دو پهلوی چهار سرخوکیه

ویرج انگلستان ۳ سر از آنها در تاریخ ۷۷/۶/۳۰ تحت تزریق سوسپانسیون حساس کننده قرار گرفتند. خوکیه هندی چهارم به عنوان حیوان غیر حساس بدون هیچگونه تزریقی تا زمان انجام تست نگهداری گردید.

سوسپانسیون روغنی حساس کننده

برای تهیه این سوسپانسیون ابتدا ۲۰۰±۲۰ میلی گرم پودر باسیل کخ از سه سویه PN,DT, C

ش ۷۸ب/۴۰،۴۱،۴۲

نتایج

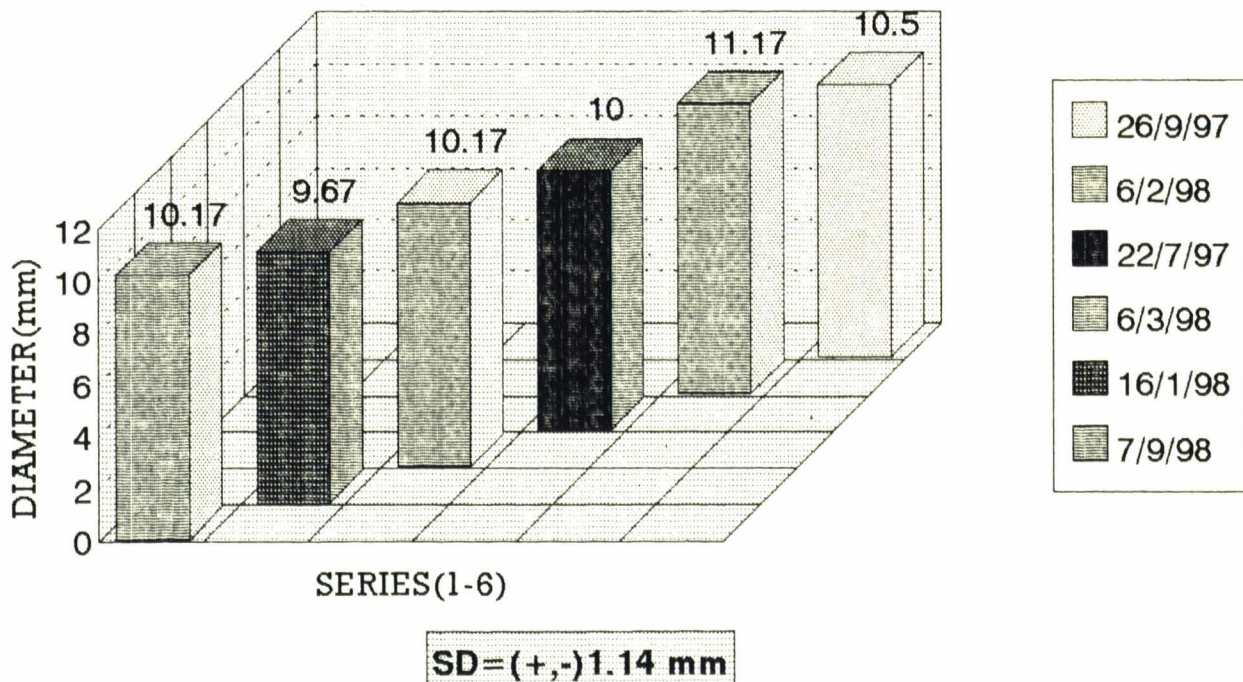
در جدول شماره ۲ خلاصه نتایج بدست آمده ارائه شده است. همانگونه که در این جدول دیده می شود توپرکولین سری اول که در هنگام انجام آزمایش ۳۱۷ روز از تولید آن گذشته بود فاقد Potency بوده است، میزان واکنش حاصل از تزریق پنج سری دیگر توپرکولین در سه سر خوکچه حساس شده معادل $7/8 \pm 1/65 \text{mm}$ بود. میزان واکنش حاصل از تزریق توپرکولین استاندارد شده در این خوکچه‌ها معادل $9/91 \text{mm}$ بود و واکنشی در محل تزریق تامپون فسفات‌ها در این خوکچه‌ها رویت نشد و در خوکچه غیر حساس نیز در هیچیک از محلهای ۸ گانه تزریقات هیچگونه قرمزی ناشی از تزریق رویت نگردید. در گراف ۱ و گراف ۲ خلاصه این اطلاعات نمایش داده شده است.

از انجام آزمایش Potency test ضروری است خوکچه‌ها با استفاده از یک روش معتبر حساس گردند، در حال حاضر دست‌کم پنج روش مختلف جهت حساس نمودن خوکچه هندی وجود دارد که در این تحقیق از روش سفارش شده توسط مؤسسه ویبریج انگلستان استفاده گردید. حساسیت مطلوب دست‌کم پس از ۳ هفته بعد از تزریق سوسپانسیون حاصل می‌گردد و تا ۶ ماه پس از آن ادامه خواهد داشت. در هنگام انجام تست ضروری است کلیه تزریقات در طول یک خط موازی با ستون فقرات حیوان و در پهلوهای آن صورت پذیرد زیرا هر چقدر محل تزریق به خط ستون فقرات خوکچه نزدیکتر باشد پاسخ ارائه شده نیز بزرگتر خواهد بود. اگر چه هر سر خوکچه هندی حساس شده را می‌توان تا سه نوبت مجزا برای انجام Potency test بکار برد اما

توپرکولین متناسب با حجم مایع تزریق شده می‌باشد (به عنوان مثال واکنش حاصل از تزریق محلول حاوی $2 \text{ mg} / 0.02\%$ توپرکولین PPD در $1/100$ سانتیمتر مکعب محلول، کمتر از واکنش حاصل از تزریق محلول حاوی $2 \text{ mg} / 0.02\%$ توپرکولین PPD در $2/100$ سانتیمتر مکعب محلول، می‌باشد). لذا باید توجه نمود که ابعاد برآمدگی حاصل از تزریق توپرکولین‌های مختلف یکسان و یک اندازه باشد. در طول دوره آزمایش ضروری است که خوکچه‌های هندی در محل مناسبی از نظر درجه حرارت نگهداری شوند و نیز جیره غذائی آنها متناسب باشد.

نتایج بدست آمده از این تحقیق بانتهای بدست آمده از تحقیق مشابهی که در سال ۱۳۷۶ بر روی دوازده سری محلول توپرکولین تولید شده طی همان سال و بر روی

گراف شماره ۱- آزمایش توپرکولین PPD در خوکچه هندی حساس شده



پنج سر خوکچه هندی حساس شده صورت گرفت، همخوانی و مشابهت دارد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از راهنمایی‌ها و کمکهای جناب آقای دکتر هادی هدایتی رئیس دپارتمان تهیه توپرکولین و مالین

استفاده از حیوانی که قبلاً تحت تزریق قرار نگرفته باشد ارجحیت دارد. در هر خوکچه می‌توان تا دوازده تزریق رابه صورت همزمان انجام داد ولی انجام تزریقات بیشتر سبب می‌گردد که قطر واکنش‌ها در محل تزریقات کاهش یابد.

چون قطر واکنش حاصل از یک مقدار مشخص

بحث

خوکچه هندی یکی از ارزشمندترین حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده در لابراتوارهای تولیدکننده توپرکولین در جهان می‌باشد. نقش این حیوان در تولید و استانداردسازی توپرکولین و نیز در انجام برخی مراحل تشخیصی عارضه سل بسیار حائز اهمیت می‌باشد. پیش

England. The preparation of Weybridge tuberculins.

6- O.I.E., Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccine, 1996.

7- Requirements for Tuberculins (requirements for biological substances no. 16, 1968. Offprint from World Health Organization.

* خلاصه اطلاعات و نتایج بدست آمده از انجام این تحقیق به قرار زیر می باشد. در این تحقیق که روی پنج سر خوکچه هندی حساس شده صورت گرفت میانگین واکنش حاصل از تزریق برای دوازده سری توبرکولین

- 1- Brute
- 2- Hcsm = Heat concentrated synthetic medium
- 3- Placebo

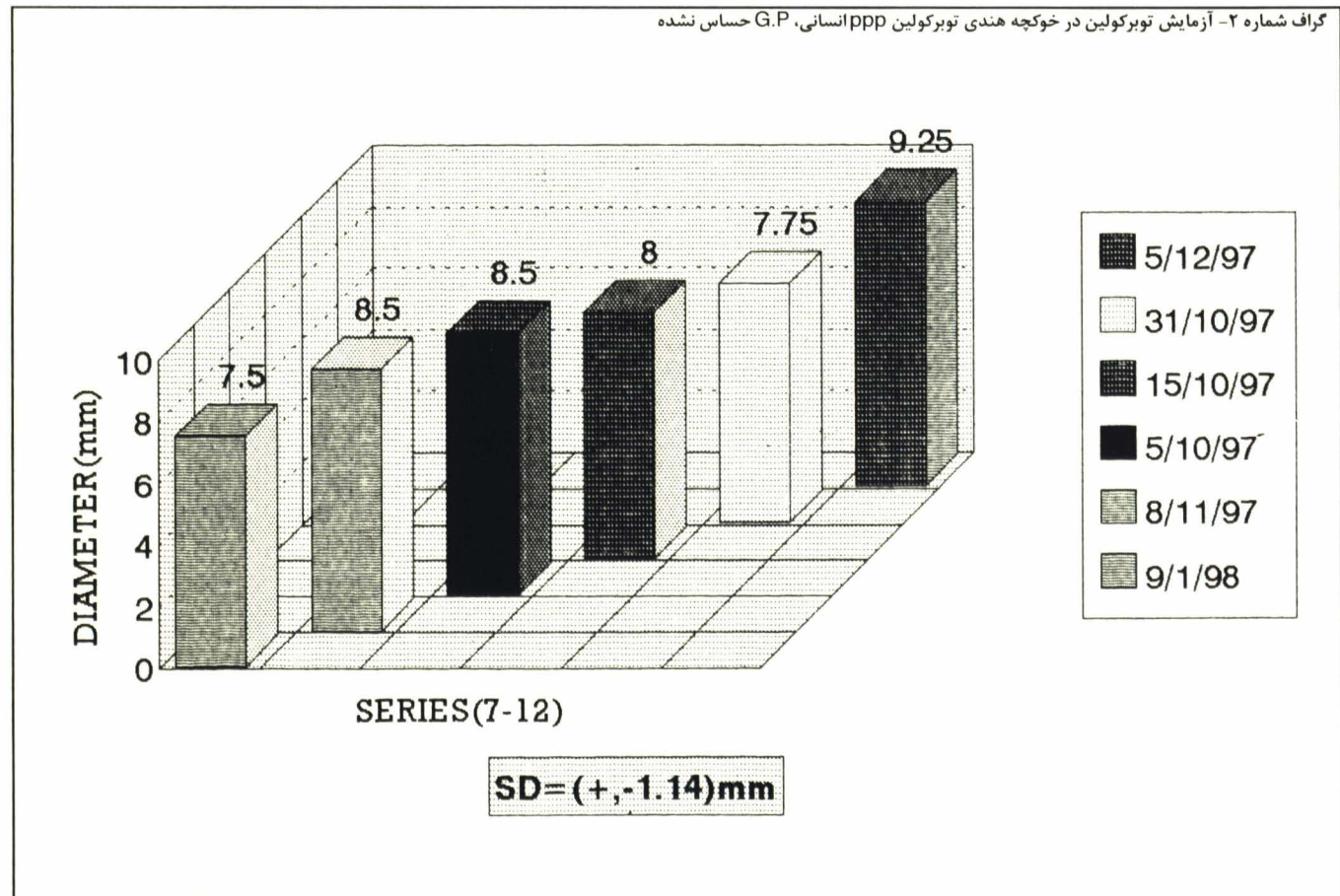
منابع مورد استفاده

- 1- British Pharmacopoeia, 1993.
- 2- Dobbler R., et al., 1977. Standardization of a PPD preparation in guinea- pigs and in man. journal of Biol. Standardization 5.187-195
- 3- Mackie & McCartney, 1987. Practical

جدول ۳- مشخصات دوازده سری توبرکولین مورد آزمایش

مدت نگهداری (روز)	تاریخ انقضای مصرف	سری توبرکولین	ردیف
۲۹۷	22.7.97	۱	۱
۲۳۱	26.9.97	۲	۲
۲۲۲	5.10.97	۳	۳
۲۱۲	15.10.97	۴	۴
۱۹۶	31.10.97	۵	۵
۱۸۹	7.11.97	۶	۶
۱۸۸	8.11.97	۷	۷
۱۶۱	5.12.97	۸	۸
126	9.1.98	۹	۹
۱۱۶	16.1.98	۱۰	۱۰
۹۸	6.2.98	۱۱	۱۱
۶۸	6.3.98	۱۲	۱۲

گراف شماره ۲- آزمایش توبرکولین در خوکچه هندی توبرکولین PPP انسانی، G.P حساس نشده



معادل $9/27 \pm 1/14$ MM بدست آمده که در جدول شماره ۳ طول مدت زمان گذشته از تولید توبرکولین های مذکور برحسب روز ذکر شده است.

Medical Microbiology. longman Group UK limited.

4- Ministry of Agriculture. fisheries and food. Weybridge, Surrey, England. Method of assay tuberculin in guinea- pigs.

5- Ministry of Agriculture, fisheries and food central Veterinary laboratory, Weybridge,

و آقای دکتر اخوی زادگان و نیز همکاری سایر پرسنل این بخش از جمله آقایان دکتر صدیقی، مهندس نیکبین و مهندس زالی و آقایان بذریور، هوشمند، کاظمی، غلامی چپردار، طالبی، هوشور، آرمیده و تیرازه در انجام این تحقیق قدردانی می گردد.

پاورقی ها