J. of Nuclear Sci. and Tech.
No. 37, pp. 17-21, 2006

مجله علوم و فنون هسته‌ای
شماره ۳۷، صفحات ۲۱-۱۷، ۱۳۸۵

غيرفعال‌سازي ويروس عامل بيماري تب برفكي در دامها به وسيلة پرتو گاما به منظور تهيه واكسن كشته شده

فرحناز معتمدي‌سده*، اكبر خراساني، سيدكمال‌الدين شفائي، مهدي صالحي‌زاده، هادي فتح‌الهي، كوروش اربابي، فرامرز مجد
مركز تحقيقات كشاورزي و پزشكي هسته‌اي، سازمان انرژي اتمي ايران، صندوق پستي: ٤٩٨-٣١٤٨٥، كرج - ايران

چكيده: در این کار پژوهشی یکی از سوشهای ویروس عامل بیماری تب برفکی FMD type A87/IRN بر روی تیره سلولی پایدار حاصل از کلیه بچه هامستر (BHK21) تکثیر یافته، سپس عیار (تیتر) ویروسی با استفاده از روش TCID50% $10^{7/5}$/ml بدست آمد. پرتودهی ویروس با استفاده از دستگاه گاماسل مدل Issledovapel-PX-30 با نرخ دز ۰/۵۵۱ گری بر ثانیه انجام شد. دزهای مورد استفاده برای پرتودهی: ۵۰، ۴۵، ۴۰، ۳۵، ۳۰، ۲۵، ۲۰، ۱۰، ۰ کیلوگری بودند. پرتودهی هر نمونه ۶ بار تکرار شد. سپس خاصیت عفونت‌زایی و پادژنی ویروس پرتودهی شده و نمونه شاهد که با در نظر گرفتن دما در مدت پرتودهی در شرایط یکسان با نمونه‌های پرتودهی شده بودند به وسیلهٔ روشهای کشت یاخته‌ای و آزمون ثبوت مکمل بررسی شدند. نتایج حاصل نشان داد که این ویروس از دز ۴۰ کیلوگری به بالا خاصیت بیماریزایی خود را کاملاً از دست می‌دهد. در حالیکه خاصیت پادژنی آن تا دزهای ۴۰ و ۴۵ کیلوگری همچنان حفظ می‌شود. با توجه به نتایج حاصل و ترسیم نمودار دز/ پایندگی و حساب کردن فاکتور D_{10}Value، دز بهینه حاصل از پرتو گاما برای غیرفعال‌سازی این ویروس با حفظ خاصیت پادژنی، بین kGy ۴۴-۴۰ تعیین گردید.

واژه‌هاي كليدي: واكسن‌ها، ويروس‌ها، غيرفعال‌سازي، پرتو گاما، تابش‌دهي، دام، بيماري تب برفكي

Gamma Radiation Inactivation of FMD Virus Type A87/IRN in Order to Preparation of Killed Vaccine

F. Motamedi Sedeh*, A. Khorasani, K. Shafaee, M. Salehizadeh, H. Fatolahi, K. Arbabi, F. Majd
Nuclear Research Centre for Agriculture and Medicine, AEOI, P.O. Box: 31485-498, Karaj - Iran

Abstract: In this research FMD virus type A87/IRN was used. The virus was multiplied on a BHK21 cell line. Then, the virus titration was detected by TCID50% (Tissue Culture Infection Dose 50%) method, and it was $10^{7.5}$/ml. The FMD virus was irradiated by gamma ray from ^{60}Co source in-4 till 4°C. The gamma cell, model Issledovapel-PX-30, with the dose rate of 0.551 Gy/sec was applied. Different doses of gamma ray were applied and 6 times were repeated for each dose. Antigenicity and infectivity of the irradiated and control virus samples were studied by Complement Fixation, and Cell Culture methods, respectivly. The dose/survival curve for the FMD virus was drawn, according to the curve and D10 Value factor (Dose of gamma ray that decrease one logarithmic cycle of virus population) was obtained, and the optimum dose for inactivation of FMDV type A87/IRN and the unalteration its antigenicity of 40-44 kGy was obtained.

Keywords: ***Vaccines, Viruses, Inactivation, Gamma Radiation, Irradiation, Livestock, Foot and Mouth Disease***

*email: fmotmedi@nrcam.org

تاريخ دريافت مقاله: ٨٣/٢/١٤ تاريخ پذيرش مقاله: ٨٤/١٠/٤

۱- مقدمه

ویروس عامل بیماری تب برفکی از خانواده پیکورناویریده است. این خانوادهٔ ویروسی دارای پوشه (کاپسید) ۲۰ وجهی و ژنوم RNA تک‌رشته‌ای حس مثبت خطی با اندازه ۸/۵-۷/۵ kbp می‌باشد. تکثیر ویروس در سیتوپلاسم یاخته صورت می‌گیرد، RNA ویریون که بعنوان mRNA عمل می‌کند به یک پلی‌پروتئین ترجمه شده سپس به ۱۱ پروتئین تجزیه می‌شود. عامل بیماری تب برفکی از جنس آفتوویروسها بوده و دارای ۷ نوع ویروسی است که عبارتند از: A,O,C,Asia$_1$,SAT1,SAT2,SAT3 و هر یک از این انواع دارای گونه‌هایی می‌باشد. آفتوویروسها موجب بیماری گونه‌های مختلف حیوانات دارای سم زوج و وحوش می‌شود از جمله: گاو، گوسفند، گاومیش، خوک، بز، لاما، و بطور کلی شدیدترین علائم بیماری در گاو و خوک دیده می‌شوند که شامل: تب، بی‌اشتهائی، ریزش بزاق دهان، اُفت شدید تولید شیر و در خوک اولین علامت، لنگیدن است. ظهور تاول و وزیکول روی زبان و لثه و سم دام ظرف ۲۴ ساعت؛ در خوک ظهور تاول در دهان نسبت به گاو کمتر است، ولی روی پوزه خوک تاولهای بزرگی ظاهر می‌شود [۱ و ۲].

روشهای متداول غیرفعال‌سازی این نوع ویروس به منظور تهیه واکسن عبارتند از: ۱- استفاده از فرمالدئید ۲- بکار بردن آزیریدینها که شامل استیل اتیلن ایمین، اتیلن ایمین و پروپیل ایمین می‌باشند. این دو روش در محصول نهایی باقیمانده‌هایی بجای می‌گذارند که بعضی از آنها سمی بوده و بعضی هم آلرژی‌زا می‌باشند [۱]. در این تحقیق از پرتو گاما برای غیرفعال‌سازی ویروس FMD استفاده شده است که در محصول نهایی باقیمانده بجای نمی‌گذارد.

۲- روش کار

۲-۱ کشت سلول و تکثیر ویروس

ابتدا تیره سلولی پایدار کلیه نوزاد هامستر (BHK21)[۱] در بطریهای مخصوص کشت سلول، بصورت تک لایه در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی کشت داده شد. در این قسمت، از محیط کشت حاوی ۴-۳ ٪ سرم گاوی استفاده شد. گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷-۳۶ $^{\circ}$C بدون حضور CO_2 در pH=۶/۸-۷ می‌باشد. لازم به ذکر است که سرم گاوی بکار رفته در این مرحله با پلی‌اتیلن‌گلیکول ۶۰۰۰ به میزان ۷٪ مدت ۸ تا ۱۰ ساعت بهمزده شد، سپس به مدت یک شب در دمای ۴ $^{\circ}$C رسوب داده شد این کار برای جداسازی پادتن‌های موجود در سرم انجام گرفت، سپس مایع بالایی از صافی ۰/۲ میکرون عبور داده شد. پس از تکثیر سلولهای پیش گفته در فلاسکهای مخصوص، محیط کشت قبلی خارج و محیط جدید ارل حاوی ۰/۵٪ سرم گاوی و ۲ سی‌سی FMDV type A87/IRN[۲] با عیار ویروسی $10^{7/5}$/ml اضافه شد. سپس بطریهای کشت را به گرمخانه ۳۷-۳۶ $^{\circ}$C بدون حضور CO_2 منتقل و بمدت ۱۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. علائم رشد ویروس در یاخته‌ها با اثرهای سیتوپاتوژنیک (CPE)[۳] بر روی یاخته بررسی می‌گردد. که شامل گرد شدن و جدا شدن سلولها از بطریهای کشت می‌باشد. سپس کلیه محتویات بطریهای کشت با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ می‌شدند، تا ذرات سلولی معلق، در ته لوله سانتریفوژ رسوب کرده و تا حدودی از تعلیق (سوسپانسیون) ویروسی جدا گردند. در نهایت، این سوسپانسیون را در ویالهای شیشه‌ای حاوی ۵ سی‌سی ویروس در هر ویال تقسیم و در فریزر ۷۰- $^{\circ}$C تا زمان پرتودهی نگهداری می‌شدند.

۲-۲ تعیین عیار ویروس با استفاده از تست TCID50%

مقدار ویروس در واحد میلی‌لیتر که توان ایجاد CPE را در ۵۰٪ یاخته‌های تلقیح شده دارا باشد «TCID50%»[۴] است که با روش Reed & Meunch تعیین شد. برای انجام دادن این تست از میکروپلیتهای ۹۶ خانه‌ای استریل استفاده شد، به این ترتیب که در هر چاهک میکروپلیت، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی ۲۰-۱۰ هزار سلول BHK21 را همراه با محیط کشت استوکر حاوی ۱۰٪ سرم گاوی افزوده و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ $^{\circ}$C و تشکیل تک لایه سلولی، هر چاهک را با محیط جدید ارل شستشو داده و از رقتهای 10^{-4}-10^{-7} ویروس استفاده نموده بطوری که برای هر رقت ویروسی ۴ چاهک را در نظر گرفته پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت علائم سیتوپاتوژنیک را در چاهکها بررسی و یادداشت نموده سپس با استفاده از روش Reed & Meunch عیار ویروسی حساب شد [۳].

۲-۳ غیرفعال‌سازی ویروس با پرتو گاما

پس از تکثیر و تعیین عیار ویروس، ویالهای حاوی ۵ سانتی‌متر مکعب از این ویروس را که در فریزر ۷۰- $^{\circ}$C در

مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی نگهداری می‌شدند به همراه تعدادی قالبهای پلاستیکی یخ که در همان ۷۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده بودند به مرکز تحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای کرج انتقال داده و با قالبهای یخ، درون دستگاه گاماسل Issledovapel مدل PX-30 با نرخ دز ۰/۵۵۱ گری بر ثانیه و آکتیویته ۳۶۵۲ کوری قرار داده شدند و با دزهای ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ کیلوگری پرتودهی شدند؛ زمانهای پرتودهی با این دزها به ترتیب (دقیقه و ساعت): ۱۲ و ۵، ۲۰ و ۱۰، ۹ و ۱۳، ۲۴ و ۱۸، ۴۲ و ۲۰، ۴۰ و ۲۳، ۲ و ۲۶ بودند؛ همزمان با پرتودهی این نمونه‌ها، تعدادی از این ویالهای ویروسی بعنوان شاهد، فقط برای بررسی اثر تغییرات دما بر عیار ویروسی در محیط آزمایشگاه در کنار همان قالبهای یخ قرار داده شدند. در هر بار آزمایش برای هر دز پرتو گاما دو ویال ویروسی قرار داده می‌شد و کل این آزمایشها ۶ بار تکرار شدند [٤].

٤-۲ بررسي خاصيت عفونت‌زايي و پادزني نمونه‌هاي ويروسي بعد از پرتودهي

نمونه‌های ویروسی پرتودهی شده در دزهای متفاوت، پس از پرتودهی از طریق کشت بر روی سلولهای BHK21 در آزمایشگاه از نظر کیفیت عفونت‌زایی بررسی شدند و آن دسته از نمونه‌هایی که پس از کشت، علائم سیتوپاتوژنیک نشان می‌دادند به وسیلهٔ تست TCID50% نیز تعیین عیار می‌شدند و نمونه‌هایی هم که علائم سیتوپاژنیک نشان نمی‌دادند مجدداً از آنها سه کشت دیگر نیز بر روی سلولهای BHK21 جدید صورت گرفت. برای بررسی خاصیت پادزنی در این تحقیق از تست تثبیت مکمل (CFT)[۵] استفاده شد [٥]. برای انجام این تست چندین عامل مهم وجود دارد که عبارتند از:

- تامپون لوین مایر (تامپون ایزوتونیک)
- پادتن علیه گلبولهای قرمز گوسفند که از خرگوش گرفته شده بود.
- گلبول قرمز خون گوسفند شسته شده با محلول کلرید سدیوم نه در هزار
- سیستم همولیتیک، شامل مخلوطی از گلبول قرمز گوسفندی شسته شده و پادتن آن که مدت نیم ساعت در گرمخانه ۳۷°C قرار داده می‌شود.
- مکمل خون خوکچه هندی
- پادزن مورد آزمایش، که در اینجا FMDV type A87/IRN است.
- پادتن ضد این پادزن

برای مشخص کردن عیار پادزن موردنظر:

- رقتهای ۱/۱، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲ به حجم ۲۵µl از پادزن در یک طشتک کوچک (میکروپلیت) تهیه شد.
- دو واحد از پادتن ضد پادزن مورد آزمایش، با عیار ۱/۱۴۰ به حجم ۲۵µl به آن افزوده شد.
- دو واحد از مکمل تعیین عیار شده در مقابل سیستم همولیتیک به میزان ۲۵µl نیز افزوده، و مخلوط به مدت نیم ساعت در گرمخانه ۳۷°C قرار داده شد.
- اضافه کردن سیستم همولیتیک به مقدار ۵۰µl به مخلوط فوق و قرار دادن آن در گرمخانه ۳۷°C به مدت نیم ساعت

نتایج حاصل که در جدول ۱ مندرجند [۶].

۳- نتایج

شکل ۱ تیرهٔ یاخته‌ای پایدار کلیه نوزاد هامستر را نشان می‌دهد. قسمت الف یاخته‌های سالم کشت داده شده در کف بطریهای کشت سلول و قسمت ب یاخته‌های آلوده به ویروس تب برفکی همراه با علائم سیتوپاتولوژیک می‌باشند.

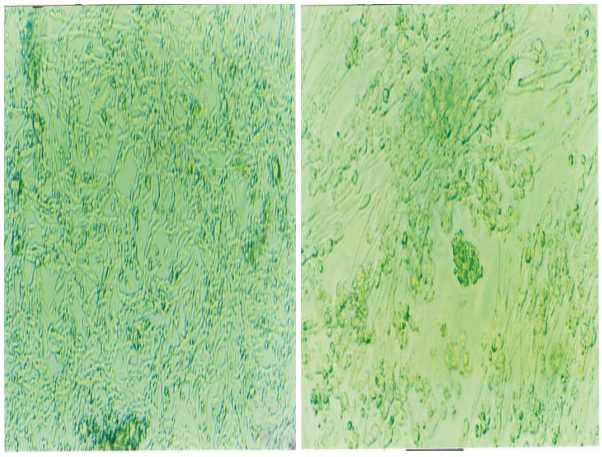
جدول ۱- نتایج تست تثبیت مکمل برای نمونه‌های پرتودهی شده و شاهد.

دز پرتودهي (kGy)	رقتهاي ويروس FMDV type A87/IRN با تيتر $10^{7/5}$/ml					
	۱	۱/۲	۱/۴	۱/۸	۱/۱۶	۱/۳۲
۰	۴+*	۴+	۴+	۳/۵+	Tr	–**
۱۰	۴+	۴+	۴+	۳+	۱+	–
۲۰	۴+	۴+	۴+	۳+	۱/۵+	–
۲۵	۴+	۴+	۴+	۳+	۱+	–
۳۰	۴+	۴+	۴+	۲/۵+	۰/۵+	–
۳۵	۴+	۴+	۴+	۱/۵+	Tr	–
۴۰	۴+	۴+	۴+	۳+	۱+	–
۴۵	۴+	۴+	۴+	۲/۵+	۰/۵+	–
۵۰	۴+	۴+	۲+	۰/۵+	–	–

علامت * : نشان‌دهنده لیز نشدن گلبولی در اثر مکمل، یعنی واکنش ویژه بین پادزن و پادتن بخوبی صورت گرفته است.

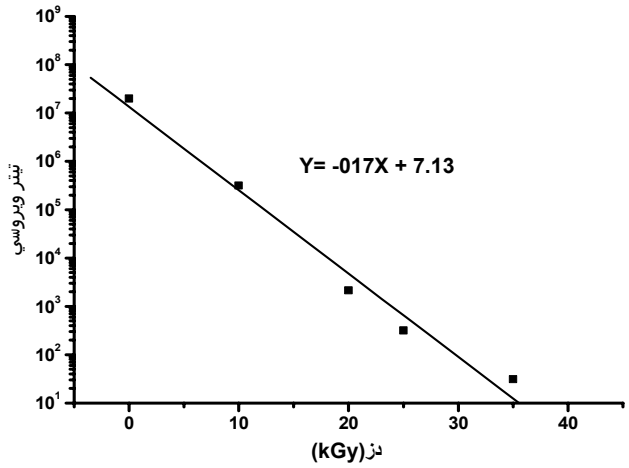
علامت ** : نشان‌دهنده لیز شدن گلبولی در اثر مکمل، یعنی واکنش ویژه بین پادزن و پادتن صورت نگرفته است.

Tr: حالت مابین مثبت و منفی.



(A) (B)

شکل ۱- A: تک‌لایه یاخته‌های BHK21 سالم، B: تک‌لایه یاخته‌های BHK21 آلوده به ویروس تب برفکی.



شکل ۲- نمودار دُز/ پایندگی کاهش عیار ویروسی همراه با افزایش دز پرتودهی.

با توجه به نتایج مندرج در جدول ۲ که عیار ویروسی را در نمونه‌های پرتودهی شده در دزهای متفاوت پرتو گاما نشان می‌دهد و با توجه به معادله شکل ۲، نمودار دز/ پایندگی می‌باشد فاکتور D_{10}Value یعنی دزی از پرتو گاما بر حسب کیلوگری که بتواند جمعیت ویروسی را یک سیکل لگاریتمی کاهش دهد حدود ۵/۳۳-۵/۸۸ kGy می‌باشد؛ همچنین با توجه به عیار ویروسی اولیه که $10^{7/5}$/ml می‌باشد؛ بنابراین برای غیرفعال‌سازی کامل ویروس باید عیار آن۷/۵ سیکل لگاریتمی کاهش یابد، در نتیجه دز بهینه برای این منظور ۴۴-۴۰ kGy حساب شد [٤].

با توجه به جدول ۱ که نتایج تست تثبیت مکمل برای تعیین خاصیت پادژنی نمونه‌های ویروس پرتودهی شده در دزهای متفاوت در آن مندرج است، نشان می‌دهد که پرتودهی با دزهای متفاوت، حتی با دز ۴۵ kGy نمی‌تواند باعث از بین رفتن خاصیت پادژنی ویروس پرتودهی شده گردد [۷].

٤- بحث

غیرفعال‌سازی ویروسها توسط پرتوهای یونساز نخستین بار در سال ۱۹۵۵ توسط Pollard مورد مطالعه قرار گرفت [۸ و ۹]، و در سال ۱۹۶۵ توسط Johnson غیرفعال‌سازی ویروس FMD با این پرتوها بررسی شد [۷]. در سال ۱۹۷۳، T. Frescura و P. Vivoli در ایتالیا بر روی غیرفعال‌سازی ویروس FMD تیپهای O1, O2, O7 و C را بصورت لیوفلیزه به وسیله پرتو گاما مطالعه کردند که از نظر حفظ خاصیت پادژنی ویروسهای لیوفلیزه پرتودهی شده نتایج خوبی بدست آوردند [۷]. همچنین در سال ۱۹۹۰ دکتر J.H. Lombardo و E.E. Smolko از آرژانتین نیز ضمن تحقیق در زمینه تولید رادیوواکسنها اقدام به بررسی خواص ویروس FMD پرتودهی شده با پرتو گاما در شرایط دمای انجماد کردند. نتیجه گزارش آنها این بود که ویروس FMD پرتودهی شده در دمای انجماد می‌تواند خاصیت پادژنی خوبی برای تولید واکسن داشته باشد، علاوه بر این روش غیرفعال‌سازی هزینه کمتری نیز بهمراه دارد [٤].در این تحقیق، چون هدف از غیرفعال‌سازی ویروس FMD

جدول ۲- نتایج عیار ویروس FMDV type A87/IRN در نمونه‌های پرتودهی شده در دزهای متفاوت و شاهد.

دز پرتودهي (kGy)	۰	۱۰	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰
مدت پرتودهي (دقیقه و ساعت)	۰	۱۲ و ۵	۲۰ و ۱۰	۹ و ۱۳	۲۷ و ۱۵	۲۴ و ۱۸	۴۲ و ۲۰	۴۰ و ۲۳	۲ و ۲۶
متوسط دما هنگام پرتودهي (°C)	۴-۴-	۴-۴-	۴-۴-	۴-۴-	۴-۴-	۴-۴-	۴-۴-	۴-۴-	۴-۴-
عیار ویروس TCID50% /ml	$10^{7/5}$	$10^{5/5}$	$10^{3/3}$	$10^{2/5}$	$10^{1/75}$	$10^{1/5}$	۰	۰	۰

با پرتو گاما استفاده از آن در تهیه واکسن غیرفعال بیماری تب برفکی می‌باشد، بنابراین استفاده از ویروس لیوفیلیز شده برای پرتودهی به منظور تولید واکسن چندان کاربردی نداشت و سعی بر این شد که از روش پرتودهی ویروس منجمد استفاده شود. ولی چون دستگاه گاماسل مورد استفاده در این تحقیق توانایی تنظیم دما را نداشت بنابراین، همانگونه که قبلاً نیز توضیح داده شد از ویروس منجمد شده در دمای $-۷۰^{\circ}C$ با قالبهای یخ استفاده گردید و بطور میانگین در طول مدت پرتودهی که بطور متوسط، ۲۴-۲۰ ساعت به طول می‌انجامید دما بین ۴- تا ۴ درجه سانتی‌گراد تثبیت شد. ویروسهای پرتودهی شده در این دما بطوری که در جدول ۱ مندرج است، از دزهای ۱۰ تا ۴۵ کیلوگری خاصیت پادزنی خود را نسبت به نمونه‌ای شاهد (پرتودهی نشده) حفظ کردند، ضمناً می‌دانیم که محفوظ ماندن خاصیت پادزنی ویروس در تولید واکسن بسیار اهمیت دارد و در حیوانات واکسینه شده در ایجاد ایمنی لازم در مقابل بیماری مهم است. همچنین از نظر خاصیت عفونت‌زایی نیز طبق جدول ۲ از دز ۱۰ کیلوگری به بالا این خاصیت کاهش می‌یابد و در دزهای ۴۰، ۴۵ و ۵۰ کیلوگری کاملاً از می‌رود. در نهایت، دز اپتیمم برای غیرفعال‌سازی این ویروس با حفظ خاصیت پادزنی بدون بروز خاصیت عفونت‌زایی بین kGy ۴۴-۴۰ حساب شد. بنابراین از این ویروس غیرفعال می‌توان در تهیه واکسن ضد این بیماری استفاده کرد. این تحقیق ادامه دارد و مراحل بعدی آن یعنی تهیه رادیوواکسن و بررسی ایمنی‌زایی رادیوواکسن تولید شده در حیوانات واکسینه شده با ویروس بیماری‌زا و تعیین پایداری واکسن در حال انجام می‌باشد.

پی‌نوشت‌ها:

۱- BHK21: (Baby Hamster Kidney)

۲- Foot and Mouth Disease Virus Type A87/IRN

۳- CPE: Cytopathogenic Effects

٤- TCID 50%: Tissue Culture Infection Dose 50%

٥- CFT: Complement Fixation Test

References:

1. S.J. Barteling and J. Vreeswijk, “Developments in foot and mouth disease vaccines,” Vaccin, Vol. **9**, February, 75-87, (1991).

2. S. Gibbons, J. Catcott, B. Smtthcors, “Bovine medicine and surgery and herd health management,” Foot and Mouth Disease, 47-50, (1970).

3. L. REED, and H. MUENCH, “A simple method of estimation fifty percent end point,” Amer, J. Hyp, 27, 493, (1938).

4. J.H. Lombardo and E.E. Smolko, “A biotechnological project with a gamma radiation source of 100,000 ci,” Radiat. Phys. Chem, **35**(4-6), 585-589, (1990).

5. J.A. Kolmer, “Serum diagnosis by complement fixation test,” Lea and Febiger Publishers, Philadelphia, **345**, (1928).

6. M. Salehizadeh, “Studies on the production of specific hyperimmune antisera against type A FMD virus. Archives of Razi Institute. 41:106-111, (1990). E. Pollard. The action of ionizing radiation on viruses. Advan. Virus. Res, **2**, 109-151, (1955).

7. E. Pollard. “The action of ionizing radiation on viruses,” Advan. Virus. Res, **2**, 109-151, (1955).

8. C.D. Johnson, “Direct X-ray inactivation of the viruses, foot and mouth disease and vesicular stomatitis,” Nature, **207**, 37-39, (1965).

9. T. Frescura and P. Vivoli, “Studies of the foot and mouth disease virus sub-types using antigens inactivated by gamma radiations,” Zbl. Vet. Med. B, 20, 822-825, (1973).