



آزمایش نوروویرولانس در ارزیابی بی ضرری واکسن خوراکی فلج اطفال در میمون

محمد اسلام پناه

محقق، بخش آسیب‌شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

نویسنده مسئول: محمد اسلام پناه m.islampanah@rvsri.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴-۰۵-۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴-۰۸-۰۵

چکیده

ویروس عامل بیماری فلج اطفال از راه گوارشی و یا تنفسی وارد بدن انسان می‌شود و انسان میزبان طبیعی این ویروس است. القای این بیماری به صورت تجربی و از طریق دهان در میمون‌های دنیای قدیم (به جز شامپانزه و میمون سینومولگوس) امکان‌پذیر نیست مگر اینکه ویروس فلج اطفال به صورت تزریقی تجویز شود. هدف از انجام آزمایش نوروویرولانس ارزیابی بی‌ضرری واکسن خوراکی فلج اطفال و اطمینان از عدم برگشت‌پذیری ویروس واکسینال به فرم وحشی است. در این روش، سوسپانسیون ویروس واکسینال (سویه‌های به کار رفته در ساخت واکسن) از راه داخل نخاعی به میمون تزریق شده و عوارض احتمالی آن در دستگاه عصبی مرکزی (CNS^۱)، بررسی می‌شود. هرچند این آزمون هزینه‌بر و زمان‌بر است ولی بهترین روش با بالاترین درصد اطمینان به نتایج حاصل از آن است.

کلمات کلیدی

نوروویرولانس، واکسن خوراکی فلج اطفال، میمون

1. Central nervous system.

بیان مساله و اهمیت موضوع

انجام آزمایش نوروویرولانسن در میمون (MNVT)، برای ارزیابی بی‌ضرری واکسن خوراکی فلج اطفال (OPV) بسیار حائز اهمیت است زیرا به واسطه آن احتمال برگشت‌پذیری ویروس واکسینال (VDPV) به فرم وحشی و القای بیماری در جمعیت‌هایی با سطح ایمنی کم، بررسی می‌گردد. این آزمایش یک الزام استاندارد قبل از عرضه واکسن برای استفاده است (۲،۳).

آزمایش نوروویرولانسن شامل تزریق ویروس زنده ضعیف شده فلج اطفال به به‌طور مستقیم به مغز یا نخاع (سیستم عصبی مرکزی) میمون‌ها برای ارزیابی توانایی ویروس در ایجاد بیماری در سیستم عصبی است. سپس میمون‌ها از نظر علائم مشکلات عصبی مانند فلجی تحت نظر قرار می‌گیرند و مغز و نخاع آن‌ها از نظر آسیب به‌صورت میکروسکوپی بررسی می‌شوند.

در ابتدای کار، آزمایش‌های نوروویرولانسن واکسن‌های فلج اطفال، محدود به انجام آن در میمون رزوس (Macaca mulatta) بود. با توجه به این که گونه‌های مختلف میمون حساسیت‌های متفاوتی نسبت به ویروس فلج اطفال نشان می‌دهند، مطالعات انجام شده نشان دادند که میمون‌های پاتاس حساس‌ترین بودند و پس از آن میمون‌های سینومولگوس و سپس وروت (Chlorocebus pygerythrus)، رزوس و بابون Baboon قرار دارند. یک مطالعه بین‌المللی در سال ۱۹۷۳ نشان داد که در میمون‌های سینومولگوس نیز وقتی ویروس به‌طور مستقیم به تالاموس تلقیح می‌شد، نسبت به میمون‌های رزوس حساس‌تر بودند. سنجنش مولکولی MAPREC^۱ به‌طور کامل اعتبارسنجی شده و به‌طور معمول برای ویروس پولیو تیپ ۳ استفاده می‌شود، مطالعات برای تیپ ۱ در حال انجام است. سنجنش‌های مولکولی در مقایسه با مطالعات حیوانی، روش دقیق و تکرارپذیری‌تری برای ارزیابی نوروویرولانسن ارائه می‌دهند. علاوه بر سنجنش MAPREC، روش‌های مولکولی دیگری مانند توالی‌یابی نسل بعدی برای غربال‌گری انبوه واکسن‌های فلج اطفال در حال بررسی هستند. الگوهای موش تراویخته PVR-Tg21، که در آن‌ها موش‌ها برای بیان گیرنده ویروس فلج اطفال انسانی مهندسی شده‌اند، اعتبارسنجی گردیده‌اند (۴،۷).

دستاوردها

به دنبال ساخت واکسن خوراکی فلج اطفال خوراکی در سال ۱۳۵۱، با تلاش و پیگیری آقای دکتر پرویز اهورایی، آزمایش نوروویرولانسن این واکسن در میمون در سال ۱۳۵۴ در موسسه رازی راه‌اندازی شد. قبل از برنامه ریشه‌کنی، فلج اطفال یک نگرانی مهم بهداشت عمومی در ایران بود و

سالانه حدود ۵۰ مورد فلجی گزارش می‌شد. تلاش‌های اولیه نظارتی بر تشخیص موارد فلج شلی حاد (AFP^۲) و همچنین بررسی موارد مشکوک متمرکز بود. با پیوستن ایران به طرح ریشه‌کنی فلج اطفال سازمان بهداشت جهانی (WHO) در سال ۱۹۹۱، برنامه‌های واکسیناسیون معمول با پوشش بالا و فعالیت‌های واکسیناسیون تکمیلی (SIA^۳) مانند روزهای ملی واکسیناسیون (NID^۵) و روزهای محلی واکسیناسیون (SNID^۶) اجرا گردید و سامانه‌های نظارتی قوی و پوشش‌های ایمن‌سازی برقرار شد که منجر به قطع گردش ویروس وحشی فلج اطفال در سال ۲۰۰۰ و اعلام وضعیت عاری از فلج اطفال در سال ۲۰۰۱ در ایران شد. درحالی‌که ایران ویروس فلج اطفال وحشی را ریشه‌کن کرده است، با این حال به دلیل خطر ورود ویروس وحشی از کشورهای همسایه مانند: افغانستان و پاکستان، حفظ هوشیاری مداوم ضروری است. از این رو نمونه‌هایی از موارد AFP که بیشتر شامل نمونه‌های مدفوع است برای آزمایش به آزمایشگاه ملی فلج اطفال ارسال و به‌عنوان بخشی از نظارت، همواره رصد می‌شود. آزمایشگاه ملی فلج اطفال نقش مهمی در آزمایش نمونه‌ها و رد احتمال ابتلا به فلج اطفال ایفا می‌کند. سامانه نظارت AFP ابزار اصلی برای تشخیص موارد بالقوه فلج اطفال، از جمله موارد ناشی از VDPV‌ها است. در ضمن ایران با سازمان بهداشت جهانی و سایر شرکای منطقه‌ای برای حفظ وضعیت عاری از فلج اطفال خود و مقابله با هرگونه تهدید بالقوه همکاری می‌کند (۱۱،۴،۳،۱). با توجه به این که کماکان واکسن خوراکی فلج اطفال تولید و مصرف می‌شود، آزمایش نوروویرولانسن برای اطمینان از ایمنی واکسن خوراکی فلج اطفال، به‌ویژه با توجه به‌احتمال ابتلا به VDPV، حائز اهمیت است.

روش انجام آزمون MNVT

میمون‌هایی که برای آزمایش‌های نوروویرولانسن استفاده می‌شوند باید الزامات تضمین کیفیت، ایمنی و اثربخشی واکسن فلج اطفال زنده ضعیف شده (خوراکی) را داشته و وزن آن‌ها کمتر از ۱٫۵ کیلوگرم نباشد. نمونه سرم گرفته‌شده قبل از تزریق از هر میمون، باید در رقت ۱:۴، در برابر حداکثر ۱۰۰۰ CCID₅₀ از هر یک از دو تیپ ویروس فلج اطفال (تیپ‌های ۱ و ۳)، مجاورت داده شده و فاقد هرگونه پادتن خنثی‌کننده باشد. اگر سازنده واکسن، آزمایش نوروویرولانسن را انجام دهد، برش‌های بافت‌شناسی باید برای ارزیابی در اختیار مرجع نظارتی ملی قرار گیرد. تمام مراحل آزمایش باید توسط کاربرهای ذی‌صلاح و با تجربه انجام شود. اجرا و حفظ صلاحیت باید مستند شود. احتمال

3. Acute Flaccid Paralysis.

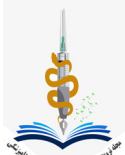
4. Supplementary Immunization Activities.

5. National Immunization Day.

6. Sub-National Immunization Day.

1. Oral Polio Vaccine.

2. Mutant analysis by PCR and restriction enzyme cleavage.



قفس‌ها تقسیم شوند. کلیه گروه‌ها به مدت ۲۲ روز تحت نظر قرار می‌گیرند (این مدت برای بروز علایم فلجی و یا سایر عفونت‌های ویروسی در نظر گرفته شده است). پس از سپری شدن این مدت، میمون‌ها با کتامین هیدروکلراید یا هر ماده دیگری که مناسب تشخیص داده شده باشد، بی‌هوش شده و کالبدگشایی انجام می‌گیرد. در گروه‌های آزمون تیپ ۱، انتظار می‌رود از ۱۵ سر میمون تلقیح شده با ویروس مرجع، حداقل ۱۱ سر علایم بیماری (فلجی) را نشان دهند در حالی که این تعداد در گروه‌های آزمون تیپ ۳، باید ۱۸ سر باشد. البته در گروه‌های آزمایش شده با تیپ‌های ویروس واکسینال نیز ممکن است ضایعاتی دیده شود که در مقایسه با گروه القاشده با ویروس مرجع، بررسی و تفسیر می‌گردند. در آزمایش معتبر، نباید بیش از ۲۰٪ از حیوانات در هر گروه علائم عفونت هم‌زمان را در طول دوره مشاهده نشان دهند. در مطالعات بافت‌شناسی، طناب کمری^۸، طناب گردنی^۹

بیماری‌زایی هر یک از بالک‌های تک‌ظرفیتی واکسن باید در مقایسه با ویروس مرجع با تلقیح به ناحیه کمری دستگاه عصبی مرکزی میمون‌ها آزمایش شوند.

هر یک از تیپ‌های ویروس واکسینال و ویروس مرجع^۷ (ویروس استاندارد سابین) هموتا، به‌طور هم‌زمان در دو گروه مساوی از میمون‌ها، تلقیح می‌شوند. محتویات ویروس واکسینال و نمونه مرجع هموتا، باید تا حد امکان مشابه و با غلظت بین $10^5/5-6$ log10/0.1ml باشند. فقط یک غلظت از ویروس باید به میمون‌ها تلقیح شود.

برای تیپ ۱ ویروس واکسینال و ویروس مرجع آن (Sabin type 1)، تعداد ۱۵ سر میمون برای هر یک از گروه‌ها در نظر گرفته می‌شود. در حالی که برای تیپ ۳ ویروس واکسینال و ویروس مرجع آن (Sabin type 3)، تعداد ۲۰ سر میمون مورد استفاده قرار می‌گیرد. در هر یک از گروه‌ها میمون‌ها باید به‌صورت تصادفی در



تصویر شماره ۱ - میمون آزمایشگاهی نژاد Vervet (Chlorocebus pygerythrus).



تصویر شماره ۲ - برش‌های بزرگ‌شدگی‌های نخاع کمری و گردنی.

8. Lumbar cord.
9. Cervical cord.

7. Reference

شود. از آنجایی که نوع آسیب، چه نفوذ یاخته التهابی و چه تخریب نورون‌ها، مهم است، ضایعات باید به شرح زیر امتیازدهی شوند:

درجه ۱: فقط نفوذ یاخته‌ای، به طور مثال انسداد اطراف عروق؛ نفوذ یاخته‌ای کم، متوسط یا شدید بدون شواهدی از آسیب عصبی (این برای مثبت در نظر گرفتن میمون کافی نیست).

درجه ۲: نفوذ یاخته‌ای با ضایعات عصبی حداقل

درجه ۳: نفوذ یاخته‌ای با آسیب عصبی گسترده

درجه ۴: آسیب عصبی گسترده با یا بدون نفوذ یاخته‌ای.

امتیازات به دست آمده باید در یک برگه استاندارد ثبت شوند.

نمرات حاصله از شدت ضایعات بر اساس قرائت نیم قطعه از برش‌های بافت‌شناسی کمری (L)، گردنی (C) و مغز (B) محاسبه می‌شود. امتیاز ضایعه (LS) برای هر میمون مثبت (میمون‌هایی که ضایعات پاتولوژیک دارند) محاسبه

بصل النخاع تحتانی و فوقانی^{۱۱}، مغز میانی^{۱۲}، نهج^{۱۳} و قشر حرکتی^{۱۴} هر میمون باید تحت بررسی قرار گیرند. مقاطع باید با ضخامت ۱۵ میکرومتر برش داده شده و با گالوسیانین رنگ آمیزی شوند. به عنوان جایگزین رنگ گالوسیانین، می‌توان نمونه‌ها را با ضخامت ۸-۱۵ میکرومتر برش داد و از رنگ آمیزی نیسل کرد (۶).

حداقل تعداد برش‌های مورد بررسی به شرح زیر است:

۱۲ برش نماینده کل بزرگ‌شدگی کمری^{۱۴}

۱۰ برش نماینده کل بزرگ‌شدگی گردنی

۲ برش از بصل النخاع

۱ برش از پل مغزی^{۱۵} و مخچه^{۱۶}

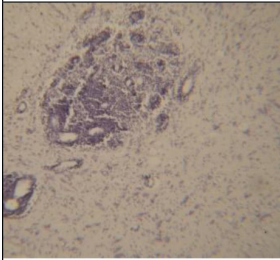
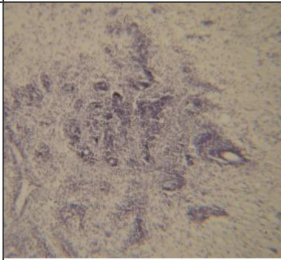
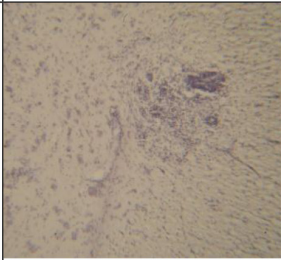
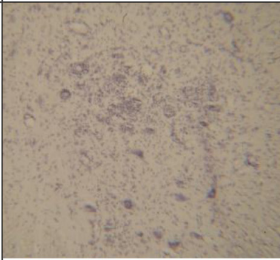
۱ برش از مغز میانی

۱ برش از هر کدام از چپ و راست تالاموس و قشر مغز در ارزیابی فعالیت ویروس در برش‌های نیمه نخاع و ساقه مغز، باید از روشی برای امتیازدهی شدت ضایعات استفاده

10. Lower and upper medulla oblongata.



تصویر شماره ۳- برش‌های نواحی مختلف مغز.

درجه ۴	درجه ۳	درجه ۲	درجه ۱
			
تصویر شماره ۷	تصویر شماره ۶	تصویر شماره ۵	تصویر شماره ۴

تصاویر شماره ۴ الی ۷- نمونه ضایعات و امتیازدهی‌های آن‌ها. رنگ آمیزی گالوسیانین با بزرگنمایی ۱۰۰×.

می‌شود. میانگین امتیاز ضایعه برای هر گروه از میمون‌های مثبت محاسبه می‌شود (۴).

مقایسه فعالیت ویروس در واکسن و نمونه مرجع باید بر اساس فعالیت در ناحیه کمری نخاع و میزان گسترش

11. Mesencephalon.

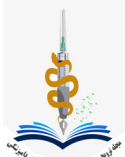
12. Thalamus.

13. Motor cortex.

14. Lumbar enlargement.

15. Pons.

16. Cerebellum.



SPECIES OF MONKEY USED FOR THE NEUROVIRULENCE TEST FOR ORAL POLIOMYELITIS VACCINE. (*)Arch. Ist. Razi, 1979, 31, 17-28.

5- World Health Organization (WHO). Recommendations for the production and control of poliomyelitis vaccine (oral) (Addendum 2000) Annex 1.1 January 2002. | Meeting report

6- World Health Organization (WHO). History of polio vaccination. 4 August 2025. https://www.who.int/health-topics/poliomyelitis#tab=tab_1

7- Zahraei S, Sadrizadeh B, Gouya M. Eradication of Poliomyelitis in Iran, a Historical Perspective. Iran J Public Health. 1; 38(Supple 1):124-126.

8- World Health Organization (WHO). IABS Scientific Workshop on Neurovirulence Tests for Live Virus Vaccines. Meeting report. , Geneva, 31 January - 1 February (2005).

9- Parikshit Tyagi, Milan Ganguly, Satyaprasad Manney, Kuntinath Wadkar, Nilesh Ingle, Sunil Gairola, Rajeev Dhare, Fusataka Koide, Sheila Grimes. Neurovirulence, viscerotropism and immunogenicity of live attenuated yellow fever 17D vaccine virus in non-human primates, Vaccine, Volume 41, Issue 3, 2023, . Pages 836-843, ISSN 0264-410X, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.12.029>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X22015432>)

10- World Health Organization (WHO). STANDARD OPERATING PROCEDURE, NEUROVIRULENCE TEST OF TYPES 1, 2 OR 3 LIVE ATTENUATED, POLIOMYELITIS VACCINES (ORAL) IN MONKEYS. Version, 2012.

11- World Health Organization (WHO). STANDARD OPERATING PROCEDURE NEUROVIRULENCE TEST OF TYPES 1, 2 OR 3 LIVE ATTENUATED POLIOMYELITIS VACCINES (ORAL) IN TRANSGENIC MICE SUSCEPTIBLE TO POLIOVIRUS. Version 8, (2021).

❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖

فعالیت از این ناحیه به ناحیه گردنی و مغز باشد. پذیرش یا رد واکسن باید بر اساس امتیاز کل حیوانات مثبت شده در آزمایش باشد. حیوانات منفردی که فعالیت غیرمعمول بالایی را نشان می‌دهند، چه در ناحیه کمری و چه در نتیجه گسترش از این ناحیه، نیز باید در ارزیابی نهایی در نظر گرفته شوند (۳، ۸ و ۹).

توصیه ترویجی

بیش از ۸۰ سال است به‌عنوان استاندارد طلایی برای ارزیابی ایمنی واکسن خوراکی فلج اطفال استفاده می‌شود. آزمایش نوروویرولانسن برای واکسن‌هایی که ویروس‌های نوروتروپیک را هدف قرار می‌دهند، بسیار مهم است. هر چند MNVT هنوز یک آزمایش مرجع ارزشمند به‌ویژه در موارد اختلاف محسوب می‌شود، ولی به دلایلی روش‌های جایگزین در دستور کار محققان قرار دارد. استفاده از میمون‌ها در تحقیقات، نگرانی‌های اخلاقی را به‌ویژه با توجه به ماهیت تهاجمی آزمایش و توان ایجاد آسیب، افزایش داده است. از طرفی گونه‌های مختلف میمون می‌توانند حساسیت متفاوتی به ویروس نشان دهند، که استانداردسازی آزمایش و تفسیر مداوم نتایج را چالش‌برانگیز می‌کند و خواندن و تفسیر اسلایدهای بافت‌شناسی می‌تواند ذهنی و بین متخصصان متفاوت باشد. به علاوه دسترسی و نگهداری از میمون‌ها برای آزمایش می‌تواند چالش‌برانگیز و گران باشد. از این رو علاقه فزاینده‌ای به توسعه روش‌های جایگزین در وجود دارد. این رویکرد در جهت کاهش وابستگی به پستانداران غیرانسانی (استفاده از موش‌های تراریخته) و استفاده از روش‌های تجزیه و تحلیل مولکولی می‌باشد. سازمان بهداشت جهانی استفاده از موش‌های تراریخته را به‌عنوان جایگزینی برای MNVT برای هر دو نوع ویروس فلج اطفال تأیید کرده است.

فهرست منابع

۱. حاجی‌زاده، افشین، ۱۳۹۴، موسسه رازی درگذر زمان، چاپ اول، انتشارات موسسه رازی.
- 2- Gomez-Fernandez, M. Higley, K. Tokuhito, A. Welter, K. Wong, W K. Yang, H. Status of research and development of learning-based approaches in nuclear science and engineering: A review. Nuclear Engineering and Design. Volume 359, 1 April 2020, 110479.
- 3- Moussavi T, Sadrizadeh B, Zahraei M, Nategh R, Nadim A. Global Polio Eradication and the Present Situation in Iran. Arch Iran Med. 2012; 15(2): 107 - 109.
- 4- Boulger, L. R. Arya, S.c. Ahourai, P. and Marsden, S. A. INTERNATIONAL COMPARISON OF