AF ۳۱۶

نگرشی بر سیر تکاملی تولید واکسن دیفتری در مؤسسه رازی

● دکتر مرتضی مهین‌پور
● دکتر سعید آل‌آقا
● دکتر عبدالرضا موحدی
● دکتر رضا ایزدپناه
اعضاء هیأت علمی مؤسسه تحقیقاتی رازی

چکیده

تولید واکسن دیفتری و تأمین ابزار مبارزه با این بیماری مهلک از سالها قبل از وظائف مؤسسه رازی بوده است و این مؤسسه با همت علاقمندان و پژوهشگران متعهد خود تولید این واکسن و مبارزه با این بیماری را با همه کمبودها و مشکلات و با وسائل ابتدائی از زمان جنگ دوم جهانی شروع کرد. ابتدا با تولید سرم ضد دیفتری برای درمان بیماری و بعد تولید واکسن برای پیشگیری از بیماری و در طول سالیان دراز توانسته این بیماری را تحت کنترل درآورد. این موفقیت در طول زمان با کوشش و پشتکار و تحقیق پژوهشگران این مؤسسه و استفاده از پیشرفتهای علمی ممالک دنیا و بالابردن سطح تولید و بهبود کیفیت واکسن و تطبیق آن با استانداردهای جهانی بوده است. در اینجا یادآوری این نکته لازم است که در تمام مراحل و مقاطع مختلف افرادی دست‌اندرکار بوده‌اند که هر یک سهمی بسزا به عهده داشته‌اند ولی در بین تمام آنها نام جناب آقای دکتر میرشمسی که از بنیان‌گذاران تولید سرمها و واکسنهای مصرف پزشکی در ایران بوده و می‌باشند فراموش نخواهد شد.

مقدمه

بیماری دیفتری یا خناق در ایران همانند سایر نقاط جهان یکی از بیماریهای مهلک و شایع در بین کودکان کمتر از ۱۵ سال بوده است گرچه آمار دقیقی از تلفات این بیماری در سالهای قبل از جنگ دوم جهانی نداریم ولی آنچه مسلم است تلفات این بیماری رقم بالائی را داشته است. مبارزه با این بیماری در ایران با شروع تولید سرم ضددیفتری در سال ۱۳۲۰ در مؤسسه رازی آغاز می‌شود و این اولین قدم مقابله با این بیماری است. ولی مبارزه جدی از سال ۱۳۳۲ با شروع مایه‌کوبی عمومی علیه این بیماری آغاز می‌شود. باز هم کنترل بیماری و مهار کردن مستلزم زمان و فرصت بیشتری بود و مهمتر از همه، شناخت مردم و استقبال از واکسیناسیون بود که می‌توانست کارساز باشد.

در دهه سالهای ۴۰ تا ۵۰ نیز هنوز شیوع بیماری ادامه داشت و بر طبق آمارهای موجود در مؤسسه رازی سالیانه بیش از ۸۰ تا یکصد هزار آمپول سرم ضددیفتری در مؤسسه رازی ساخته و برای درمان تحویل می‌شد در حالیکه تولید واکسن و توزیع آن نیز ادامه داشت.

بررسی ایمنی کودکان در سطح کشور در مقابل بیماری دیفتری و کزاز که با همکاری مؤسسه رازی و وزارت بهداری انجام شد تحرک بسیار خوبی در واکسیناسیون و همچنین استقبال مردم از واکسن پدید آورد (۶ و ۷) سپس طرح گسترش ایمن سازی یا EPI در سالهای بعد از انقلاب توسط وزارت بهداشت و درمان بسیار مؤثر و کارساز بود بطوریکه در سالهای اخیر گزارشی از این بیماری مشاهده نمی‌شود. برای نمونه در سال گذشته که این بیماری در کشور همسایه ما آذربایجان شایع شد و تلفات هم داشت در مرزهای همجوار کشور ما حتی یک مورد هم گزارش نشد و این امر نمایانگر آن است که از پوشش ایمنی بسیار خوبی در کشور برخوردار بوده‌ایم.

تولید واکسن بروش کلاسیک در مؤسسه رازی

مواد و روشهای تولید

مایه ضد دیفتری (توکسوئید یا اناتوکسین) از زهری که بوسیله باکتری در محیط غذائی مناسب ترشح می‌شود تهیه می‌گردد. از ابتدای کشف باکتری دیفتری و تهیه واکسن، مطالعات زیادی در زمینه تولید قویترین زهر بعمل آمده و این موفقیت در درجه اول مرهون انتخاب باکتری زهرزای مناسب و در درجه دوم انتخاب محیط کشت مناسب برای ترشح زهر است.

۱- هر باکتری دیفتری که از گلوی بیماری جدا شود برای تهیه زهر مناسب نیست و بهمین جهت است که بیش از ۸۰ سال است که از سویه P.W.8 که در آمریکا ویلیام و پارک از گلوی دختر بیماری جدا نمودند در تمام آزمایشگاههای دنیا برای تولید زهر دیفتری مورد استفاده می‌باشد.

باکتری دیفتری در محیط غذائی مایع مولر (۳) که کلیه نیازهای حیاتی این باسیل را تأمین کند در شرائط هوازی کشت داده و در حرارت مناسب در گرمای ۳۳ تا ۳۴ درجه سانتیگراد مدت پنج تا شش روز نگهداری می‌شود و با رشد کامل باکتری و تشکیل غشاء در سطح محیط مایع باکتری به ترشح زهر ادامه می‌دهد. پس از این مدت ظروف کشت را تخلیه و پیکره باکتری را از مایع بوسیله صافی جدا نموده و مایع شفاف حاصله که محتوی زهرابه کورینه باکتریوم دیفتری است با اضافه کردن فرمل و قرار دادن در گرمخانه تبدیل به نازهر یا توکسوئید خواهد شد.

زهرابه دست آمده از کشت باکتری بسیار سمی است بطوریکه مقدار $\frac{1}{10000}$ میلی لیتر آن قادر است یک خوکچه هندی ۲۵۰ گرمی را در مدت ۹۶ ساعت تلف کند در صورتیکه همین زهرا به پس از تبدیل شدن به توکسوئید و حذف سمیت، مقدار ۵ میلی‌لیتر آن برای خوکچه هندی باید کاملاً بی‌ضرر باشد در حالیکه قدرت ایمنی سنجی آن محفوظ مانده است (۴).

۲- محیط کشت: از ابتدای شروع تهیه واکسن مطالعات فراوانی توسط محققین و پژوهشگران در کشورهای مختلف برای انتخاب محیط کشت مناسب انجام شده است. در مؤسسه رازی نیز بنوبه خود تحقیقات وسیعی برای انتخاب محیط مناسب انجام گرفته و پیوسته در تکامل کیفیت آن کوشش گردیده است.

مهمترین عامل در فرمول محیط کشت اساس پروتئین آن است که بایستی بوسیله هضم آنزیمی یا هیدرولیز اسیدی پروتئین طبیعی به اسیدهای آمینه مورد نیاز این باسیل تبدیل گردد.

در ابتدای کار در مؤسسه رازی از محیطهای گوشتی مختلف استفاده شده است مانند محیط لگرو (Legrou) که از هضم پپسین گوشت گوساله حاصل می‌شود یا محیط مارتن (Martin) که از هضم معده خوک و اضافه کردن عصاره گوشت تهیه می‌شد. ولی آخرین روشی که در مؤسسه رازی برای تهیه محیط کشت متداول بوده روشی است که توسط دکتر هولت در انستیتوی رایت فلمینگ انگلستان تهیه شده وتوسط جناب آقای دکتر میرشمسی به مؤسسه رازی منتقل شد و با راهنمائی خود ایشان سالها است در مؤسسه رازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳).

در این روش از کازئین شیر که در تجارت بنامهای گوناگون عرضه می‌شود استفاده شده و بوسیله هضم اسیدی در مجاورت اسید کلریدریک به مجموع اسیدهای آمینه لازم برای رشد میکروب تبدیل می‌شود و پس از تصفیه، هضم و رنگ‌گیری و دفع آهن و مواد اضافی آن، با افزودن ویتامینها و املاح لازم به شکل محیط مایع برای رشد باکتری دیفتری آماده می‌نمایند (۵). معمولاً با هر ۵ کیلوگرم کازئین خشک می‌توان حدود چهارصد لیتر محیط برای کشت تهیه نمود. سپس محیط را در جعبه‌های رو تقسیم و بمدت نیم ساعت در حرارت ۱۱۰ درجه سانتیگراد استریل می‌نمایند و پس از سرد شدن از بذر باکتری دیفتری که ۲۴ ساعت قبل در همین محیط تهیه شده است در

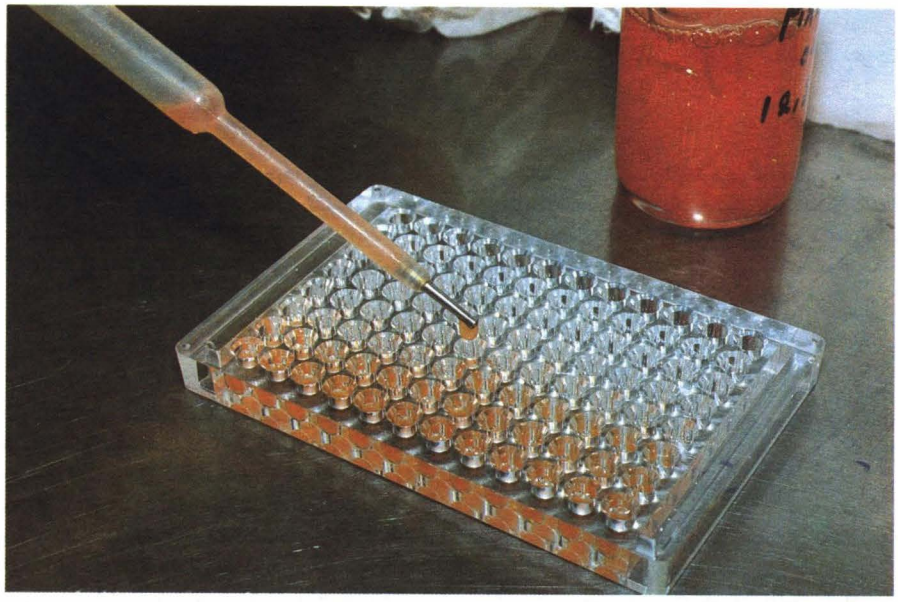
جدول شماره ۱- برداشت بروش قدیمی

شماره	عیار فلوکولان	M.L.D	حجم در واحد کشت
۱۸۰۷	۱۱۰	۱/۷۰۰۰	۱۵۰ml
۱۸۱۳	۱۰۰	۱/۷۰۰۰	۱۵۰ml
۱۸۱۶	۱۰۰	۱/۸۰۰۰	۱۵۰ml
۱۸۱۸	۱۲۵	۱/۸۰۰۰	۱۵۰ml
۱۸۲۲	۹۵	۱/۶۰۰۰	۱۵۰ml

اطاق مخصوص کشت بهر جعبه ۰/۵ میلی‌لیتر اضافه می‌نمایند و مدت ۶ روز جعبه‌ها را در گرمای ۳۳ تا ۳۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌کنند. مجموعه باکتری بصورت پرده همچنان که در گلوی بیمار تولید می‌گردد در سطح مایع تشکیل می‌شود و زهری بسیار قوی ترشح می‌کند که در عیار سنجی In vitro دارای ۱۰۰ تا ۱۲۰ واحد فلوکولان در هر میلی‌لیتر است و در روی حیوان زنده (In vitro) مقدار $\frac{1}{10000}$ میلی‌لیتر (۴) آن قادر است یک خوکچه هندی ۲۵۰ گرمی را در مدت ۹۶ ساعت تلف کند (M.L.D) و این زهرابه پس از اضافه کردن فرمل و قرار دادن در گرمخانه تبدیل به نازهر یا توکسوئید می‌شود که پس از تصفیه و تغلیظ بصورت پادگن مؤثر در تهیه واکسن دیفتری مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مؤسسه رازی سالها است که بدین طریق توانسته است با تولید این واکسن به موفقیتهای بزرگ در پیشگیری از این بیماری دست یابد و سالیانه بیش از ۲۰ میلیون دز واکسن بصورت سه‌گانه همراه با کزاز و سیاه سرفه و یا دوگانه همراه با کزاز تحویل وزارت بهداشت و درمان نماید.

ولی افزایش نیاز کشور و مطرح شدن صدور واکسن و همگامی با سایر کشورهای پیشرفته ایجاب می‌نمود که طریقه مشروحه فوق بروش صنعتی و تولید در فرمانتور تغییر داده شود.



تولید با فرمانتور

از سالها قبل مؤسسه رازی در فکر تغییر روش تولید توکسوئید دیفتری و مدرنیزه کردن آن همگام با سایر کشورهای پیشرفته جهان و بکارگیری تکنولوژی جدید بوده است. بنابراین اقدام به خرید چند دستگاه فرمانتور برای تولید واکسنهای دیفتری و کزاز شد.

مواد و روش برای تهیه توکسوئید در فرمانتور

برای تهیه توکسین دیفتری در فرمانتور از محیط کشت یا فرمول لینگود استفاده می‌شود (۸). بدین ترتیب که برای تهیه هر لیتر محیط ۱۵۰ گرم گوشت بدون چربی گوساله را چرخ کرده و در مجاورت آنزیم پاپائین و در بن ماری ۵۰ درجه سانتیگراد در ۷ مرحله نیم ساعته هضم می‌نمایند و این شیرابه پس از آهن‌گیری و حذف مواد زائد حاوی آمینواسیدهای لازم برای رشد باکتری می‌باشد که اساس ماده پروتئینی محیط کشت است. مواد تشکیل دهنده دیگر عبارت است از اسید لاکتیک، قند مالتوز، املاح و ویتامینهای لازم است که طبق فرمول تهیه و اضافه می‌شود و این محیط پس از عبور دادن از روی کاغذ صافی سترون وارد مخزن فرمانتور می‌گردد و یک بار دیگر در فرمانتور سترون می‌شود و پس از ۲۴ ساعت که اطمینان کامل از عدم آلودگی حاصل شد بذر آماده‌شده به آن تزریق می‌شود.

جدول شماره ۲- برداشت در فرمانتور

شماره	عیار فلوکولان	M.L.D	حجم در واحد کشت
۶	۲۷۰	۱/۹۰۰۰	۳۰ لیتر
۷	۲۵۰	۱/۱۰۰۰۰	۳۰ لیتر
۹	۲۸۰	۱/۱۲۰۰۰	۳۰ لیتر
۱۸	۳۵۰	۱/۱۲۰۰۰	۳۰ لیتر
۲۸	۳۶۰	۱/۱۵۰۰۰	۳۰ لیتر

سویه باکتری

سویه باکتری مورد استفاده در فرمانتور بنام CN 2000 است که اصالت آن از سویه P.W.8 بوده و برای رشد در فرمانتور عادت داده شده است. برای آماده کردن بذر، آمپول لیوفیلیزه در محیط کشت جامد لوفلر کشت داده می‌شود و پس از ۲۴ ساعت از پرگنه‌های تشکیل شده برداشت و روی محیط لینگود در فلاکنهای ۲۰۰ میلی‌لیتر انتقال داده می‌شود و این بذر مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۳ تا ۳۴ درجه و در حال تکان خوردن دواری رشد می‌کند و پس از ۲۴ ساعت از بذر آماده شده آزمایش سترونی و خلوص انجام می‌شود و سپس به مخزن فرمانتور تزریق می‌شود.

مدت کشت در فرمانتور ۷۲ ساعت است و در مقایسه با روش اولیه که برداشت کشت در جعبه‌های رو انجام می‌شد، این روش بازدهی بسیار بالائی را دارد زیرا در زمان ۷۲ ساعت مقدار ۳۵۰ لیتر توکسین با عیار ۲۵۰ واحد فلوکولان حاصل می‌شود، در حالیکه در روش قبل حداکثر مقدار ۱۵۰ لیتر در مدت یک هفته با عیار ۱۲۰ واحد فلوکولان برداشت می‌شود و این روشی است که امروزه در تمام کشورهای اروپائی تولید کننده واکسن متداول و معمول است و مؤسسه رازی نیز باین موفقیت دست یافته است و از اول سال ۷۳ که فرمانتورهای دیفتری نصب و راه‌اندازی شده تاکنون ۲۵ شماره توکسین آزمایشی در فرمانتورهای سی لیتر کشت و برداشت شده که در جداول ۱ و ۲ مشخصات آنها و مقایسه با روش قبل به نظر می‌رسد.

منابع مورد استفاده

۱) آل‌آقا، سعید مهین‌پور، مرتضی نظری، فتحعلی. ۱۳۵۷، بررسی ایمنی بر ضددیفتری و کزاز در شهر تهران. مجله دانشکده پزشکی تهران. صفحه ۱۷۴

۲) میرشمسی، حسین. کلیاتی درباره پیشگیری و درمان با واکسن و سرم. ۱۳۶۸. انتشارات دانشگاه تهران.

3) Holt LB.,1950, Developments in diphtheria prophylaxis, PP: 1-12.

4) Manual of details of tests required on final vaccines usual in the W.H.O., E.P.I 1981, P.23-73.

5) Manufacturing and testing procedures for diphtheria, 1974, Razi Institute Publication, P. 1-5

6) Nazari F., Mirchamsy H., Ale-Agha S., Mahinpour M., 1977, A model for developing countries of mass serological survey of children vaccinated against diphteria and tetanus. Arch Inst Razi 29:3-10

7) Nazari F., Ale-Agha S., Mahinpour M., Mirchamsy H; 1973, Mass immunity against diphtheria and tetanus in some urban and rural areas in Iran. proc symposium on combined vaccines. The Yugoslavi Academy of Sciences and Art-Zagreb. P. 69-74

8) Van Hemert I.R.Paul et al., 1985, Instruction for the preparation of bacterial & viral vaccines.

9) W.H.O Manual for production and control of vaccines diphtheria toxoid BLG/UNDP/77.1 Rev.I.p.9