راه‌اندازی روش‌های آنالیتیک برای ارزیابی مختصات واکسن هپاتیت- B نوترکیب

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 18:19 IRDT on Tuesday June 25th 2019

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۱۱/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۱۲/۱۸

هادی کریم‌زاده بیدهندی[۱]
سعید رضا پاکزاد[۲*]، محمود محمودی[۱]
سهیلا اژدری[۳]
مهدی نوروزی[۱]، مینو اکبری[۲]
مریم دارم[۱]، سید محمد جزایری[۱]

۱- گروه پاتوبیولوژی، بخش ویروس‌شناسی، آزمایشگاه هپاتیت B، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل و مرکز تحقیقات غذا و داروی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
۳- بخش ایمونولوژی، انستیتو پاستور ایران

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان امام خمینی، پلاک ۴۰۸
تلفن: ۶۶۴۹۲۷۱۹
email: srpakzad@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: طبق توصیهٔ WHO، واکسیناسیون هپاتیت B از سال ۱۹۹۱ در برنامهٔ کاری ایمن‌سازی روتین قرار گرفته است. از آنجایی‌که در تعداد معدودی از موارد عدم پاسخ به واکسن مشاهده شده که می‌تواند به علت‌های مختلف از جمله: موتاسیون ویروسی، اشکال در سیستم ایمنی فرد، کاهش کارایی واکسن و غیره باشد. لذا کیفیت واکسن هپاتیت B بایستی با روش مناسبی ارزیابی شود. ***روش بررسی:*** در روش In vitro با استفاده از روش الایزا بر روی رقت‌های واکسن استاندارد و واکسن مورد آزمایش، مقدار آنتی‌ژن موجود در واکسن مورد ارزیابی قرار گرفت. در روش In vivo دوزهای مختلفی از واکسن استاندارد و تست به موش‌های Balb/c تلقیح گردید. همچنین ماتریکس واکسن به یک گروه موش به‌عنوان گروه کنترل تزریق شد. پس از چهار هفته، سرم موش‌ها توسط روش الایزا از جهت حضور آنتی‌بادی علیه هپاتیت B مورد آزمایش قرار گرفت. سپس نتایج توسط روش Probit آنالیز گردید. ***یافته‌ها:*** با ارزیابی سری ساخت‌های مختلف واکسن هپاتیت B هر دو روش In vitro و In vivo در آزمایشگاه ملی کنترل راه‌اندازی شد و مشاهده گردید که هر دو روش نتایج قابل مقایسه‌ای را نشان می‌دهند. لذا می‌توان جهت کنترل کیفی واکسن از تست In vitro به‌طور روتین استفاده نمود. ***نتیجه‌گیری:*** روش In vitro را می‌توان جایگزین روش پرهزینه و وقت‌گیر In vivo نمود. همچنین از آنجایی‌که در روش In vitro از حیوان آزمایشگاهی استفاده نمی‌شود، این روش با مفهوم 3R و تمایل استفاده از روش‌های بدون حیوان مطابقت می‌کند.

کلمات کلیدی: واکسن هپاتیت B، In vitro، In vivo، مفهوم 3R.

مقدمه

بیماری هپاتیت B (Hepatitis B) یک مشکل عمدهٔ بهداشتی در سطح دنیا بوده که طبق گزارش WHO سالانه منجر به ۱/۲ میلیون مرگ می‌گردد.[۱] از آنجایی‌که بیش از ۴۰۰ میلیون نفر در سراسر دنیا به‌صورت مزمن آلوده به این ویروس بوده و همچنین این بیماران در خطر پیشرفت به‌سمت سیروز کبدی و سرطان کبد هستند،[۲] لذا اقدامات پیشگیری و درمان می‌تواند مانع از پیشرفت به سمت این بیماری‌ها گردد. واکسنی با کارایی‌بالا (البته نه ۱۰۰٪) جهت پیشگیری از آلودگی با ویروس هپاتیت B وجود دارد اما با این حال شیوع کلی هپاتیت B در طی سال‌های اخیر مقدار کمی کاهش یافته است. واکسن‌های هپاتیت B حاوی ۴۰μg-۳ از پروتیین HBsAg به ازای هر میلی‌لیتر بوده و نیز حاوی فسفات آلومینیوم یا هیدروکسید آلومینیوم به‌عنوان ادجوانت می‌باشند. دمای توصیه شده جهت نگهداری واکسن هپاتیت B از ^{oc}۸-۲ می‌باشد. در صورت نگهداری در این دما، به‌طور کلی واکسن از تاریخ تولید به‌مدت حداقل سه سال پایدار می‌باشد. با این حال ممکن است پایداری واکسن بین کارخانه‌های سازندهٔ مختلف به‌طور قابل توجهی متفاوت باشد. اغلب واکسن‌های هپاتیت B نسبتاً به گرما مقاوم بوده و قدرت آنها در صورت نگهداری در دمای ^{oc}۲۶-۲۰ تا یک‌سال، ۳۷ درجه به‌مدت ۶-۲ ماه و ۴۵ درجه تا یک هفته، تنها مقدار کمی کاسته خواهد شد.[۳] در یک مطالعه انجام شده هیچ تفاوتی از نظر تولید آنتی‌بادی بین نوزادانی که واکسن نگهداری شده در زنجیرهٔ سرد را دریافت نمودند با نوزادانی که واکسن نگهداری شده در آب و هوای استوایی (به‌مدت یک‌ماه) را دریافت نموده بودند، وجود نداشت.[۴] واکسن هپاتیت B و واکسن‌های ترکیبی که حاوی واکسن هپاتیت B هستند نبایستی یخ بزنند. یخ زدن واکسن هپاتیت B موجب جدا شدن پروتئین HBsAg از ادجوانت آن

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 18:19 IRDT on Tuesday June 25th 2019

شده و نتیجتاً موجب کاهش پوتنسی (ایمنوژنیسیتی) آن می‌گردد. نقطهٔ انجماد واکسن هپاتیت B، ۰/۵- درجهٔ سانتی‌گراد است.[۳] در یک مطالعهٔ انجام شده در مغولستان جهت مقایسهٔ میزان پوشش واکسیناسیون و اثربخشی آن در مناطق شهری و روستایی مشاهده گردید که به‌دنبال واکسیناسیون همگانی در ۹۴/۲٪ از نوزادان دو ساله در مناطق شهری پاسخ اکتسابی حاصل از واکسیناسیون ایجاد گردید و این درحالی بود که تنها در ۷۰/۲٪ نوزادان دو ساله در مناطق روستایی پاسخ به واکسن حاصل گردید. دلیل پاسخ کمتر در مناطق روستایی به شهری در این مطالعه، کاهش پوتنسی واکسن در اثر یخ‌زدگی آن در حین نگهداری در مناطق روستایی عنوان گردیده است.[۵] مطابق مقررات وزارت بهداشت تمام بچ‌های واکسن علاوه بر اینکه توسط سازنده در مراحل میانی و نهایی کنترل می‌شوند باید پیش از صدور اجازه مصرف از طرف اداره کل امور داروی وزارت بهداشت، توسط اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو مورد آزمایشات کنترل کیفی قرار گیرند که مهمترین آنها سنجش قدرت واکسن است که به‌روش‌های In Vivo (ایمنی‌زایی) و In Vitro (تعیین مقدار آنتی‌ژن) می‌بایست صورت پذیرد. انجام این آزمایش علاوه بر آنکه میزان قدرت اثر هر بچ از واکسن را مشخص می‌کند در عین حال معیاری است از میزان یکنواختی شرایط تولید واکسن که خود یکی از ملزومات قابل قبول بودن نحوه کار سازنده واکسن محسوب می‌گردد. همچنین به‌دلیل حساسیت واکسن به دماهای زیر صفر، گاه در مورد کیفیت واکسن‌هایی که در جامعه مورد استفاده قرار می‌گیرند تردیدهایی پیش می‌آید که بررسی قدرت این واکسن‌های جمع‌آوری شده از جامعه را در اداره کل آزمایشگاه‌ها ضروری می‌سازد. بر اساس توصیه‌های سازمان بهداشت جهانی نیز باید این امکان در اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل هر کشوری موجود باشد. مجموعه دلایل فوق، برقراری یک روش معتبر برای سنجش پوتنسی واکسن‌های هپاتیت B را در اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو ضروری می‌سازد. لذا هدف از اجرای این طرح راه‌اندازی این روش در آزمایشگاه کنترل وزارت بهداشت و معتبرسازی این روش است به‌نحوی که بتواند به‌صورت روتین نقش خود را در کنترل پوتنسی واکسن‌های هپاتیت B به‌خوبی ایفا کند. جهت کنترل کیفی واکسن‌ها پیش از این از حیوانات آزمایشگاهی استفاده می‌گردید و به‌طور کلی حیوانات آزمایشگاهی نظیر موش نقش عمده‌ای را در تست‌های تعیین قدرت اثر (پوتنسی) و ایمنی واکسن‌ها بر عهده داشته‌اند. امّا تعداد کل حیوانات مورد استفاده در کنترل کیفی به‌دلایل مختلفی در حال کاهش می‌باشد. برخی از این دلایل عبارتند از: تحول مفهوم کنترل کیفی واکسن به‌صورتی‌که در این کنترل کیفی، واکسنی مورد توافق واقع می‌گردد که از ایمنی و کارایی آن اطمینان حاصل شده باشد؛ گسترش واکسن‌های نسل جدید و راه‌اندازی و اجرای روش‌های فرعی (ارزان‌تر، تغییرپذیری کمتر و کوتاه‌تر از نظر زمانی نسبت به تست‌های کلاسیک حیوانی).[۶] در آزمایشاتی که بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام می‌شود لازم است اصول علمی نگهداری حیوانات به‌خوبی رعایت گردد همچنین در مراحل تزریق و خون‌گیری و کشتن حیوانات رعایت اصول اخلاقی که مانع زجر کشیدن غیر ضروری حیوانات است نظیر human killing را در نظر داشت. روش‌های فرعی سنجش پوتنسی که به‌صورت In vitro انجام می‌گیرند، مختص محصول بوده و از طریق نشان دادن رابطه با نتایج تست‌های پوتنسی در موش اعتباربخشی می‌شوند.[۷]

روش بررسی

این مطالعه کاربردی در سال ۸۷ در اداره کل آزمایشگاه‌های غذا و داروی وزارت‌بهداشت انجام شد. نمونهٔ واکسن در این تحقیق واکسن نوترکیب هپاتیت B ساخت کشور کره بود. لازم به ذکر است که نمونه واکسن موجود در هر بچ از یک bulk مشترک تأمین می‌گردد. با این وجود از هر بچ سه نمونهٔ واکسن به‌طور تصادفی انتخاب و آزمایش شد.

سنجش پوتنسی به‌طریق In vivo: روش In vivo (یا اندازه‌گیری ایمنی‌زایی) براساس تلقیح رقت‌های مختلف واکسن استاندارد و واکسن تست به‌گروه موش‌های Balb/c و اندازه‌گیری میزان آنتی‌بادی تولید شده می‌باشد. در این روش با استفاده از رقیق‌کنندهٔ حاوی ادجوانت موجود در واکسن، چهار رقت (۱/۲۱۶؛ ۱/۷۲؛ ۱/۲۴؛ ۱/۸) از نمونه‌های تست و استاندارد تهیه گردید. در واقع هر یک از این رقت‌ها به یک گروه موش (حاوی ۱۵ سر موش) تزریق می‌گردد. همچنین ماتریکس واکسن نیز به یک گروه موش (حاوی ۲۰ سر موش) به‌عنوان گروه کنترل تزریق می‌شود. لازم به ذکر است که موش‌های مورد استفاده چه در مورد واکسن استاندارد و چه در مورد واکسن تست از نظر نژاد، سن، وزن و جنس حتی‌الامکان

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 18:19 IRDT on Tuesday June 25th 2019

یکسان‌سازی شده‌اند. برای جلوگیری از دخالت تفاوت‌های فردی حیوانات با یکدیگر روی نتایج آزمایش‌ها، باید حیوانات مورد آزمایش به‌صورت تصادفی در بین قفس‌ها توزیع شوند به نحوی که حیوانات داخل قفس‌های مختلف از لحاظ میانگین اندازه و وزن و تحرک و سلامتی با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشته باشند. علاوه بر این رقت‌های مختلف واکسن و استاندارد به‌صورت تصادفی در بین قفس‌ها توزیع می‌شوند. در این تحقیق جهت عملیات تصادفی‌سازی، نرم‌افزار مورد استفادهٔ WHO به‌کار گرفته شد. همچنین برای جلوگیری از دخالت محل قرارگیری قفس‌ها روی پاسخ حیوانات به نمونه‌های مختلف و تاثیر در نتیجه آزمایش، قفس‌های آنها به‌صورت تصادفی در محل‌های مختلف قرار گرفته و به‌عبارتی توزیع محل قفس‌ها از نظم خاصی پیروی نمی‌کند زیرا ممکن است قفس‌هایی که در نقاط مختلف حیوان‌خانه قرار گرفته‌اند از لحاظ میزان دریافت دما و نور و سایر شرایط محیطی با یکدیگر تفاوت داشته باشند. به‌عنوان مثال قفس‌ها به‌ترتیب افزایش رقت پشت سر هم قرار نمی‌گیرند و یا اینکه قفس‌های نمونه واکسن در یک سمت و قفس‌های نمونه استاندارد در سمت دیگر قرار داده نمی‌شوند. چهار هفته پس از تزریق، خون موش‌ها گرفته شده و سرم آنها از نظر وجود HBsAb مورد بررسی قرار گرفت. موش‌هایی مثبت در نظر گرفته می‌شوند که میزان آنتی‌بادی در خون آنها (پس از تبدیل به جامعهٔ نرمال) بیش از میزان آنتی‌بادی موجود در خون موش‌های گروه کنترل باشد. سپس نتایج توسط نرم‌افزار Bioassay assist در بخش پاسخ‌های Quantal مورد بررسی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که در سنجش‌های Quantal-response با تجویز دوزهای مشخص ماده به N عدد واحد تجربی (به‌طور مثال موش آزمایشگاهی) تعداد r عدد پاسخ مثبت و N-r عدد پاسخ منفی مشاهده می‌گردد و ممکن است N به‌دلایل مختلفی نظیر تلفات و غیره تغییر کند که تغییرات اندک آن در نتایج نهایی تأثیر چندانی نخواهد گذاشت. در آنالیز آماری نتایج حاصل از بررسی واکسن‌ها به‌طریق In vivo (پاسخ‌های Quantal) معادلهٔ رگرسیون نمونهٔ تست و استاندارد محاسبه گردید که این معادله نشان دهندهٔ شیب خطوط (ضریب x) و عرض از مبداء آنها می‌باشد. همچنین در ادامه معیارهای خطی بودن (Linearity) و موازی بودن (Parallelism) با بررسی انحراف از خطی بودن و انحراف از موازی بودن ارزیابی شد که در هر دو مورد اختلافی دیده نشد.

سنجش پوتنسی به‌طریق In vitro (بررسی مقدار آنتی‌ژن): در این روش از واکسن مورد آزمایش و واکسن استاندارد رقت‌های متفاوت تهیه شده و مقدار HBsAg موجود در واکسن تست و واکسن استاندارد با یکدیگر مقایسه می‌گردد. جهت یافتن رقت‌های مناسب بایستی رقت‌های مختلف مورد آزمون قرار گیرند تا محدوده‌ای که در آن میزان پاسخ متناسب با میزان آنتی‌ژن است، یافت گردد. همچنین در این محدوده نمودار دوز- پاسخ به‌صورت خطی می‌باشد. روش سنجش پوتنسی از طریق In vitro به‌ترتیب ذیل انجام شد: شش رقت (۱/۲۵۶۰؛ ۱/۱۲۸۰؛ ۱/۶۴۰؛ ۱/۳۲۰؛ ۱/۱۶۰؛ ۱/۸۰) از نمونهٔ واکسن مورد آزمایش و واکسن استاندارد تهیه گردید. سپس توسط روش الایزا رقت‌های مذکور از جهت میزان HBsAg موجود مورد بررسی قرار گرفتند (کیت الایزا Hepanostica HBsAg Ultra ساخت Biomerieux هلند با تائید WHO). در این آزمایش نمونه واکسن و استاندارد مربوطه به موازات هم مورد آزمایش قرار می‌گیرند. میزان جذب نوری برای رقت‌های مختلف واکسن و استاندارد در نرم‌افزار آماری که توانایی انجام Parallel-line Analysis را داشته باشد وارد می‌گردد و قدرت نسبی آن به‌دست می‌آید (برای محاسبه پوتنسی از نرم‌افزار WHO یا Bioassay assist استفاده گردید).

معتبرسازی Validation: هدف از این دستورالعمل بیان پروتکل معتبر سازی روش تعیین قدرت اثر واکسن هپاتیت B نوترکیب به‌روش In-vitro است تا بتوان از این روش به‌عنوان جایگزین روش ایمونوژنیسیتی برای تعیین قدرت اثر استفاده نمود. پارامترهایی که در طی معتبرسازی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند عبارتند از:

بررسی صحت (Accuracy): در اینجا از طریق روش Dilution-Recovery یا روش تعیین درصد بازیابی (Recovery%) برای بررسی صحت استفاده می‌شود. جهت این بررسی واکسن رقیق نشده به‌عنوان نمونهٔ واکسن ۱۰۰٪ در نظر گرفته می‌شود و از نمونهٔ واکسن با استفاده از PBS+BSA دو غلظت متناظر با ۷۵٪ و ۵۰٪ تهیه می‌گردد. سپس شش رقت ذکر شده در بخش In vitro از این سه نمونه تهیه شده و آزمون پوتنسی روی آنها انجام می‌گیرد. مقدار بازیابی (Recovery%) باید در محدوده ۱۲۰-۸۰٪ قرار داشته باشد (Acceptance criterion: 80-120%).

محاسبه تکرارپذیری (Repeatability): تست پوتنسی هر واکسن در یک روز سه بار تکرار و سپس میانگین، انحراف معیار (SD) و ضریب

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 18:19 IRDT on Tuesday June 25th 2019

تغییرات (CV%) محاسبه می‌شود. (CV% بایستی کمتر از ۱۰٪ باشد).
بررسی دقت بینابینی (Intermediate Precision): یک نمونهٔ واکسن با رقت‌های یکسان در روزهای مختلف (سه روز) مورد آزمایش قرار گرفته و سپس میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات برای هر غلظت (۱۰۰٪، ۷۵٪ و ۵۰٪) محاسبه می‌گردد. این عمل برای تمامی واکسن‌ها انجام می‌شود. درصد ضریب تغییرات برای هر غلظت واکسن و میانگین ضرایب تغییرات نبایستی از ۱۵٪ بیشتر باشد. دو کارشناس در سه روز مختلف آزمایش تعیین مقدار را روی هر سه رقت یک نمونه به‌صورت duplicate انجام داده و جهت بررسی اختلاف معنی‌دار میان آنها t-test محاسبه می‌گردد.
بررسی خطی بودن (Linearity): اساس معتبر بودن سنجش‌های به‌روش خطوط موازی (Parallel Line Assay)، برقراری دو معیار خطی‌بودن و موازی بودن می‌باشد. این دو معیار توسط نرم‌افزار Bioassay assist مورد بررسی قرار می‌گیرند. همچنین از جهتی دیگر جهت ارزیابی معیار خطی بودن، داده‌های آزمایشات سنجش پوتنسی وارد برنامه آماری Excel شده و نمودار غلظت در مقابل پوتنسی را رسم نموده، مقدار شیب (Slope) و ضریب همبستگی (R2) محاسبه می‌گردد. مقدار R2 بایستی بزرگتر از ۰/۹۸ باشد.
بررسی اختصاصی بودن (Specificity) روش: از یک نمونه واکسن به دو طریق رقت یک به ۸۰ تهیه می‌گردد؛ بدین ترتیب که یک رقت را با استفاده از رقیق‌کنندهٔ PBS+BSA تهیه نموده و در مورد نمونهٔ دیگر، از محلول thimerosal در هیدروکسید آلومینیوم (ماتریکس واکسن) جهت رقیق‌نمودن استفاده می‌گردد. سپس دو نمونه به‌طور همزمان در یک نوبت به‌صورت سه‌بار تکرار آزمایش و نتایج دو نمونه با آزمون t-test ارزیابی شد و قاعدتاً نباید اختلاف معنی‌داری را نشان دهند.
بررسی استواری (Robustness): از آنجایی‌که هدف به‌دست آوردن قدرت نسبی از طریق پاسخ‌های نمونهٔ تست و استاندارد می‌باشد و در سیستم الایزا همزمان با نمونه‌گذاری درون هر چاهک پلیت، واکنش آغاز می‌گردد؛ در بررسی تأثیر ترتیب نمونه‌گذاری در پاسخ (OD) و نهایتاً حذف این اثر در محاسبهٔ قدرت نسبی واکسن، سه حالت (ترتیب) نمونه‌گذاری ارزیابی شد. بدین ترتیب که در ترتیب اول نمونهٔ رقت‌های استاندارد پیش از رقت‌های تست در پلیت ریخته شد، در ترتیب دوم نمونهٔ رقت‌های تست پیش‌از استاندارد ریخته شد و بالاخره ترتیب سوم در هر رقت جداگانه ابتدا نمونهٔ استاندارد و بلافاصله پس از آن نمونهٔ تست (در همان رقت) قرار داده شد.

یافته‌ها

نتایج بخش In vivo: نتایج آنالیز آماری آزمایشات بخش In vivo بر روی تمامی واکسن‌ها (پاسخ‌های Quantal)، نشان داد که معیارهای خطی بودن (Linearity) و موازی بودن (Parallelism) به‌طور کامل برقرار بوده و تست‌های پوتنسی انجام شده بر روی موش از اعتبار لازم برخوردار می‌باشند. همچنین شرط دیگر قابل قبول بودن نتایج پوتنسی این‌است که حد بالای پوتنسی بیش از ۳۰۰٪ پوتنسی به‌دست آمده نباشد و حد پائین آن از ۳۰٪ پوتنسی به‌دست آمده نباید کمتر باشد. حجم اطلاعات در این بخش و محاسبات تست‌های حیوانی بسیار گسترده بود، نتایج نهایی پوتنسی چهار بچ واکسن و حدود اطمینان آنها به‌طور خلاصه در جدول ۱ نشان داده شده است.
نتایج بخش In vitro:
بررسی صحت: نتایج محاسبات درصد بازیابی (Recovery%) پوتنسی واکسن سری ساخت ۲۰۶۳۲۲۲ در روزهای مختلف اعدادی بین ۱۰۶/۰۱٪–۱۰۰/۰۰٪ را نشان می‌دهد. این محاسبات در مورد واکسن سری ساخت ۲۰۶۳۲۳۲ بین ۱۰۱/۹۱٪–۸۸/۶۵٪ بوده و نیز در مورد بچ‌های ۲۰۶۳۲۱۹ و ۲۰۶۰۲۳۳ به‌ترتیب بین ۱۰۱/۹۳٪–۸۰/۹۵٪ و ۱۰۲/۵۹٪–۸۱/۵۵٪ محاسبه گردیده است. درصد بازیابی محاسبه شده در روزهای مختلف در محدودهٔ قابل قبول (۱۲۰–۸۰٪) بوده و نشان‌دهندهٔ این نکته می‌باشد که معیار صحت به‌خوبی برقرار است.
بررسی دقت (Precision):
محاسبه تکرارپذیری: نتایج سه بار تکرار هر واکسن در یک نوبت آزمایش در جدول ۲ نشان می‌دهد که CV% نمونه‌ها اعدادی بین ۱/۰۴٪ تا ۳/۵۵٪ می‌باشد. بنابراین اعداد به‌دست آمده علاوه بر اینکه قابل قبول می‌باشند (کمتر از ۱۰٪)، مقادیر نسبتاً پائینی را دارند. لذا روش راه‌اندازی شده از تکرارپذیری خوبی برخوردار می‌باشد.
بررسی دقت بینابینی (Intermediate Precision): پارامتر دقت بینابینی در دو بخش محاسبهٔ دقت بین روزهای مختلف و بین افراد متفاوت بررسی می‌شود. در بررسی دقت در روزهای مختلف، پوتنسی چهار بچ واکسن موجود در سه‌روز متفاوت آزمایش شد و میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات (CV%) آنها محاسبه گردید. ضریب تغییرات واکسن سری ساخت ۲۰۶۳۲۲۲، ۲۰۶۳۲۳۲، ۲۰۶۳۲۱۹ و ۲۰۶۰۲۳۳

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 18:19 IRDT on Tuesday June 25th 2019

جدول-۱: نتایج تست‌های تعیین پوتنسی به‌طریق In vivo با حدود بالا و پائین

سری ساخت	حد پائین	قدرت اثر(پوتنسی)	حد بالا
۲۰۶۳۲۲۲	۰/۳۲۵	۰/۷۷۳	۱/۷۵۵
۲۰۶۳۲۳۲	۰/۳۸۹	۰/۸۶۳	۱/۸۶۸
۲۰۶۳۲۱۹	۰/۴۳۲	۰/۹۸۱	۲/۲۲۵
۲۰۶۰۲۳۳	۰/۶۵۶	۱/۳۸۰	۳/۰۴۲

جدول-۳: نتایج پوتنسی واکسن‌ها با دو روش In vitro و In vivo

سری ساخت	شماره فنی	In vitro	In vivo
۲۰۶۳۲۲۲	۸۵/M/B/۵۷	۱/۲۲۲۶	۱/۳۶۸
۲۰۶۳۲۳۲	۸۵/M/B/۱۰۸	۰/۸۱۱۳۱	۰/۹۸۱
۲۰۶۳۲۱۹	۸۵/M/B/۵۴	۰/۷۴۸۳۷	۰/۷۸۲۴
۲۰۶۰۲۳۳	۸۵/M/B/۹۰	۰/۷۲۸۱۵	۰/۸۶۳۵۹

جدول-۲: بررسی تکرارپذیری (Repeatability) روش با مقایسهٔ نتایج پوتنسی چهار سری ساخت واکسن

سری ساخت	۲۰۶۰۲۳۳	۲۰۶۳۲۱۹	۲۰۶۳۲۳۲	۲۰۶۳۲۲۲
تکرار اول	۱/۱۶۷۱	۰/۷۷۱۰۴	۰/۷۳۶۵۶	۰/۷۶۳۵۶
تکرار دوم	۱/۲۵۲۵۶	۰/۷۹۴۷	۰/۷۳۶۱۶	۰/۷۴۹۸
تکرار سوم	۱/۲۱۹۶۳	۰/۸۲۴۰۷	۰/۷۲۲۷۳	۰/۷۵۰۰
میانگین	۱/۲۱۳۰۹۷	۰/۷۹۶۶۰۳	۰/۷۳۱۸۱۷	۰/۷۵۴۴۵۳۳
انحراف معیار	۰/۰۴۳۱۰۳	۰/۰۲۶۵۶۶	۰/۰۰۷۸۷۲	۰/۰۰۷۸۸۷۲
ضریب تغییرات (CV%)	۳/۵۵۳۱۳۶	۳/۳۳۴۹۳۳	۱/۰۷۵۶۵۵	۱/۰۴۵۴۲۴۳

به‌ترتیب ۱/۶۴٪، ۲/۲۱٪، ۱/۳۶٪ و ۲/۷۱٪ محاسبه گردید. همان‌طور که مشاهده می‌شود CV% هر یک از نمونه‌ها و میانگین ضریب تغییرات، نه‌تنها از ۱۵٪ (معیار قبولی) کمتر بوده بلکه اعداد بسیار کوچکی‌را نشان می‌دهند که نشان‌دهندهٔ دقت بالای روش در روزهای مختلف می‌باشد. نتایج بررسی دقت بینابینی نشان می‌دهد که خطا بین افراد مختلف در انجام این تست بسیار کم بوده (ضریب تغییرات بین ۲/۴۳٪ تا ۹/۴۱٪) و دقت بینابینی قابل قبولی وجود دارد. همچنین t-test انجام شده بین نتایج افراد، اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد.

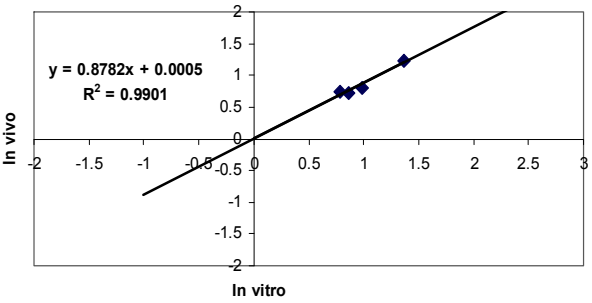
بررسی خطی بودن (Linearity): همان‌طور که در بخش روش تحقیق آورده شد، معیار خطی‌بودن در دو بخش مورد بررسی قرار گرفت. بخش اول که مربوط به بررسی خطی‌بودن منحنی دوز- پاسخ بین رقت‌های واکسن و OD به‌دست آمده می‌باشد، توسط نرم‌افزار Bioassay assist صورت گرفت و عدم انحراف از خطی‌بودن که نشان‌دهندهٔ اعتبار تست و قابل اعتماد بودن نتایج به‌دست آمده می‌باشد، در تمام تست‌ها نمایش داده شد. همچنین از جهتی دیگر خط trend رسم شده (در نرم‌افزار Excel) بین نقاط مربوط به پوتنسی واکسن‌های ۱۰۰٪، ۷۵٪ و ۵۰٪ در روزهای‌مختلف دارای شیب بسیار نزدیک به هم بوده و R-squared محاسبه شده در روزهای مختلف بالای ۰/۹۸ به‌دست آمد که قابل قبول می‌باشد.

بررسی معیار استواری Robustness: معیار Robustness جهت بررسی محل و ترتیب نمونه‌گذاری مورد ارزیابی قرار گرفت. در این راستا بهترین ترتیب اتخاذ شده ترتیبی بود که بلافاصله پس از هر رقت استاندارد، رقت‌های متناظر از واکسن تست گذاشته شود. بدین ترتیب تأثیر تقدم و تأخر زمانی تقریباً از بین خواهد رفت. همچنین این نتیجه حاصل شد که نبایستی همراه استاندارد بیش از سه نمونهٔ واکسن (سه سری ساخت و یا سه غلظت مختلف واکسن از یک سری ساخت) گذاشته شود زیرا فاصلهٔ نمونه‌های استاندارد و تست نامعقول شده و امکان مخدوش شدن معیار خطی بودن وجود دارد.

بررسی اختصاصی بودن روش (Specificity): در این بخش دو نمونه رقت یک به ۸۰ تهیه شده توسط رقیق‌کنندهٔ PBS+BSA و رقیق‌کنندهٔ محلول تیومرسال (thimerosal) در هیدروکسید آلومینیوم (ماتریکس واکسن) با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج به‌دست آمده توسط آزمون t-test اختلاف معنی‌داری را میان رقت حاوی مقادیر بالاتر تیومرسال و رقت حاوی مقادیر نرمال تیومرسال نشان نداد. لذا تیومرسال در تست‌های تعیین پوتنسی اختلالی را ایجاد نمی‌نماید.

نتایج همبستگی: جدول ۳ در یک نگاه کلی نتایج آزمایشات واکسن را در هر دو بخش In vitro و In vivo نشان می‌دهد. با استفاده از این نتایج، نمودار همبستگی نتایج سنجش پوتنسی واکسن‌ها رسم‌می‌گردد (نمودار ۱). ضریب همبستگی محاسبه شده از طریق فرمول پیرسون عدد ۰/۹۹۰۱ را نشان می‌دهد لذا هر گاه واکسنی از طریق In vitro مورد آزمایش پوتنسی قرار گیرد و مردود گردد، مطمئناً توسط روش In vivo نیز همین نتیجه را نشان خواهد داد.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 18:19 IRDT on Tuesday June 25th 2019



نمودار-۱: همبستگی نتایج پوتنسی سنجش In vitro و In vivo

بحث

تضمین کیفیت و درستی نتایج آزمون‌ها در یک آزمایشگاه، در عمل به معنی پیش‌بینی تمهیداتی برای جلوگیری از بروز خطاها است. نخستین این تمهیدات استفاده از "روش‌های آنالیز معتبر" می‌باشد. روش‌های کنترل کیفی داخلی و خارجی، لایه‌های بعدی این اقدامات پیشگیرانه را تشکیل می‌دهند و مورد تائید قرار گرفتن در سازمان‌های معتبر بین‌المللی به اعتبار خدمات ارائه شده توسط یک آزمایشگاه می‌افزاید و ضامن این اعتبار است. طبق پروتکل معتبرسازی ذکرشده در قسمت مواد و روش، در این مطالعه جهت بررسی پارامتر صحت (Accuracy) از روش تعیین درصد بازیابی (Recovery%) به‌طریق dilutional Recovery استفاده شد. لازم به‌ذکر است که در صورت در دسترس بودن مقادیر خالصی از مادهٔ مورد آزمایش (در مورد این پروژه، HBsAg) می‌توان از روش Additional Recovery نیز جهت بررسی پارامتر صحت بهره گرفت. پارامتر صحت (Accuracy) در واقع نشان‌دهندهٔ میزان نزدیک بودن مقادیر محاسبه شده (به‌دست آمده) به مقادیر واقعی می‌باشد. همان‌طور که ذکر گردید بررسی دقت منوط به ارزیابی سه پارامتر Reproducibility، Repeatability و Intermediate precision می‌باشد که از میان آنها از ارزیابی Reproducibility صرف‌نظر شد؛ زیرا این معیار به بررسی دقت بین آزمایشگاه‌ها می‌پردازد و از آنجایی‌که قرار بود راه‌اندازی این روش تنها در یک آزمایشگاه (National Control Laboratory)، صورت گیرد، بررسی Repeatability و Intermediate precision کفایت می‌نمود. تکرارپذیری (Repeatability) هر آزمون با محاسبه میانگین، انحراف معیار و نهایتاً CV٪ نتایج قابل ارزیابی می‌باشد. معیار قابل قبول تکرارپذیری هر آزمایش به‌دست آوردن درصد ضریب تغییرات (CV٪) کمتر از ۱۰٪ می‌باشد. با توجه به نتایج، تمامی CV٪ محاسبه شده، کمتر از ۱۵٪ بودند که این نشان‌دهنده تکرارپذیری مناسب آزمون‌ها می‌باشد. جهت بررسی دقت بینابینی (Intermediate precision)، آزمون‌های انجام شده بر روی هر سری ساخت واکسن در روزهای مختلف (سه روز) تکرار شد و میانگین، انحراف معیار و CV٪ نتایج حاصل از انجام آزمون توسط افراد مختلف نیز بررسی گردید که در هر دو حالت موجود (روزهای مختلف و افراد مختلف) نتایج حاصله در محدوده قابل قبول قرار گرفتند (CV٪<۱۵٪). با توجه به اینکه کیت مورد استفاده یک کیت تشخیصی HBsAg در نمونه‌های کلینیکی می‌باشد و اختصاصیت آن در مقابل متغیرهایی نظیر: فاکتور روماتوئیدی، مقادیر بالای بیلی‌روبین، هموگلوبین، پروتئین و لیپید مورد بررسی قرار گرفته است؛ بنابراین از آنجایی‌که در این بررسی به‌جای نمونه کلینیکی از واکسن هپاتیت B استفاده شد، لذا ایجاب می‌نمود که ویژگی آزمون (Specificity) در ارتباط با ترکیبات دیگری نظیر آلومینیوم هیدروکساید و تیومروسال که در واکسن موجود بوده و در نمونه‌های کلینیکی حضور ندارند نیز بررسی شود. همان‌طور که در بخش نتایج مشاهده می‌گردد، میزان جذب نوری واکسن‌های حاوی مقادیر نرمال آلومینیوم هیدروکساید- تیومروسال و واکسن‌های حاوی مقادیر بالای این مواد تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. از آنجایی‌که هدف به‌دست آوردن قدرت نسبی از طریق پاسخ‌های نمونهٔ تست و استاندارد می‌باشد و در سیستم الایزا همزمان با نمونه‌گذاری درون هر چاهک، واکنش آغاز می‌گردد؛ لذا جهت جلوگیری از ایجاد خطا به‌واسطهٔ تاثیر اختلاف زمان در نمونه‌گذاری در آزمون‌های الایزا می‌توان از دستگاه‌های اتوماتیک استفاده نمود. به طوری‌که این دستگاه‌ها قادر به نمونه‌گذاری همزمان رقت‌ها در پلیت‌های مربوطه می‌باشند. با توجه به در دسترس نبودن دستگاه مزبور و همچنین عدم امکان استفاده از سمپلر مولتی چنل؛ جهت بررسی تأثیر ترتیب نمونه‌گذاری در پاسخ (OD) ایجاد شده و نهایتاً حذف این اثر در محاسبهٔ پوتنسی نسبی واکسن، سه حالت (ترتیب) نمونه‌گذاری مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم به‌ذکر است که هر یک از این ترتیب‌ها پس از چندین بار آزمایش ارزیابی شده و نهایتاً یکی از آنها به‌عنوان ترتیب نهایی جهت تمامی تست‌ها به‌کار گرفته شد. بدین ترتیب پارامتر Robustness ارزیابی شد. جهت بررسی پوتنسی واکسن هپاتیت B، روش ایمنوژنیسیتی در موش (روش In vivo) به‌عنوان یک روش استاندارد مطرح می‌باشد. در ارتباط با روش‌های In vivo

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 18:19 IRDT on Tuesday June 25th 2019

بایستی مفهوم ۳R (3R Concept) را مدنظر قرار داد. اصطلاح 3R Concept برگرفته از سه اصل Reduction، Refinement و Replacement می‌باشد. در اصل Reduction مسئلهٔ کاهش دادن تعداد حیوانات آزمایشگاهی و استفاده از حداقل حیوان مورد نیاز مطرح می‌گردد. اصل Refinement بر بهتر نمودن روش و تغییر دادن آن تأکید دارد به طوری‌که حیوان کمترین زجر را بکشد (بیهوش نمودن حیوان و غیره) و بالاخره اصل Replacement بر جاگزینی روش‌های مناسب به‌جای روش In vivo اشاره می‌کند به طوری‌که بتوان روش مورد نظر را پس از راه‌اندازی و اعتبارسنجی به‌جای روش استاندارد به‌کار گرفت. لازم به‌ذکر است که روش راه‌اندازی شده در این پروژه به‌عنوان روش فرعی (Alternative) نسبت به روش In vivo مزایایی مهمی دارد که از جمله مهمترین آن می‌توان به صرفه‌جویی در زمان اشاره نمود به طوری‌که با این روش می‌توان نمونه واکسن را در کمتر از چند ساعت بررسی کرده و نتیجهٔ آن را گزارش نمود. این در حالی است که همین آزمون با روش In vivo بیش از یک‌ماه طول می‌کشد. همچنین روش راه‌اندازی شده یک روش In vitro بوده و نیازی به استفاده از حیوان ندارد. لذا در نیروی انسانی جهت نگهداری حیوان، فضای نگهداری حیوان و به‌طور کلی در هزینه‌های خرید، تغذیه و نگهداری حیوان صرفه‌جویی می‌گردد و نهایتاً از آنجایی‌که روش راه‌اندازی شده خارج از بدن موجود زنده به‌کار گرفته می‌شود لذا تغییرپذیری کمتری را نشان می‌دهد.[۸] به‌طور کلی می‌توان مزایای روش In vitro به In vivo را در چهار بخش خلاصه نمود که عبارتند از: ۱- نیاز به زمان کمتر. ۲- اقتصادی‌تر. ۳- عدم به‌کارگیری حیوان. ۴- تغییرپذیری کمتر.[۸] روش ایمونوژنیسیتی بر روی موش روشی وقت‌گیر و پر هزینه است که در هر سری آزمایش مستلزم استفاده از تقریباً ۱۵۰ سر موش است و این علاوه بر ملاحظات اخلاقی، وجود یک حیوان‌خانه را می‌طلبد و نیاز به نیروی کارشناس زیادی دارد. به همین جهت توصیه شده است[۶] که روش سریع‌تر و ساده‌تر In-vitro ابتدا در مقابل روش مرجع که روش ایمونوژنیسیتی یا In-vivo است "اعتبارسنجی (Validation)" شود و سپس به‌صورت روتین مورد استفاده قرار گیرد. این معتبرسازی باید برای هر نوع واکسن به‌صورت جداگانه انجام شود. در ارتباط با کیت‌های مورد استفاده در راه‌اندازی روش می‌توان از کیت‌های تجاری (Commercial kit) یا کیت‌هایی که در آزمایشگاه سرهم‌بندی (Assemble) می‌گردند (in-house kit) استفاده نمود. اما کیت‌های تجاری در مقایسه با کیت‌های in-house مزایایی دارند که عبارتند از: ۱- پاسخ‌های با ثبات‌تری را نشان می‌دهند، ۲- در دسترس‌تر هستند و ۳- زمان کمتری را می‌گیرند. در مقابل گران‌تر می‌باشند. جهت انجام بسیاری از تست‌ها که در آنها مادهٔ مورد نظر از لحاظ کمّی بررسی می‌گردد؛ بایستی رقت‌های مناسبی از آن ماده انتخاب گردد.[۹] به طوری‌که نمودار دوز- پاسخ (رقت- OD) در این رقت‌ها خطی بوده و میزان پاسخ با دوز استفاده شده، متناسب باشد. در ابتدا رقت‌های مورد استفاده در این مطالعه بر روی واکسن‌های حاوی HBsAg، از ۱:۱۰ تا ۱:۱۲۸۰ در نظر گرفته شد که پس از بررسی رابطهٔ خطی، به رقت‌های ۱:۸۰ تا ۱:۲۵۶۰ تغییر نمود. در واقع در این رقت‌ها میزان OD با غلظت آنتی‌ژن به‌طور متناسب (Proportionally) تغییر می‌نمود. تعیین این رقت‌ها ارتباط مستقیم با میزان حساسیت کیت مربوطه داشته و در مورد هر کیت متفاوت می‌باشد.[۹] لازم به ذکر است که بررسی خطی بودن رقت‌ها در آنالیز آماری هر نوبت از آزمایش توسط آنالیز واریانس انجام می‌گیرد. همچنین معیار خطی بودن (Linearity) در میان نتایج پوتنسی نمونه‌های واکسن ۱۰۰٪، ۷۵٪ و ۵۰٪ مورد ارزیابی قرار گرفته و با محاسبهٔ R^2 بررسی می‌گردد. جهت برقرار بودن پارامتر خطی بودن بایستی R^2 برابر ۰/۹۸ یا بیشتر باشد (در واقع R^2 می‌تواند مقادیر میان ۱-۰/۹۸ اختیار کند تا نشان‌دهندهٔ برقرار بودن معیار خطی‌بودن باشد).[۹] همان‌طور که در قسمت نتایج ملاحظه می‌گردد در تمامی آزمایشات انجام شده، R^2 محاسبه شده برابر ۱-۰/۹۸ می‌باشد. لذا پارامتر Linearity به‌خوبی برقرار است. در مورد یک آزمایشگاه کنترل مثل آزمایشگاه ملی کنترل این مسئله اهمیت دارد که روش راه‌اندازی شده، واکسنی را قبول نکند که توسط روش استاندارد رد می‌گردد و بالعکس.[۱۰] با محاسبهٔ ضریب همبستگی بین روش Invivo و Invitro و ارزیابی آن می‌توان حدوداً این اطمینان را حاصل نمود.[۱۱] با این وجود در اینجا در صورتی‌که پوتنسی نمونهٔواکسنی با روش راه‌اندازی شده (In vitro) برابر حداقل مقدار قابل قبول یا نزدیک به آن (Border line) شود، با روش In vivo مورد آزمایش قرار گرفته و کنترل می‌گردد. در پایان بایستی ذکر گردد که روش راه‌اندازی شده، روش مناسبی جهت بررسی قدرت اثر واکسن بوده و از این پس تمامی واکسن‌ها پیش از توزیع و تجویز، با این روش مورد ارزیابی قرار گرفته و از سلامت و قدرت اثر آن اطمینان حاصل می‌گردد.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 18:19 IRDT on Tuesday June 25th 2019

References

1. World Health Organization. Warns of growing "crisis of suffering". 1997. Available from: [http://www.who.int/whr/1997/media_centre/press_release/en/index.html].
2. Ocama P, Opio CK, Lee WM. Hepatitis B virus infection: current status. *Am J Med* 2005; 118: 1413.
3. Van Damme P, Cramm M, Safary A, Vandepapelière P, Meheus A. Heat stability of a recombinant DNA hepatitis B vaccine. *Vaccine* 1992; 10: 366-7.
4. Otto BF, Suarnawa IM, Stewart T, Nelson C, Ruff TA, Widjaya A, et al. At-birth immunisation against hepatitis B using a novel pre-filled immunisation device stored outside the cold chain. *Vaccine* 1999; 18: 498-502.
5. Edstam JS, Dulmaa N, Nymadawa P, Rinchin A, Khulan J, Kimball AM. Comparison of hepatitis B vaccine coverage and effectiveness among urban and rural Mongolian 2-year-olds. *Prev Med* 2002; 34: 207-14.
6. Hendriksen CFM. Validation of alternative methods for the potency testing of vaccines. The report and recommendations of ECVAM workshop 3l. *ATLA* 2001; 26: 747e61.
7. World Health Organization. Hepatitis B Potency Testing Standardization. Report of a Meeting WHO/SEARO, New Delhi, 2001.
8. Rodriguez O, Garcia G, Izquierdo M, Quintana M, Marcelo J. In-vitro assay for the cuban vaccine for Hepatitis B. Applied Biotechnology 2001; 18: 154-8.
9. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.
10. World Health Organization guide to good manufacturing practice (GMP) requirements, Part 2, Validation, World Health Organization, Geneva, 1997.
11. Cuervo ML, Sterling AL, Nicot IA, Rodríguez MG, García OR. Validation of a new alternative for determining in vitro potency in vaccines containing Hepatitis B from two different manufacturers. *Biologicals* 2008; 36: 375-82.

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 3, Jun 2009: 159-167

Set up of analytical methods for evaluation of specifications of recombinant Hepatitis- B vaccine

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 18:19 IRDT on Tuesday June 25th 2019

Karimzadeh H.[1]
Pakzad S R.[2*]
Mahmoudi M.[1]
Ajdary S.[3]
Norouzi M.[1]
Akbari M.[2]
Daram M.[1]
Jazayeri S M.[1]

1- Department of Pathobiology, Virology section, Health Faculty, Tehran University of Medical Science
2- Food and Drug Control Laboratory & Research Center (FDLRC); Ministry of Health and Medical Education
3- Immunology Department, Pasteur Institute of Iran

[*] Corresponding author: Vaccine Potency and Standardization Section, Food and Drug Control Laboratory (FDCL), Ministry of Health and Medical Education, No 408 Imam Khomeini Ave., Tehran, IRAN 11136-15911
Tel: +98-21-88335345
email: srpakzad@yahoo.com

Received: January 26, 2009 Accepted: March 08, 2009

Abstract

Background: Hepatitis B vaccination has been included in routine immunization of all individuals according to WHO recommendations since 1991. Despite successful coverage, 3-5% of recipients fail to mount a desirable protection level of Ab. Vaccine failure results from: emergence of mutation, immune failure of individuals, decrease in vaccine potency, and etc. The quality of Hepatitis B vaccine should be evaluated by a reliable method.
Methods: The amount of vaccine antigen was measured through the in vitro assay of Hepatitis B vaccines which consists of multiple dilutions of the reference material and samples. The preparations were evaluated by Elisa to determine the amount of HBsAg. The data were analyzed by parallel-line analysis software. The in vivo assay was performed by inoculating multiple doses of the reference and sample preparations in Balb/c mice. A control group was also inoculated with vaccine matrix. Four weeks later, the mice sera were evaluated to determine the presence of antibodies against Hepatitis B by Elisa method. The data were analyzed by Probit analysis software.
Results: Both methods were set up in our laboratory by which different batches of Hepatitis B vaccine were evaluated. It was observed that In vivo and In vitro methods provide comparable results. Therefore we can use the in vitro method for routine testing of HB vaccine quality control.
Conclusion: In vitro method can be used in place of In vivo method because of its time and cost-effectiveness. Moreover, since no animals are used in in vitro method, it complies well with the 3R concept (Reduction, Refinement, and Replacement of animal testing) and the current tendency to use alternative method

Keywords: Hep B vaccine, in vivo, in vitro, 3R concept.