AF ۴۷۹

تهیه واکسن جدید ضدگوشك (اوریون) با استفاده از سویه محلی در سلول دیپلوئید انسان

اشاره:

مقالهٔ حاضر حاصل تحقیق محققین مؤسسه رازی بنامهای ع. ساسانی، ح. میرشمسی، ع. شفیعی، پ. اهورائی، ج. رضوی، م. ر. غلامی، ا. محمدی، ا. عزّی، م. رحمانی، ج. فاتح و ت. پراوندی می‌باشد که به زبان انگلیسی در شماره ۱۹ نشریه علمی **Biologicals** *در سال ۱۹۹۱ به چاپ رسیده و توسط محقق اول بفارسی ترجمه و جهت چاپ در این نشریه ارائه گردیده است.*

خلاصه:

واکسن زنده تخفیف حدت یافته جدید گوشك در کشت سلول دیپلوئید انسان تهیه شده است. سویه S-12 این ویروس از یك دختر بچه ده ساله با نشانه‌ها و علائم عمومی گوشك و تأئید تشخیص بوسیله یك پزشك اطفال، جدا گردیده و ویروسی منحصراً در کشت سلول کلیه میمون سبز جدا شده، بدون اینکه در مایع آلانتوئید جوجه (تخم‌مرغ جنین‌دار SPF) و یا در فیبروپلاست جوجه کشت و عبور داده شده باشد. تخفیف حدت این ویروس وحشی با کشت و عبور مکرر در سلول دیپلوئید انسان (MRC-5) انجام گرفت. پس از تخفیف حدت نقصان اندازه پلاکها با مقایسه با سویه حاد مشاهده شده ویروس تخفیف حدت یافته عاری از عوامل عفونی و اتفاقی بوده و با سرم اختصاصی گوشك خلوص آن به ثبوت رسیده و با تزریق آن به حیوانات آزمایشگاهی و میمون بی‌ضرری آن ثابت گردید. برای آزمایش ایمنی‌زائی سویه S-12 در انسان به بیست نفر داوطلب بالغ فاقد پادتن ضدگوشك و همچنین به سی کودك ۱ الی ۵ ساله که قبلاً گوشك نگرفته بودند و فاقد پادتن اختصاصی بودند بمقدار یك دزواکسن به هرکدام تزریق و نتایج آن ارزیابی گردید. در ۹۵٪ افراد مزبور پادتن اختصاصی ضد گوشك ظاهر گردید. مزیت این واکسن جدید، عاری بودن از پروتئینهای طیور (تخم‌مرغ) بوده، بنابراین برای افرادی که آلرژی نسبت به این نوع پروتئین دارند، و یا آنهائی که قبلاً با واکسنهای ویروسی تهیه شده روی فیبروپلاست جوجه تزریق شده و احتمالاً ممکن است در تزریق بعدی بعلت ایجاد حساسیت واکنش آلرژیك نشان دهند کلاً بی‌ضرر میباشد.

مقدمه:

گوشك بیماری حاد ویروسی بوده که گاهی همراه با یك پیچیدگی می‌باشد. آلودگی با ویروس گوشك ممکن است به شکلهای مختلف بهم ریختگی سیستم اعصاب مرکزی اتفاق بیفتد. نتیجه درگیری اعصاب مغز با ویروس گوشك ممکن است منجر به کری و سنگینی گوش و نهایتاً مرگ گردد. ضمناً این عفونت ممکن است باعث نفریت کشنده، ناراحتی لوزالمعده، ناراحتی غدد پاروتید و ناراحتی های بیضه‌ها گردد. جهت پیشگیری بیماری در بچه‌ها، پس از اولین سال تولد واکسیناسیون پیشنهاد و توصیه میگردد.

در کشور ما واکسن این بیماری از زمانی که در جهان ببازار عرضه شده گهگاه مورد استفاده قرار گرفته و از سال ۱۹۸۸ تا بحال واکسن گوشك در موسسه رازی با استفاده از سویه تخفیف حدت یافته زنده Hoshino L 32 که موسسه کیتازاتوژ اپن هدیه نموده تهیه و تولید میشود که این واکسن جزو طرح EPI نبوده ولی در سطح وسیعی در کشور توسط بخش خصوصی مورد استفاده قرار میگیرد.

مصرف این واکسن از طریق پزشکان اطفال افزایش چشمگیری نشان میدهد. چنانچه تابحال بیش از یکصدهزار دزواکسن بفرم تك‌دزی یا مخلوط با واکسنهای سرخك و سرخجه (MMR) ساخته و مورد استفاده قرار گرفته است. واکنشهای حاصله پس از تزریق آنتی‌ژن گوشك بصورت ملایم گزارش شده است، حدود یك درصد تورم پاروتید آشکار و زودگذر گزارش شده است. هدف ما از اجرای این طرح جدا کردن ویروس گوشك و تخفیف حدت دادن آن روی سلول دیپلوئید انسان (MRC-5) و در نهایت تهیه واکسن توأم همراه سرخك و سرخجه (MMR) روی سلول دیپلوئید انسان بدون استفاده از سلول جنین جوجه میباشد.

مواد و روش کار

جدا کردن ویروس:

ویروس از بزاق یك دختر بچه ده ساله (بنام طاهره ساسانی) با تب بالا و تورم دو طرفه پاروتید بدون علائم بالینی دیگر جدا گردید. در بامداد چهارمین روز پس از حمله بیماری و قبل از صرف صبحانه با شستن و غرغره کردن دهان و گلو با یك محلول قندی نمونه‌گیری بعمل آمد. محلول یاد شده داخل یك ظرف استریل جمع آوری شد بعلاوه یك حجم از آلبومین سرم گوساله ۱۰٪، یك سانتیمتر مکعب از پنی سیلین (هزار واحد) و استرپتومایسین (پانصد گاما) افزوده گردید. نمونه در کنار یخ به آزمایشگاه حمل و در ۷۰- درجه سانتیگراد قرار گرفت. در موقع کار نمونه یخ زده را بحالت مایع درآورده بمدت ده دقیقه در ۱۰۰۰ g میان گریز گردید. به هرکدام از ۸ لوله کشت سلول میمون سبز بمقدار ۰/۱ میلی لیتر بصورت مستقیم و استریل از مایع رو تزریق گردیده در گرمخانه ۳۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از گذشت ۶ روز در یکی از لوله‌ها آثار بیماریزائی سلول (C.P.E) مشاهده شد. و پس از ۷ روز بقیه لوله‌ها نیز در آزمایش همادسرپشن با گلبول قرمز خوکچه هندی و میمون مثبت بودند. مایع داخل لوله‌ای که حاوی آثار مرضی بود، دوبار در سلول میمون سبز عبور داده شد. تمام لوله‌ها ۵ الی ۶ روز پس از تزریق و قرار گرفتن در گرمخانه ۳۵ درجه سانتیگراد دارای آثار مرضی مشخص و واضحی بودند. تمام محتوی پاساژ سوم روی سلول میمون سبز با یکدیگر مخلوط و جهت بررسی و تعیین هویت در ۷۰- درجه سانتیگراد قرار گرفت.

سویه‌های ویروسی:

سویه‌های زیر که بوسیله دکتر Sasaki از واحد ویروس شناسی موسسه کیتازاتوژ اپن جدا شده و جهت رفرانس سویه وحشی گوشك در NIH ژاپن مورد استفاده قرار گرفتند و بوسیله آن موسسه تحقیقاتی در اختیار موسسه رازی گذاشته شد.

۱- سویه Sasazaki ویروس اوریون، سومین پاساژ روی سلول vero عیار CCID 50/ml $10^{6.9}$.

۲- سویه Mano ویروس اوریون، پنجمین پاساژ روی سلول Vero عیار CCID 50/ml $10^{7.4}$

۳- سویه Sano ویروس اوریون، چهارمین پاساژ روی سلول Vero عیار CCID 50/ml $10^{7.2}$

هرکدام این ویروسهای فوق فقط یك مرتبه روی سلول Vero پاساژ داده شد. عیار ویروسهای ذخیره بترتیب 10^{7} ، $10^{7.2}$ و $10^{7.4}$ بودند.

کشت سلول:

سلول اولیه کلیه میمون سبز از سلولهای ذخیره یخ زده آماده گردید. سلولها همگی از نظر عدم آلودگی به عفونت‌های تصادفی و اتفاقی بوسیله عبور روی سلولهای RK-13,HDC, FL; BSC-1 و سلول اولیه کلیه خوکچه هندی مورد رسیدگی و بررسی قرار گرفتند. جهت کشت سلولهای فوق از محیط Earle's حاوی ۵ درصد لاکتالبومین هیدرولیزه، ۸ درصد سرم گوساله حرارت دیده، یکصد میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین و یکصد میکروگرم کانامایسین در میلی لیتر استفاده گردید. جهت رشد ویروس از محیط BME با ۲ درصد سرم گوساله حرارت دیده و آنتی بیوتیك، به عنوان محیط نگهدارنده سلول، مورد استفاده قرار گرفت. برای تخفیف حدت دادن ویروس در سلول دیپلوئید انسان (MRC-5) بطور مکرر عبور داده شد. محیط کشت MEM حاوی ۴ درصد سرم گوساله جوان حرارت داده شده، استفاده گردید، محیط کشت با همان فرمول و زمانیکه آثار مرضی سلول مشاهده گردید با محیط بدون سرم تعویض شده و جهت عیارسنجی ویروس روی سلول Vero یك تیره ثابت از سلول کلیه میمون سبز تکثیر شده طبق روشی که بوسیله خانم دکتر ساساکی (Dr. K. SASAKI) شرح داده شده است انجام گردید. (18)

پلاك کردن:

برای پلاك کردن سویه‌های وحشی و تخفیف حدت یافته ویروس گوشك، سویه S-12 روی سلول Vero، وحشی ۳۵ و در مورد ویروس تخفیف حدت یافته ۳۲ درجه سانتیگراد بوده است. خواندن نتیجه در روز دهم بوده و نتایج نهائی سنجش عیار بوسیله آزمایش همادسورپشن با استفاده از گلبول قرمز خوکچه هندی در همان روز انجام گرفت.

هامستر:

هامسترهای Syrian چند قلوزا (آبستن) از قسمت پرورش حیوانات آزمایشگاهی موسسه فراهم شد. بچّه هامسترهای تازه متولد شده (۲۴ ساعته) بمقدار ۰/۱ میلی لیتر برای هرکدام از ویروسهای ذخیره مختلف بصورت داخل صفاقی تزریق شدند. چند قلوهای زایمان شده بوسیله یك مادر برای هرویروس بطور اتفاقی انتخاب شده بودند، بچّه هامسترها در روزهای تعیین شده طبق جدول شماره ۵ بیهوش و کشته شدند. سپس خون آنها جداگانه جمع آوری گردید و مغز آنها را بطور استریل خارج نموده و پس از سلایه کردن به نسبت ۵۰ درصد در محیط رشد در منهای ۷۰ درجه سانتیگراد تا موقع کار قرار گرفت. در هنگام کار نمونه‌ها را از حالت یخ بحالت مایع در آورده و پس از میان گریز در ۵۰۰ g بمدت ۱۵ دقیقه، ۰/۱ میلی لیتر از مایع روئی در هرلوله از ۴ لوله کشت سلول Vero جهت جداکردن از محیط نیمه جامد کتیرا (Overlay) که قبلاً گزارش شده است (15) استفاده شده است.

جدول ۱- تاریخچهٔ عادت‌پذیری و تخفیف حدت سویهٔ S-12 ویروس گوشك در کشت سلولی

Type of cell	Passage level	Temperature of incubation (°C)	Incubation period (days)	Virus titer $CCID_{50}$ log_{10}/ml
GMKC	1	35	6	ND
	2		5	3·75
	3		5	4·60
	1		6	4·50
	2		5	4·50
	3		7	3·75
	4		7	4·12
	5		6	4·87
HDC (MRC-5)	6		5	5·20
	7		4	4·75
	8		5	5·12
	9		5	5·20
	10		5	5·30
	11	32	5	6·62
	12		6	6·50
	13		5	6·0
	14		5	6·25

ND, not done.

عیارسنجی ویروس:

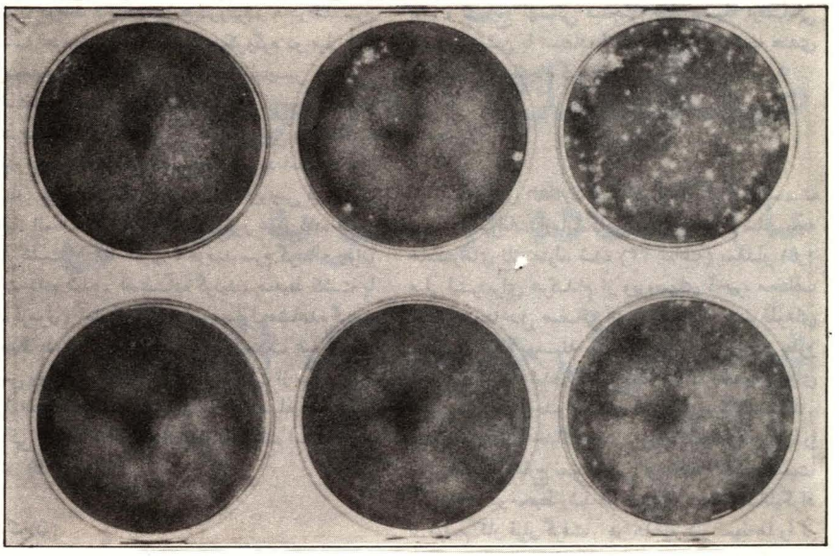
سنجش عیار ویروس با رقتهای ده برابر بصورت متوالی در روی سلول Vero به ازاء هررقت ۴ لوله بکار برده شد. مقدار تزریق ۰/۱ میلی لیتر از هررقت در هرلوله می باشد. حرارت گرمخانه برای کشت ویروس ویروس تزریق شد. لوله‌ها در گرمخانه ۳۵ درجه سانتیگراد جهت مشاهده آثار مرضی سلول بمدت دو هفته مورد بازدید قرار گرفت. وجود ویروس داخل سلولی در این بررسی مورد مطالعه قرار نگرفت.

تزریق به میمون:

میمونهای Cynomolgus به وزن ۲-۳ کیلوگرم سالم، از شرق دور مورد استفاده قرار گرفتند و میمونها

نتایج

شکل ۱ـ ردیف بالا : پلاکهای ویروس وحشی گوشک، سویهٔ ساسانی در کشت سلولی **Vero** پس از ۶ روز در ۳۵ درجه سانتیگراد. اندازه پلاك ۳-۲ میلی‌متر. ردیف پائین : پلاکهای ویروس تخفیف حدت یافتهٔ گوشک، سویه ساسانی در کشت سلولی **Vero** پس از ۶ روز در ۳۵ درجه سانتیگراد. متوسط اندازه پلاك ۱ میلی‌متر.



عاری از پادتن ضد گوشك جهت این مطالعه انتخاب شدند.

آنتی‌سرم گوشك :

دو آنتی سرم هیپرایمن برضد سویه Mano وحشی و سویه واکسن Hoshino L-32 در خرگوش تهیه گردید. سرم انسان ضدگوشك ازطرف‌دکتر Parkman از NIH امریکا دریافت شد. همچنین سرم بیمار تازه بهبود یافته که ویروس از او جدا شده بود یکماه پس از بهبودی از عفونت دریافت گردید.

سرولژی :

ازآزمایش توقف هماگلوتیناسیون (Hemagglutination Inhibition) طبق روش Al-breacht & Kitch (۱) استفاده شد. در این آزمایش از Kaolin 25% و گلبول قرمز خوکچه هندی جهت حذف آگلوتینین‌های غیراختصاصی و همچنین بعنوان شاخص بکار گرفته شد آزمایش خنثی‌سازی در کشت سلول Vero انجام‌گرفت. بمقدار 100-200 CCID 50/ml ویروس در هرآزمایش به رقتهای سرم افزوده شد. قرائت عیار پادتن ده روز پس از قراردادن لوله‌ها در گرمخانه ۳۵ درجه سانتیگراد انجام گرفت. بالاترین رقتی که ظهور آثار مرضی سلولی در آن مشاهده گردیده بعنوان عیار آنتی بادی در نظر گرفته شد.

«تهیه واکسن تخفیف حدت یافته‌شده گوشك سویه S-12»

از چهاردهمین پاساژ سویه S-12 روی سلول دیپلوئید انسانی بعنوان سویه نهائی جهت تولید یك لو (Lot) واکسن ضدگوشك استفاده گردید. سویه ویروس یاد شده همزمان با تعلیق سلول دیپلوئید به نسبت مناسب مخلوط و در ۵۰ عدد جعبه‌رو (Roux bottles) تقسیم گردید. کشتها بمدت ۴۸ ساعت تا زمانی که بصورت یك لایه کامل از سلول درآید، در گرمخانه ۳۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس به گرمخانه ۳۲ درجه سانتیگراد منتقل گردیدند. محیط رشد برای آنها MEM+4%C.S بود. پس از ۶ روز یعنی زمانیکه آثار مرضی در قسمتهای مختلف سطح سلول شروع شد. محیط رشد کاملاً حذف و بجای آن محیط بدون سرم با همان ترکیب افزوده گردید. پس از پیشرفت سیتوپاتوژنی، ویروس برداشت شده و در دور ۳۰۰۰ بمدت ۳۰ دقیقه جهت حذف سلولها، میان گریز شد. نمونه‌هائی جهت عیارسنجی و سایر کنترلهای مورد لزوم برداشت گردید. تعلیق ویروس برداشت شده با مواد نگهدارنده مخلوط و خشك گردید (Freez drying). پس از حصول اطمینان از استریل بودن و عدم بیماریزائی برای حیوانات آزمایشگاهی، واکسن آماده مصرف گردید. مقدار تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر که حاوی 10^5 CCID 50/ml ویروس در هردزمی باشد.

مایه‌ها و مایه کوبی :

بیست نفر داوطلب بالای ۲۰ سال سن، فاقد پادتن HI ضدگوشك با یك دز واکسن بصورت زیر جلدی و همچنین سی کودك سالم در حدود ۱ الی ۵ سال سن بدون سابقه آلودگی قبلی، با یك دز واکسن بصورت زیرجلدی تزریق شدند. مطالعه ایمنی‌زائی سرمی افراد بوسیله نمونه‌گیری با لوله موئینه از خون شخص بلافاصله قبل از تلقیح واکسن و ۵ الی ۶ هفته پس از آن انجام گرفت.

صفات اختصاصی و حیاتی سویه تخفیف حدت یافته S-12 ویروس گوشك :

۱ـ عادت دادن سویه S-12 به سلول کلیه میمون سبز و سلول دیپلوئید انسان :

بطوریکه تابلوی شماره ۱ نشان میدهد کشت ویروس بطور مستقیم روی سلول کلیه میمون با عیار بالائی در این سلول رشد کرده بود. مدت زمان کشت ۵ روز در گرمخانه ۳۵ درجه سانتیگراد بود سپس ویروس مزبور در سلول دیپلوئید انسان (MRC-5) کشت داده شد. پس از چند کشت متوالی در سلول دیپلوئید در همان شرایط، عیار ویروس به 10^{-5}/ml رسید. هرچند عیار ویروس بین پاساژهای ۶ الی ۱۰ در سلول دیپلوئید ثابت باقی ماند، تزاید عیار بمقدار Log 1 یا بیشتر موقعی که کشت ویروس با استفاده از آخرین رقت (End Point) در کشت‌های متوالی ۱۱ الی ۱۴ رسیده بدست آمد.

۲ـ تأئید هویت و تشخیص ویروس :

• آزمایشهای مقایسه‌ای سرونوترالیزاسیون ویروس جدا شده و ویروس رفرانس سویه Sano با استفاده از سه آنتی سرم اختصاصی گوشك و سرم بیمار تازه بهبود یافته (که ویروس از او جدا شده) که در تابلوی شماره ۲ ارائه شده اختصاصی بودن و خلوص ویروس را ثابت مینماید، سویه جدا شده بنام وحشی گوشك Sasani-12 (S-12) نامگذاری گردید.

۳ـ تست مارکر :

اختلاف مابین اندازه پلاکهای ویروس گوشك سویه S-12 ، وحشی و تخفیف حدت یافته در سلول یك لایه Vero در نگاره شماره ۱ شرح داده شده است. قطر پلاکهای ویروس وحشی (S-12) حدود ۲ الی ۳ میلیمتر رشد کرده بود، اندازه پلاکهای ویروس تخفیف حدت یافته همان سویه حدود یك میلیمتر می باشد. این نتیجه بانتایجی که در گزارش‌های : .Flanngan et al(8) در مورد سویه Jeryl lynn و Yamanishi et al(23) در مورد سویه Urabe-9 و Glucket et al(9) در مورد سویه Ru-bini ، آمده است، مطابقت دارد.

آزمایش روی میمون :

سویه‌های وحشی Sasazaki و S-12 و دو سویه تخفیف حدت یافته Hoshino و S-12 در این مطالعه بکار رفته. عیار این چهار ویروس تقریباً به حدود 10^{-5} ml/ تنظیم شد و از هرتعلیق ویروسی یك میلی‌لیتر از راه عضلانی به دو میمون تزریق شد. ضمناً به دو میمون نیز مقدار یك میلی‌لیتر در ۵ نقطه در پاروتید چپ (در هرنقطه ۰/۲ میلی‌لیتر) و به یك سرمیمون بصورت داخل نخاع شوکی تزریق شدند میمونهای شاهد (تزریق نشده) بطور هم قفس با میمونهای تزریق

شده نگهداری و بمدت ۲۱ روز زیرنظر قرار گرفتند. در طول این مدت، میمونها علائم بالینی یا فلجی و ضعف نشان ندادند. فقط تورم غدد پاروتید زودگذر نشان دادند پس از ۲۱ روز میمونها خونگیری و بعد ربیهوش و ذبح و جهت نمونه‌برداری هیستوپاتولوژی آماده گردیدند. نتایج در تابلوی شماره ۳ و ۴ خلاصه شده است.

تورم مختصر غدد پاروتید یکطرفه درسه‌سرازچهارسر میمون تزریق شده با ویروس وحشی سویه S–12 و یکی از چهار میمون تزریق شده با سویه وحشی Sasazaki بطریقه داخل عضلانی یا پاروتیدی مشاهده گردید. علائم بالینی در هیچیك از میمونهای تزریق شده بدون توجه به نوع سویه یا روش تزریق مشاهده نگردید. میمون شماره ۲۹ کمی پس از تزریق سویه Sasazski بروش بین نخاع زیربیهوشی مرد. در آزمایش هیستوپاتولوژی سیستم عصبی مرکزی و غدد پاروتید، میمونهای تزریق شده بطریقه داخل نخاعی با هرکدام از سویه وحشی یا تخفیف حدت یافته S–12 هیچ اثر پاتولوژی مشاهده نگردید. برعکس هردو میمون تزریق شده با سویه وحشی Sasazaki از راه عضلانی و میمون تزریق شده در غدد پاروتید و یك میمون تزریق شده بروش عضلانی با سویه وحشی S–12 ضایعه مختصر و ناچیزی همراه با تورم مویرگها و جمع شدن خونابه و گویچه‌های خونی در اطراف آنها مشاهده گردید. درباره میمونهای شاهد، شماره ۳۲ و ۳۴، که در مجاورت میمونهای تزریق شده با ویروس وحشی S–12 بروش عضلانی یا پاروتید در یك قفس نگهداری میشدند تزاید عیار پادتن در سرم آنها تشخیص داده شد. عیار پادتن سرم میمونهای تزریق شده قبل و ۲۱ روز پس از تزریق در تابلوی شماره ۳ و ۴ ارائه گردیده است.

تزریق به نوزاد هامستر(یك روزه)

دو سویه وحشی و تخفیف حدت یافته S–12 و سویه واکسن Hoshino L–32 و سویه وحشی Sasazaki بطریق داخل صفاقی به نوزاد هامستر تزریق شدند. هرتعلیق ویروس به ۴ تا بچه هامستر از یك مادر تلقیح گردیدند، نتایجی که بطور خلاصه در تابلوی شماره ۵ آمده است، نشان میدهد که هامسترها هیچگونه علائم بالینی در طول مدت مشاهدات نداشته‌اند. هامسترهای تزریق شده با سویه ویروس وحشی Sasazaki یا S–12 در روزهای تعیین شده کشته و مغز آنها خارج گردیدند.

طبق تابلوی شماره ۵ تغییرات هیستوپاتولوژی در مغز آنها مشاهده نگردید. گرچه ویروس گوشك ۲۱ روز پس از تلقیح سویه وحشی Sasazaki از مغز جدا شده بودند. هردو سویه تخفیف حدت یافته S–12 و Hoshino L–32 تغییرات هیستوپاتولوژیکی مختصر در مغز هامسترها بترتیب ۱۲ و ۱۶ روز پس از تلقیح داشته‌اند. تورم مویرگها یا سلولهای خونی مختصر و در بعضی مناطق سلولهای تك هسته‌ای در اطراف مویرگهای متورم شده مشاهده شد. و این سلولهای خونی در اثر نفوذ خونابه و سلولهای مربوط به آن از جدار مویرگهای متورم شده‌درقسمتهائی ازمغز مشاهده گردید. ویروس گوشك از سوسپانسیون مغز چهار روز پس از تلقیح از راه داخل صفاقی سویه Hoshino L–32 جدا گردید. عیار پادتن سرم هامسترها ۷ الی ۸ هفته پس از تلقیح از راه داخل صفاقی سویه وحشی و تخفیف حدت یافته بترتیب 2 log 6 و 2 log 5 بوده است.

کنترل کیفی واکسن:

تعیین ایمنی‌زائی و بی‌ضرری واکسن برطبق مقررات سازمان جهانی بهداشت واکسن زنده تخفیف حدت یافته گوشك ارزیابی شد. و از نظر باکتری شناسی و تزریق به حیوانات کوچك آزمایشگاهی و تزریق به میمون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از این بررسیها ایمنی‌زائی و بی‌ضرری آن را تائید نموده است.

بررسی ایمنی‌زائی واکسن تخفیف حدت یافته سویه جدید (S–12) :

تزریق یك دزواکسن خشك شده ضدگوشك شامل یکصدهزار ذره ویروس در داوطلبین باعث واکنش موضعی یا عمومی و تب نشد. در ۳۰ کودك فاقد آنتی بادی تزریق یك دز واکسن MMR حاوی ۲۰/۰۰۰ ذره ویروس سرخك (سویه AIK)، یکصد هزار ذره ویروس تخفیف حدت یافته گوشك (سویه S–12) و ۲۰۰۰ ذره ویروس سرخجه (سویه Takahashi) که کلاً در سلول دیپلوئید انسان (MRC–5) تهیه شده بودند، هیچگونه واکنش موضعی یا عمومی، نظیر تورم پاروتید، گزارش نشده است. ۴ الی ۵ هفته پس از تزریق ۹۳٪ افراد تزریق شده با واکسن MMR فوق‌الذکر واجد آنتی بادی ضد اوریون بودند. عیار پادتن (سرونوترالیزاسیون) برای گوشك بین ۱/۳۲ الی ۱/۶۴ بوده است.

جدول ۲ـ تعیین هویت ویروس جدا شده

Antigens	Immune sera: Wild mano strain (rabbit)	Hoshino strain L-32 (rabbit)	Mumps antiserum Dr Parkman (human)	Convalescent serum patient S-12
Wild mumps Sano strain	16X	32X	128X	512X
Isolated virus S-12 strain GMK/3, MRC-5/4	64X	64X	512X	2048X

بحث

سویه واکسن تخفیف حدت یافته ویروس گوشك طی چهاردهه گذشته بیشتر بطریقه کشت ویروس در حفره آلانتوئید جنین جوجه بوده است. Enders et al.(5) گزارش میکنند که ویروس تنها با یك کشت در تخم‌مرغ واکنش کلینیکی ایجاد نمی‌کند و حال آنکه Buynak et al.(2) مشاهده کردند که تخفیف حدت ویروس گوشك پس از ۱۷ کشت متوالی در فیبروبلاست سلول جوجه انجام گرفته است. اما برطبق گزارش Hoshi et al.(10) تخفیف حدت دادن ویروس بعد از ۱۲ بارکشت در حفره کوریوآلانتوئید کامل شد. و Yamanzshi et al. (11) معتقدند که تخفیف حدت فقط با ۴ بار عبور در حفره جنین جوجه اتفاق می افتد Sasaki et al. (19) قادر شدند یك ویروس اوریون دیگری که آنرا سویه Hoshino L–32 نامیدند. پس از ۴ بار عبور روی سلول فیبروبلاست جوجه در ۳۶ درجه سانتیگراد جدا نمایند. سویه Leningrad 13(L–3) در کشت سلول کلیه خوکچه هندی و کشت سلول جنین بلدرچین ژاپنی جدا و تخفیف حدت یافته (20) . و بالاخره به فیبروبلاست جوجه عادت داده شد. محصول سومین کشت بعنوان Master Seed (بذراصلی) جهت ساختن واکسن معین شد. بنابراین معلوم میشود که بیشتر سویه‌های واکسن ضد گوشك تقریباً در اصل از آلوده نمودن جنین جوجه یا مایع آلانتوئیك تخم‌مرغ جنین‌دار SPF و تولیدات واکسن در سلول فیبروبلاست میباشد.

این واکسنها بطور کامل بی‌خطر و ایمنی‌زا بوده اما ممکن است ایجاد حساسیت در مورد کودکانیکه به پروتئین تخم‌مرغ حساسیت دارند نماید زیرا این تولیدات حاوی آثاری از پروتئین تخم‌مرغ جوجه میباشند. کوششهائی برای تولید واکسن گوشك در سلولهای انسانی بوسیله بعضی از محققین گزارش شده است. Ikic et al. (13) برای جدا ساختن ویروس گوشك سه کشت متوالی در حفره آمنیون تخم‌مرغ جنین‌دار ۸ روزه و سپس به سلول دیپلوئید انسان (WI–38) عادت دارند. Gluck et al.(15) سویه ویروس وحشی گوشك (Ru-bini) را با ۱۵ کشت متوالی در ۳۵ درجه سانتیگراد در سلول دیپلوئید انسان (MRC–5) تخفیف حدت دادند.

• ایمنی‌زائی و بی‌خطر بودن این واکسن در اطفال مستعد نشان داده شده است.

اما در این بررسی، ویروس مستقیماً روی سلول کلیه میمون جدا شده و بوسیله کشت متوالی در سلول دیپلوئید انسان دنبال گشت. چنانکه در تابلوی شماره ۲ نشان میدهد عیار ویروس پس از ۱۰ بار کشت در سلول دیپلوئید انسان تقریباً بمیزان ده برابر فزونی یافته است. در این مرحله کلن کردن ویروس (خالص کردن) با رقت انتهائی در ۳۲ درجه سانتیگراد انجام گرفت.

جدول ۳- مقایسه واکنشهای درمانگاهی، تغییرات هیستو پاتولوژیکی و پاسخهای پادتنی میمونهای تلقیح شده با دو سویه وحشی ویروس گوشک

Virus	Monkey No.	Inoculation route	Clinical reactions: Swelling of parotid glands	Clinical reactions: Nervous system disorders	Histopathological finding: Parotid glands	Histopathological finding: Central nervous	Antibody response: HI titer log_2: Pre-inoc. (0 day)	Antibody response: HI titer log_2: Post-inoc. (21 days)
Wild S-12	18	i.m.	—	—	—	—	<2	4
GMKC-3/	19		*	—	‡	—	<2	3
HDC-2	20	i. parot.	*	—	‡	—	<2	5
	21		*	—	‡	—	<2	5
	22	i. cereb.	—	—	—	—	<2	5
	23		*	—	—	—	<2	6
	24	i. cistern. cereb.	—	—	—	—	<2	4
Sasazaki	25	i.m.	—	—	‡	—	<2	5
strain	26		—	—	‡	—	<2	5
Vero/4	27	i. parot.	*	—	‡	—	<2	6
	28		—	—	‡	—	<2	4
	29	i. cereb.	†				<2	—
	30		—	—	—	—	<2	4
	31	i. cistern. cereb.	—	—	—	—	<2	3
Controls	32		—	—	—	—	<2	3
	33	—	—	—	—	—	<2	<2
	34		—	—	—	—	<2	4

* تورم خفیف و ناپایدار غدد بناگوشی یك طرف † میمونها پس از تلقیح در زیربیهوشی تلف شدند

‡ جراحات متوسط تا ضعیف با پرخونی مویرگها و PVC حداقل

جدول ۴- مقایسهٔ واکنشهای درمانگاهی، تغییرات هیستوپاتولوژیکی و پاسخهای پادتنی میمونهای تلقیح شده با دو سویهٔ تخفیف حدت یافته ویروس گوشك

Virus	Monkey No.	Inoculation route	Clinical reactions: Swelling of parotid glands	Clinical reactions: Nervous system disorders	Histopathological finding: Parotid glands	Histopathological finding: Central nervous	Antibody response: HI titer log_2: Pre-inoc. (0 day)	Antibody response: HI titer log_2: Post-inoc. (21 days)
Attenuated	1	i.m.	—	—	—	—	<2	3
S-12 strain	2		—	—	—	—	<2	3
(GMK-3/	3	i. parct.	—	—	—	—	<2	5
HDC-14)	4		—	—	—	—	<2	5
	5	i. cereb.	—	—	—	—	<2	3
	7	i. cistern. cereb.	—	—	—	—	<2	6
Hoshino	8	i.m.	—	—	—	—	<2	3
L-32 strain	9		—	—	—	—	<2	4
	10	i. parot.	—	—	—	—	<2	5
	11		—	—	—	—	<2	4
	12	i. cereb.	—	—	—	—	<2	3
	13		—	—	—	—	<2	4
	14	i. cistern. cereb.	—	—	—	—	<2	6
Controls	15		—	—	—	—	<2	<2
	16	—	—	—	—	—	<2	<2
	17		—	—	—	—	<2	<2

جدول ۵- یافته‌های بافت‌شناسی در سیستم عصبی مرکزی یك هامستر یك روزه که به آنها سویه‌های ویرولان یا تخفیف حدت یافتهٔ ویروس گوشك به طریق داخل صفاقی تزریق شده بود.

Hamster no.	Virus strain	Virus titer $CCID_{50}$ log_{10}/ml	Inoculum per hamster	Clinical symptoms	Sacrificed on day... post inoculation	Histo-pathology (brain)	Virus isolation (brain)	Antibody response HI titer log_2
1	Wild				12	—	†	ND
2	Sasazaki	6·0	0·1 ml		16	—	ND	ND
3	Vero/4			—	21	—	ND	ND
4					52	—	—	6·0
5					7	—	—	ND
6	S-12GMK/3	6·0	0·1 ml		12	—	—	ND
7	MRC-5/2			—	16	—	—	ND
8					47	—	—	5·0
9	Attenuated				4	ND	†	ND
10	Hoshino	5·0	0·1 ml	—	16	*	ND	ND
11	L-32				44	—	—	6·0
12					50	—	—	ND
13					7	—	—	ND
14	S-12GMK/3	5·0	0·1 ml	—	12	*	—	ND
15	HDC/14				16	—	—	ND
16					47	—	—	5·0

* مویرگها در نواحی پراکنده انباشته از سلولهای خونی بوده لمفوسیت‌ها، غالباً تك هسته‌ای به فضای دور عروقی نفوذ کرده بودند. سلولهای آماسی به نواحی کانونی دور لپتومنژها نفوذ کرده بودند. ND. انجام نشد. † ویروس در سلولهای Vero جدا گردید.

قابل ذکر است که همه کشتهای انجام شده با افزودن ویروس و سلول دیپلوئید انسان بصورت تعلیق انجام گرفته است تجربه نشان داده است که افزودن ویروس در کشت سلول یك لایه سلول دیپلوئید (نه بشکل تعلیق) بمقدار یك Log 10 یا بیشتر از عیار نهائی میکاهد. سویه تخفیف حدت یافته S-12 را میتوان از سویه وحشی مربوط به آن با مقایسه اندازه پلاکهای تولید شده تمیز داد. بنابراین پس از ۶ روز در گرمخانه ۳۵ درجه سانتیگراد زیر یك لایه نیمه جامد اندازه قطر پلاکهای سویه وحشی S-12 ۲ الی ۳ میلیمتر در حالیکه قطر پلاکهای سویه تخفیف حدت یافته Sasazaki تقریباً یك میلیمتر بوده است.

نروپاتوژنز ویروس با تزریق داخل صفاقی به نوزاد هامستر یك روزه مورد مطالعه قرار گرفت. سویه وحشی S-12 هم مثل سویه وحشی Sasazaki هیچگونه آثار پاتولوژیکی ۷ الی ۵۲ روز پس از تزریق آشکار نساخت، هرچند ویروس اوریون از مخلوط و امتزاج مغزهای یك گروه بچه هامستر که با هم متولد شده‌اند ۱۲ روز پس از تزریق ویروس وحشی Sasazaki جدا گردید. هردو سویه تخفیف حدت یافته S-12 و Hoshino L 32 باعث تغییر هیستوپاتولوژیکی، ۱۲ الی ۱۶ روز پس از تزریق در یك گروه از چهار گروه هامسترها شدند. ویروس آزاد از مغز یك گروه که با سویه Hoshino L 32 تزریق شده بود جدا گردید اما عیارسنجی انجام نگرفت. ویروس گوشك داخل سلول مغز موش تازه متولد شده یکصد روز پس از آلودگی اولیه بوسیله Hayashi et al.(11) گزارش شده است زمانیکه سویه وحشی S-12 یا سویه وحشی Sasazaki به روشهای داخل عضلانی، داخل نخاعی در میمونها تزریق شده بودند، ورم مختصر و زودگذر غدد پاروتید و ایجاد ضایعات در کانون سلولهای لنفاوی و ادم مشاهده گردید. هیچگونه تغییری در سلول مغز میمونها بدون توجه به نحوه تزریق ویروس مشاهده نگردید. در همه میمونها بالا رفتن عیار پادتن ملاحظه گردید همچنین بالا رفتن عیار پادتن در دو میمون که در کنار و همسایگی میمونهای تزریق شده با ویروس وحشی قرار داشت تشخیص داده شد.

علائم بالینی و هیستوپاتولوژیکی میمونهای تزریق شده با هرکدام از سویه‌های تخفیف حدت یافته S-12 یا Hoshino بروش تزریقهای عضلانی، داخل غدد پاروتید، داخل مغزی، داخل نخاعی کاملاً با مشاهدات قبلی اختلاف داشتند. ورم غدد پاروتید و تغییر هیستوپاتولوژیك مشاهده نگردید. میزان پادتن HI در سرم همه میمونها بجز میمونهائی که در کنار میمونهای تزریق شده بعنوان کنترل بودند بالا رفت نتایج آزمایش روی میمون و همچنین خصوصیات اختصاصی مارکر ویروس گوشك، کاهش اندازه پلاك در اثر کشتهای متوالی در سلول دیپلوئید، همه حاکی از آنست که ویروس S-12 بدست آمده با مقایسه با ویروس اصلی مربوطه از حدت کمتری برخوردار است. نکته مهم مربوطه در این مطالعه، حدت بالاتر سویه واکسن انتخابی از سویه وحشی اولیه برای نوزاد هامستر می‌باشد نظیر همین موضوع در مورد سوش

Jeryl lynn توسط Kilham et al(14) مشاهده شده است.

برای توسعه ایجاد پادتن خنثی کننده و متوقف کننده هماگلوتنین و HI در سرم، تصفیه ویروس از بسیاری ناخالصی ها لازم بود. هرچند مؤلفین در مغز و کلیه، ویروسهای داخل سلولی را بعد از ایجاد عفونت یافته‌اند. آیا این یافته برای سویه‌های واکسن اوریون قابل اجرا و عملی می باشد؟ که واکنش ژنتیکی و پاتوژنتیکی را از دست بدهد و خواه ناخواه ما بتوانیم آثار پاتوژنتیکی آلودگی اوریون در انسان و در نوزاد هامستر را مقایسه کنیم. با توجه باین نکته جالب است که موارد بسیاری مننژیت در اثر واکسیناسیون گوشك اخیراً در کانادا، ژاپن، اروپا که با سویهJeryl lynn و Urabe در واکسن سه گانه، ترکیب شده با سرخك و سرخجه بکار رفته، گزارش شده است. (22,7,4,12,19,2) این دو سویه بطور وسیعی در نقاط مختلف جهان جهت ایمن‌سازی کودکان مورد استفاده قرار گرفته است. سویه Hoshino L-32 که در مقیاس بیش از ۷۰۰/۰۰۰ دز در ژاپن مورد استفاده قرار گرفت سالم و بدون موارد و عوارض مننژیت در اثر واکسیناسیون گزارش شده است. (17) همین سویه از سال ۱۹۸۸ در ایران جهت ایمن‌سازی بیش از یکصدهزار کودك ۱ الی ۵ ساله با اقدام احتیاطی بصورت MMR یا بصورت واکسن ضدگوشك به تنهائی از لحاظ ایمن‌زائی و سالم بودن امتحان و مورد استفاده قرار گرفت. در این وسعت مطالعه و آزمایش، این سویه واکسن، جدید ضداوریون، سالم بودن و بدون اثرات و واکنشهای ژنتیکی، و کاملاً ایمن‌زا برای کودکان و بالغین تشخیص داده شد.

در این مرحله براساس مشاهدات ما، در میمون و حیوانات آزمایشگاهی، برنامه تزریق به انسان قرار داده شد. تا سالم بودن سویه S-12 ویروس گوشك تخفیف حدت یافته روی HDC مورد تأئید قرار گیرد. ما علاقمندیم اظهار نظر و عقیده دکتر J.Steigman را در این مورد گزارش نمائیم که گفت یك عامل ایمن‌زا فقط احتیاج دارد نشان بدهد که سالم‌تر از بازتاب بیماری مربوط به آن در طبیعت باشد. (21)

نتایج ارزنده‌ای که با تحقق این طرح بدست آمده است عبارت است از:

۱- جهت یکنواختی روند تولید واکسنهای ویروس انسانی مصرف پزشکی، فقط سلول دیپلوئید انسانی مورد مصرف قرار گرفته است.

۲- واکسن اوریون که در حال حاضر تولید و عرضه میگردد سویه Hoshino ژاپنی است که منحصراً به تخم‌مرغ جنین‌دار SPF عادت داشته که با باتمام رسیدن این طرح سویه S-12 جایگزین خواهد شد.

۳- سویه ژاپنی اهدائی منحصر به تولید و تحقیق در داخل کشور می باشد و حق دخل و تصرف و غیره را نداریم. اما در مورد سویه جدید محلی، محدودیت نخواهیم داشت.

۴- افرادی که حساسیت به تخم‌مرغ دارند موقع مصرف این واکسن جدید مشکلی نخواهند داشت.

۵- از وارد کردن تخم‌مرغ جنین‌دار SPF که هزینه گزاف را بهمراه دارد بی نیاز میشویم.

۶- از خروج ارز بخاطر تهیه تخم‌مرغ جلوگیری میشود.

۷- این کار قدم مثبتی در مسیر خودکفائی می باشد.

و بطور خلاصه با تحقق این طرح یك نتیجه کار علمی، تحقیقاتی و اقتصادی بدست آمده است.

منابع مورد استفاده:

...1. Albrecht, P. and Kiutch, M. Sensitive hemagglutination- Inhibition on Test for mumps antibody. J. Clin. Microb. 1981,13: 870-876.

...2. Buynak, E. B. and Hilleman, M.R. Live attenuated mumps virus vaccine development. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1966; 123: 768-775.

...3. Beck, M., Welsz-Malecek, R.,Mesko-Prejac, M.,Radman, V., Juzbasic., Rajninger, Mlholic, M.,Prislin-Musklic,M., Dobrovska,-Sourek, V., Smerdel, S.and Stainer, D.W.J.Biol. Stand, 1989; 17:85-90.

...4. Cizman, M., Mozetic, M.et al. Aseptic meninjitis after vaccination against measles and mumps. pediatr. Infect. Dis. 1989,8: 302-308.

...5. Enders, J.F., levens, J.H., stockes, Jr. J., Maris, E.P.and Berenberg, Attenuation of virulence with retention of antigenicity of mumps virus after passage in enbryonated egg. J. Immun. 1946.,54: 283-291.

6. Furesz, J.and Hokin, J.C-Cdwr,. 1987, 13: 156-157. Comment.

...7. Foresy, T., Mawn, J.A. Yates, P.J., Bently, M.L. and Minor, P.D. Differentiation of vaccine and wild mumps viruses using the polymerase chain reaction and dideoxinucleotide. J.Gen. Virol. 1990, 71: 987-990.

...8. Flanagan, T.D. and Barron, A.L. Plaque Formation by mumps virus and Inhibition by antiserum. Appl. Microbiol. 1970/19: 360-366.

...9. Gluck, R.,Hoskins, J.M., Wegman, A., Just, M.and Germanier, R.Rubini, a new live attenuated mumps vaccine virus strain for human diploid cells. Develop. Biol. Stand. 1986;65:29-35.

...10. Hosai, H., yamanishi, k.,Ueda, S.,Minekawa, Y., Ojino, T.,Suzuki, N., Takahashi, M.and Okuno, Y,studies on live attenuted mumps virus vaccine, 1- Attenuation of mumps virus by serial passage in the chorioallantoic cavity of developing chick embryo and field trials by the inhalalion. Biken J.1970; 13: 121-126.

...11. Hayashi, K., Ross, M.E. and Notkinns, A. L.Persistence of mumps viral antigens in mouse brain. Jap. j.Exp. Med. 1976,46: 197-200.

...12. Hockinj.C. and Furesz, J.Cowr, 1988, 14: 210-211. Comment.

...13. Ikic, D., Smilaj-Jagotic, A., Weisz-Maleck, R. and Beck, M. Isolation of mumps virus and its adaptation to human diploid cells. Proc. Symposium on human diploid cells, Yugoslav Academy of Sciences and Arts. Zagreb, 1970, 181-185.

...14. Kilham, L. and Margolis, G. Induction of congenital hydrocephalus in hamesters with attenuated and natural strains of mumps virus. J.Infect. Dis. 1975, 132: 462-465.

...15. Mirchamsy, H. and Rapp, F. A new overlay for plaquing animal viruses. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1968,129: 13-17.

...16. Mirchamsy, H. Shafyi, A.Nilforoushan, M.A. Razavi, J., Ashtiani, M.P., Youssofi, I., Sassani, A. and Fateh, G. Comparative eveluation of Two combined Measles-mumps-Rubella vaccine based on AIK and Edmonston- Zagreb strains of measles virus. Kitazato Arch. of Exp. Med. 1991-64. No 2-3.

...17. Makino, S., Sasaki, K., Nakayana, T.Oka, S., Urano, T., Kimura, M., Kawana, R and yamamura, A.M.A new Combined Trivalent live measles (AIK-C Strain), mumps (Hoshino strain) and rubella (Takahashi strain) vaccine. Am. J. Dis. Child. 1990,144: 905-910.

...18. Sasaki, K. Makino, S. and Kasahara, S. Studies on measles virus II Propagation in two established simian renal cell lines and development of a plaque assay. Kitasato Arch. of Exp. Med. 1964, 37: 27-42.

...19. Sasaki, K, Higashihara, M., Inoue, K., Igarashi, Y. and Makino, S. Studies on the development of a live attenuated mumps virus vaccine. The Kitasato Arch. Exp. Med. 1975; 49: 43-52.

...20. Smorodintsev, A.A., Klyachko, N. S., Nasibov, N.M., schikina, E.S. First International conference of vaccines against viral and rickettsial diseases of man. Washington 1967: 305-310.

...21. Steigman, A. J. mumps vaccine. The lancet 1974 Nov. 23: 1276.

...22. Takahashi, M. ono, S., Shimizu, T., Tazawa, M., shinohara, M., Honma, T., Fukazawa. N., Suzuki, M., Todokoro, M, Fujinaga, T. and Kuroumo, T. MMR Vaccine considered as the cause of aseptic meningitis. Jap. Med. J. 1990, 3441: 43-45.

...23. Yamanichi, K. Takahashi, M, Ueda, S., Minekawa, Y., Ogino, T., Suzuki, N.and Okumo.Y. Studies on live mumps virus vaccine. V. Development of a new mumps vaccine «Am 9» by plaque cloning biken J. 1973; 16: 161-166.

...24. Yamanichi, K., Takahashi, M., Kurimura, T., Ueda, S., Minekawa, Y., Ogino, T., Suzuki, N, Baba, K. and Okuno, Y. Biken J. 1970; 13: 157-161.

...25. Who, requirements for mumps vaccine (live) world health org. Tech. Rep. Series No 760,1987: 139-164.

...26. Wollinsky, J.S., Klassen, t. and Baringer, J.R.J. Infect. Dis. 1976, 133: 260- 267.