

ارزیابی میزان آنتی‌بادی‌ها بر علیه ویروس‌های هپاتیت در فرآورده ایمونوگلوبولین تزریق وریدی تهیه شده از پلاسمای ایرانی

مریم زادسر^۱، زهره شریفی^۲، افسانه آقایی^۳

چکیده

سابقه و هدف

ایمونوگلوبولین تزریق وریدی، یک محصول بیولوژیکی حاوی IgG است که برای محافظت از بیماری‌های خاص در برابر پاتوژن‌های میکروبی استفاده می‌شود. به دلیل کاهش شیوع هپاتیت‌های ویروسی سراسر جهان، اثر محافظتی ایمونوگلوبولین‌ها در درمان نیاز به بررسی مجدد دارد. لذا آنتی‌بادی‌های anti-HAV و anti-HBs، anti-HGV، anti-HEV و anti-HDV در IVIG های ساخته شده از پلاسمای ایرانی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی توصیفی، حضور و یا عدم حضور آنتی‌بادی علیه هپاتیت A، E، D، G و آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B و آنتی‌ژن هسته هپاتیت B در ۳۸ سری ساخت مختلف محصول IVIG از پلاسمای باز یافتی و یا پلاسمای منبع با روش الایزا تعیین و آنتی‌بادی ضد HAV و ضد HBs تیتراژ گردید. یافته‌ها توسط آزمون t مستقل و SPSS ۲۳ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

تیتراژ anti-HAV در محصول IVIG برابر با 17735 ± 38304 mIU/mL بود و این تیتراژ در IVIG های تولید شده از پلاسمای باز یافتی به طور قابل توجهی بالاتر بود. تیتراژ anti-HBs در محصول IVIG برابر با mIU/mL 965 ± 2487 بود که تفاوت معناداری بین دو نوع پلاسمای منبع و باز یافتی مشاهده نگردید. آنتی‌بادی anti-HBc، anti-HEV و anti-HGV در همه محصولات مورد مطالعه شناسایی شد، و هیچ آنتی‌بادی ضد HDV یافت نشد.

نتیجه‌گیری

با وجود کاهش شیوع هپاتیت‌های ویروسی و گزارش‌های کاهش تیتراژ آنتی‌HAV و HBs در محصولات IVIG تولید شده در دنیا، محصولات IVIG پلاسمای ایرانی دارای تیتراژ قابل قبول آنتی‌HAV و آنتی‌HBs طبق فارماکوپه اروپا بوده و برای درمان جایگزینی مناسب می‌باشد.

کلمات کلیدی: ایمونوگلوبولین تزریق وریدی (IVIG)، هپاتیت‌ها، ایران، پلاسما

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰

۱- متخصص بیماری‌های عفونی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- PhD ویروس شناسی - استاد مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۳- مؤلف مسئول: PhD ایمنی‌شناسی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

مقدمه

ایمونوگلوبولین تزریقی وریدی (IVIG)، یک محصول درمانی مشتق از پلاسمای انسانی و شامل مخلوطی از IgG است که از پلاسمای تازه منجمد شده (FFP) اهداکنندگان خون کامل (پلاسمای بازیافتی) و یا پلاسمای آفرزیس (پلاسمای منبع) به دست می‌آید. تجویز IVIG به عنوان یک درمان جایگزین در بیماران مبتلا به نقص ایمنی اولیه و یا ثانویه است. هم‌چنین یکی از مصارف اساسی برای این محصول بیولوژیکی، استفاده در درمان‌های تعدیل ایمنی می‌باشد. برای محافظت از بیماران در برابر پاتوژن‌های میکروبی مختلف از جمله باکتری‌ها و ویروس‌ها، طیف گسترده‌ای از آنتی‌بادی‌ها مورد نیاز است (۱، ۲).

محصولات ایمونوگلوبولین برای اخذ الزامات قانونی باید حاوی حداقل سطوح آنتی‌بادی علیه دیفتیری، سرخک و ویروس فلج اطفال طبق فارماکوپه آمریکا، و علاوه بر این باید حاوی آنتی‌بادی علیه هپاتیت B طبق قوانین اروپا نیز باشد (۳، ۱). اگرچه، سطح حفاظت‌کننده آنتی‌بادی به طور دقیق در برابر سایر ویروس‌ها وجود ندارد. محصولات IVIG از منابع مختلف پلاسمای انسانی به دست می‌آید و سطح آنتی‌بادی در برابر باکتری‌ها و ویروس‌های مختلف از یک بچ تولیدی به بچ دیگر متفاوت است (۴). میزان آنتی‌بادی‌ها در IVIG مستقیماً تحت تأثیر پاتوژن‌های بومی و شیوع عفونت‌ها در یک منطقه قرار می‌گیرد. بنابراین، تولید آنتی‌بادی در اهداکنندگان در مناطق مختلف جغرافیایی بر اساس میزان قرار گرفتن در معرض پاتوژن خاص به صورت عفونت طبیعی و یا واکسیناسیون متفاوت است (۴).

در دهه ۱۹۹۰، پس از پیدایش و گسترش اپیدمی ویروس نیل غربی (WNV)، افزایش قابل توجهی در سطح آنتی‌بادی ضد WNV در محصولات ایمونوگلوبولین مشاهده شد و مثبت شدن سرمی (Seroconversion) در جمعیت مورد تایید قرار گرفت (۵). از آن زمان به بعد، مطالعه بر روی میزان آنتی‌بادی‌های IVIG به عنوان یک ابزار اپیدمیولوژیک ارزشمند در نظر گرفته شد.

از طرف دیگر، اندمیسیتی ویروس‌های هپاتیت در سراسر جهان به دلیل بهبود وضعیت اجتماعی-اقتصادی،

افزایش بهداشت آب و غذا، هم‌چنین برقراری برنامه گسترده واکسیناسیون و موارد دیگر کاهش یافته است. به همین دلیل تأثیر این الگو بر محتوای پلاسمای انسانی باید بررسی و تعیین گردد که با وجود تغییرات در میزان آنتی‌بادی‌ها در پلاسما و در نتیجه در IVIG، آیا هنوز این محصولات در درمان‌های جایگزینی مناسب می‌باشند (۶).

علاوه بر این، انجام مطالعه‌های سرواپیدمیولوژیک در مورد ایمن‌سازی و میزان در معرض پاتوژن‌های خاص قرار گرفتن، به عنوان مثال هپاتیت و ویروسی، در جمعیت عمومی بسیار هزینه‌بر و به دلیل نیاز به بررسی بر روی حجم نمونه بسیار بزرگ دشوار است. ایمونوگلوبولین تزریقی وریدی از پلاسمای هزاران اهداکننده سالم به دست می‌آید و بررسی سطح آنتی‌بادی‌ها در برابر پاتوژن‌های مشخص، نشانه‌ای از مواجهه یا عدم مواجهه با پاتوژن و یا بررسی بومی بودن پاتوژن در جمعیت عمومی جامعه می‌باشد. از این رو، در مطالعه حاضر محتوای آنتی‌بادی‌های ضد ویروس‌های هپاتیت در محصولات ایمونوگلوبولین ساخته شده از پلاسمای ایرانی، اعم از پلاسمای بازیافتی و یا پلاسمای منبع، مورد مطالعه قرار گرفت و تیتراژ آنتی‌هپاتیت A و آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B تعیین شد و وجود یا عدم وجود آنتی‌بادی علیه HBc، HEV، HDV و HGV بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی توصیفی، جامعه مورد مطالعه سری‌های ساخت ایمونوگلوبولین تزریقی وریدی تهیه شده از پلاسمای ایرانی بود که به صورت تصادفی نمونه‌گیری انجام شد و بر اساس شیوع آنتی‌بادی در جامعه و حسب مطالعه‌های قبلی مقدار حداقل بیست نمونه انتخاب گردید. بنابراین محصولات IVIG به تعداد ۳۸ ویال به طور تصادفی انتخاب و وارد مطالعه شد. این محصولات از شرکت مادر تخصصی پالایش و پژوهش خون (IBRF) و شرکت درمان آرا تهیه گردید. ویال‌های IVIG از شرکت مادر تخصصی پالایش و پژوهش خون از پلاسمای بازیافتی و ویال‌های IVIG از شرکت درمان آرا از پلاسمای منبع تهیه شده بود. کیت‌های بیوراد - فرانسه برای بررسی

مرحله‌ای است و برای نمونه‌های سرم، لیزات سلولی، سوپرناتانت کشت سلولی و سایر مایعات بیولوژیکی قابل استفاده است.

برای تعیین کیفی وجود آنتی‌بادی علیه ویروس هپاتیت D (HDV)، کیت تشخیصی ELISA استفاده شد. ویروس هپاتیت D یک ویروس اقماری هپاتیت B است و فقط افرادی را آلوده می‌کند که به ویروس هپاتیت B (HBV) مبتلا شده باشند و باعث نارسایی حاد کبد در ناقلین HBs-Ag می‌شود. کیت تشخیصی ELISA بر اساس واکنش رقابتی سازماندهی شده است، به این معنی که اگر هر گونه anti-HDV در نمونه موجود باشد، برای اتصال به HDV پوشش داده شده به میکروپلیت، با anti-HDV نشاندار کیت رقابت می‌کند. مقدار آنتی‌بادی متصل به فاز جامد (میکروپلیت) و فعالیت آنزیمی متعاقب آن با غلظت anti-HDV در نمونه و یا کنترل مثبت رابطه معکوس دارد. فعالیت آنزیمی باعث ایجاد رنگ می‌شود که توسط نورسنجی اندازه‌گیری می‌شود.

یافته‌ها

بر اساس آزمون آماری تی تست مستقل (SPSS 23)، نتایج نشان داد که میانگین تیتراژ Anti-HAV در پلاسماهای بازیافتی 16380 ± 53174 mIU/mL با فاصله اطمینان ۹۵٪ (CI)، برابر با $62078/791$ و $44270/449$ بود، در حالی که تیتراژ مرتبط در پلاسماهای منبع 12989 ± 30572 mIU/mL با فاصله اطمینان ۹۵٪ (CI)، برابر با $35663/69$ و $25480/31$ بود. میانگین کل تیتراژ در محصول IVIG بدون توجه به نوع پلاسماهای FFP (بازیافتی و یا منبع) $17735 \pm 32665/4848$ و $43943/4552$ برابر با CI ۹۵٪ بود (جدول ۱). تفاوت در تیتراژ آنتی‌بادی بین پلاسماهای بازیافتی و پلاسماهای منبع معنادار بود و بچ‌های IVIG حاصل از پلاسماهای بازیافتی حاوی مقادیر بالاتری از anti-HAV نسبت به پلاسما بود ($p < 0/0001$).

میانگین تیتراژ anti-HBs در پلاسماهای بازیافتی 471 ± 2186 با CI ۹۵٪ برابر با $2442/21$ و $1930/08$ بود، در حالی که در پلاسماهای منبع میانگین تیتراژ به میزان 1124 ± 2650 با CI ۹۵٪ برابر با $3091/55$ و

anti-HAV (Monalisa™ Anti-HBs plus) برای anti-HBc (Monalisa™ Anti-HAV plus) و برای anti-HBc (Monalisa™ Anti-HBc plus) به روش ELISA مورد استفاده قرار گرفت. در مورد anti-HDV از کیت دیاسورین - ایتالیا (ETI-DELTA-IGMK-2) استفاده شد. هم چنین anti-HGV و anti-HEV توسط کیت‌های زلیو - آلمان مورد بررسی قرار گرفت. برای سنجش کمی میزان آنتی‌بادی توتال آنتی HBs، ابتدا دو نمونه به صورت تصادفی تیتراژ شد و تیتراژی بسیار بالا مشاهده گردید. بنابراین، برای به دست آوردن تیتراژ متناسب با محدوده خطی استاندارد، رقت سریال تهیه شد. یک نمونه از پلاسماهای بازیافتی و یک نمونه از پلاسماهای منبع برای انجام رقت سریال و به دست آوردن تیتراژ بهینه رقیق‌سازی انتخاب شد. رقت صفر (نمونه بدون رقیق‌کننده) و رقت‌های سریال 10^{-1} تا 10^{-6} از هر دو نمونه تهیه و طبق استاندارد کیت آزمایش شد و رقت 10^{-1} در محدوده خطی استاندارد کیت قرار گرفت و انتخاب شد. همه نمونه‌ها با نرمال سالین به نسبت ۱:۱۰ رقیق و سپس آزمایش و نتایج با در نظر گرفتن ضریب رقت گزارش شد.

برای اندازه‌گیری کمی آنتی‌HCV نیز از ایمونواسی آنزیمی استفاده شد. ابتدا دو نمونه به صورت تصادفی تیتراژ شد و تیتراژی بسیار بالا مشاهده گردید. بنابراین، برای به دست آوردن تیتراژ متناسب با محدوده خطی استاندارد کیت، برای یک نمونه از پلاسماهای بازیافتی و یک نمونه از پلاسماهای منبع، رقت‌های سریال 10^{-1} تا 10^{-6} مطابق روش ذکر شده برای آنتی HBs، تهیه و تیتراژ بهینه رقیق‌سازی 10^{-3} انتخاب شد. همه نمونه‌ها با نرمال سالین به نسبت ۱:۱۰۰۰ رقیق، آزمایش و سپس با محاسبه ضریب رقت گزارش گردید. هم‌چنین کیت ELISA غیرمستقیم با میکروپلیت‌های پوشش داده شده توسط آنتی‌ژن‌های نوترکیب برای تشخیص آنتی‌بادی توتال (IgM و IgG) علیه آنتی‌ژن‌های هسته‌ای ویروس هپاتیت B استفاده شد.

علاوه بر این، وجود آنتی‌بادی علیه HEV و یا HGV نیز با روش کیفی تعیین شد. کیت زلیو، برای ارزیابی HEV-IgG و نیز HGV-IgG استفاده گردید. این کیت بر اساس ساندویچ ELISA کار می‌کند و شامل یک سنجش کیفی دو

جدول ۱: تیتراژ anti-HAV در پلاسماهای بازیافتی و منبع

پلاسما منبع	تعداد بچ	حداقل	حداکثر	متوسط	انحراف معیار $\pm$ میانگین	%۹۵ CI	p value
بازیافتی	۱۳	۱۳۸۶۰	۷۴۹۵۰	۵۶۹۸۰/۰۰	$16380/126 \pm 53174/62$	۴۴۲۷۰/۴۴-۶۲۰۷۸/۷۹	
منبع	۲۵	۶۴۳۰	۵۵۳۰۰	۳۰۶۴۰/۰۰	$12989/246 \pm 30572/00$	۲۵۴۸۰/۳۱-۳۵۶۶۳/۶۹	$p < 0/0001$
جمع	۳۸	۶۴۳۰	۷۴۹۵۰	۳۵۹۶۰/۰۰	$17735/556 \pm 38304/47$	۳۲۶۶۵/۴۸-۴۳۹۴۳/۴۵	

* All antibody levels are measured in mIU/mL

جدول ۲: تیتراژ anti-HBs در پلاسماهای بازیافتی و منبع

نوع پلاسما	تعداد بچ	حداقل	حداکثر	متوسط	انحراف معیار $\pm$ میانگین	%۹۵ CI	p value
بازیافتی	۱۳	۱۵۲۰	۳۱۴۰	۲۱۰۰/۰۰	$471/054 \pm 2186/15$	۱۹۳۰/۰۸-۲۴۴۲/۲۱	
منبع	۲۵	۷۲۰	۴۱۸۰	۲۹۰۰/۰۰	$1124/308 \pm 2650/83$	۲۲۱۰/۱۰-۳۰۹۱/۵۵	$p < 0/16$
جمع	۳۸	۷۲۰	۴۱۸۰	۲۲۱۰/۰۰	$965/475 \pm 2487/57$	۲۱۸۰/۵۹-۲۷۹۴/۵۴	

* All antibody levels are measured in mIU/mL

جدول ۳: وجود و یا عدم وجود anti-HBc ، anti-HGV ، anti-HEV و anti-HDV در پلاسماهای بازیافتی و منبع

نوع پلاسما	تعداد بچ	anti-HBc detected	anti-HGV detected	anti-HEV detected	anti-HDV detected
بازیافتی	۱۳	۱۳ (۱۰۰٪)	۱۳ (۱۰۰٪)	۱۳ (۱۰۰٪)	۰ (۰٪)
منبع	۲۵	۲۵ (۱۰۰٪)	۲۵ (۱۰۰٪)	۲۵ (۱۰۰٪)	۰ (۰٪)
جمع	۳۸	۳۸ (۱۰۰٪)	۳۸ (۱۰۰٪)	۳۸ (۱۰۰٪)	۰ (۰٪)

* All antibody levels are measured in mIU/mL

ایمونوگلوبولین تزریق وریدی تهیه شده از پلاسماهای ایرانی برای اولین بار در ایران گزارش شده است. در این مطالعه تیتراژ آنتی‌بادی anti-HAV و anti-HBs تعیین و نشان داده شد که تیتراژ این آنتی‌بادی‌ها در محصولات IVIG ساخته شده از پلاسماهای ایرانی در سطح بالاتری نسبت به محصولات اروپایی و آمریکایی قرار دارد. هم‌چنین آنتی‌بادی علیه HBc ، HEV ، HDV و HGV در محصولات IVIG ساخته شده از پلاسماهای ایرانی بررسی گردید.

انتقال غیرفعال آنتی‌بادی‌ها به منظور پیشگیری و درمان عفونت‌های ویروسی سال‌هاست که مورد تایید و استفاده قرار گرفته است (۷). منبع اصلی آنتی‌بادی برای این نوع درمان، استفاده از فرآورده ایمونوگلوبولین تزریق وریدی و یا همان IVIG است که از پلاسما به دست می‌آید و حاوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی بیماری‌های ویروسی مانند

۲۲۱۰/۱۰ مشاهده شد. میانگین کل تیتراژ در محصول IVIG بدون توجه به نوع پلاسما (بازیافتی و یا منبع) 2487 ± 965 mIU/mL برابر با $2794/54$ و $2180/59$ بود (جدول ۲). اگر چه تیتراژ anti-HBs در پلاسماهای بازیافتی در مقایسه با پلاسماهای منبع کمتر بود، اما این تفاوت در تیتراژ آنتی‌بادی معنادار نبود. در تمام نمونه‌های IVIG مورد ارزیابی (پلاسماهای بازیافتی و پلاسماهای منبع)، anti-HBc مثبت (۱۰۰٪) گزارش گردید. هم‌چنین در تمام نمونه‌ها نتایج مثبت (۱۰۰٪) برای anti-HEV و anti-HGV مشاهده شد و کلیه نمونه‌ها از نظر anti-HDV منفی (۱۰۰٪) گزارش شدند (جدول ۳).

بحث

میزان آنتی‌بادی بر علیه ویروس‌های هپاتیت در فرآورده

سیتومگالوویروس، ویروس‌های هپاتیت A، B، C، HIV، ویروس سنسیشیال تنفسی، ویروس سرخک و ویروس واریسلا زوستر می‌باشد (۸، ۷). تعداد کمی از محصولات ایمونوگلوبولینی خاص مانند محصول هیپرایمیون حاوی anti-HBs یا همان HBIG وجود دارد، اما این محصولات گرانقیمت هستند و در همه جا قابل دسترس نیستند. علاوه بر این، برای بسیاری از بیماری‌ها، محصول هیپرایمیون گلوبولین اختصاصی در دسترس نیست و در این موارد محصولات طبیعی ایمونوگلوبولین و همان IVIG، تنها انتخاب برای درمان جایگزین می‌باشد.

با توجه به این واقعیت که فرآورده‌های خونی اهداکنندگان و در واقع پلاسما اهداکنندگان حاوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه ویروس‌های خاص هستند، انتظار می‌رود افراد با سابقه ابتلا به عفونت در گذشته و یا پس از واکسیناسیون حاوی سطوح فزاینده‌ای از این آنتی‌بادی‌ها در پلاسما و متعاقب آن در محصولات ایمونوگلوبولین باشند. به همین منظور از پلاسما این افراد برای تهیه محصولات هیپرایمیون استفاده شده است. به عنوان مثال، وجود آنتی‌بادی با تیترا بالا علیه ویروس نیل غربی در برخی از اهداکنندگان اسرائیلی (فلسطین اشغالی) منجر به تولید محصولات ایمونوگلوبولین هیپرایمیون علیه ویروس نیل غربی شده است (۹).

در فرآیند تولید IVIG به سبب تغییر در میزان آنتی‌بادی‌ها در پلاسما اهداکنندگان، تغییرات در غلظت آنتی‌بادی‌ها در محصول نهایی ایجاد می‌شود و تعیین حداقل معیارهای مشخص برای این آنتی‌بادی‌ها دشوار است. با این حال، انواع مختلفی از تحقیقات برای ارزیابی مشکلات انجام شده است (۱۰). اگر چه برای بعضی از این آنتی‌بادی‌ها برای مثال برای anti-HAV حداقل سطح حفاظتی در فارماکوپه تعریف شده است، اما تعیین آن برای کلیه آنتی‌بادی‌ها امکان‌پذیر نمی‌باشد. به همین دلیل پایش آنتی‌بادی‌های خاص در فرآورده‌های ایمونوگلوبولینی برای تدوین گایدلاین مناسب در سیاست‌گذاری‌های درمانی و به صورت ارزیابی دوره‌ای توصیه گردیده است (۱۱).

در ۵۰ سال گذشته، کاهش قابل توجهی در شیوع عفونت هپاتیت A در دنیا مشاهده شده است. مطالعه‌ای در

اروپا (اتریش، آلمان و جمهوری چک) نشان داد که این کاهش در حال حاضر نیز ادامه دارد، به طوری که anti-HAV بیش از یک سوم در پلاسما انسان کاهش یافته است (۶). در سال ۲۰۱۶، سطح تیترا آنتی‌بادی علیه ویروس‌های هپاتیت A و B در محصولات ایمونوگلوبولینی تولید شده در کره ارزیابی و سطح تیترا آنتی‌بادی‌ها با محصولات تولید شده در ایالات متحده و ژاپن مقایسه گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که سطح آنتی‌بادی‌های anti-HAV در کره و ایالات متحده آمریکا در مقایسه با ژاپن بالاتر است. با این حال، حداقل سطح حفاظتی ۲۰ mIU/mL در همه محصولات از هر سه کشور موجود بود (۱۱). مطالعه اخیر بر روی محصولات حاصل از پلاسما ایرانی نشان داد که این محصولات دارای سطح بالاتری از anti-HAV در مقایسه با محصولات کره‌ای بوده و این تفاوت برابر با ۳۲۶۶۵-۴۳۹۴۳ (mIU/mL) و محصول ایرانی در مقابل ۷۱۵۴-۴۴۸۹ (mIU/mL) بوده است.

پس از عفونت با HAV، تیترا آنتی‌بادی در سرم ۳ تا ۳۰ برابر بیشتر از میزان مشاهده شده توسط واکسیناسیون HAV افزایش می‌یابد. حد آستانه میزان آنتی‌بادی پس از عفونت ۱۱۴۰۰ mIU/mL و پس از واکسیناسیون ۳۲۶۶۵-۴۳۹۴۳ (mIU/mL) گزارش شده است. بنابراین بهبود و گسترش واکسیناسیون عمومی در بسیاری از کشورها دلیل اصلی کاهش تیترا آنتی‌بادی در پلاسما می‌باشد (۱۲).

فارست و همکاران نشان داده‌اند که در نتیجه کاهش anti-HAV در پلاسما اروپایی (۲۴٪) و در ایالات متحده آمریکا (۴۱٪)، از سال ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۷، تیترا آنتی‌بادی در محصولات IVIG نیز کاهش یافته است. بر این اساس، تفاوت تیترا anti-HAV در محصولات اروپایی به میزان ۶۸۰ ± ۲۲۹۱۰ mIU/mL نسبت به محصولات آمریکایی ۴۸۰ ± ۱۴۶۰۰ mIU/mL معنادار بوده است. این تفاوت را می‌توان در نتیجه استراتژی‌های مختلف واکسیناسیون در آن مناطق توصیف کرد. در ایالات متحده، واکسیناسیون به طور معمول در دوران کودکی انجام می‌شود در حالی که در اروپا واکسیناسیون به میزان کمتری ارائه می‌شود که منجر به بروز طبیعی عفونت HAV می‌گردد (۶). مقدار

بالتر آنتی HAV در محصولات مشتق از پلاسما ایرانی را می‌توان به عنوان پیامد عفونت طبیعی مکرر در اهداکنندگان ایرانی توصیف کرد.

همچنین در این مطالعه مشخص شد که میانگین تیتراژ anti-HAV در پلاسماهای بازیافتی به طور معناداری بیشتر از پلاسماهای منبع، 53174 mIU/mL در مقایسه با 30572 mIU/mL بوده است. پلاسماهای منبع معمولاً از افراد جوان اهداکننده پلاسما به دست می‌آید که شانس کمتری برای آلوده شدن و یا در معرض قرار گرفتن قبلی با عفونت HAV داشته‌اند. به عبارت دیگر افراد در طیف سنی جوان‌تر در مقایسه با اهداکنندگان پلاسماهای بازیافتی، مواجهه کمتر با عفونت داشته و به این صورت مقادیر بالاتر anti-HAV در پلاسماهای بازیافتی قابل توضیح می‌باشد. اما با توجه به طیف گسترده اهداکنندگان، رنج وسیع فاصله بین حداقل و حداکثر تیتراژ در هر دو گروه پلاسماهای بازیافتی و منبع ملاحظه می‌گردد.

تاکنون هیچ الزامی برای سطح آنتی‌بادی‌های HAV در فارماکوپه در مورد فرآورده IVIG تعیین نشده است. با این حال مقامات ذیصلاح تیتراژ آنتی‌بادی بیش از 10 mIU/mL را در هر محصول جدید پیشنهاد می‌کنند، اگر چه که نمی‌توان به راحتی این سطح را در هر بچ تولید حفظ کرد (۱۳). به همین دلیل هم اندازه‌گیری و پایش مداوم تیتراژ آنتی‌بادی‌های خاص در محصولات مختلف ایمونوگلوبولین ضروری است (۱۲).

باید این نکته را مد نظر قرار داد که فرآیند تولید محصولات ایمونوگلوبولین نیز می‌تواند بر تیتراژ آنتی‌بادی محصول نهایی تأثیر بگذارد. محصولات ایمونوگلوبولینی تولید شده از پلاسماهای ایرانی حاوی تیتراژ 1000 برابر بالاتر از حداقل سطح ضروری برای ممانعت از ایجاد عفونت توسط HAV است (۶).

در مطالعه حاضر تیتراژ anti-HBs در محصول IVIG در پلاسماهای بازیافتی کمتر از پلاسماهای منبع بوده است، اگر چه این تفاوت با p value کمتر از 0.05 معنادار نبود. این موضوع به علت واکسیناسیون کشوری هپاتیت B از سال ۱۹۹۴ برای نوزادان قابل توجه است، چرا که اهداکنندگان پلاسماهای منبع اغلب از افراد جوان جامعه می‌باشند که

واکسیناسیون هپاتیت B بر روی آنها انجام گرفته است و به همین دلیل HBs Ab در پلاسماهای آنها نسبت به افراد واکسینه نشده تیتراژ بالاتری را نشان می‌دهد. مطالعه‌ها نشان داده است که تیتراژ anti-HBs در محصولات مختلف ایمونوگلوبولین بسته به منشأ تولید محصولات متفاوت بوده است. محصولات ساخت ایالات متحده در مقایسه با فرآورده‌های ساخت کره تیتراژ بالاتری را نشان داده است. با این حال و با وجود کاهش تیتراژ در محصولات کشور کره حتی نسبت به مطالعه‌های پیشین، محصولات هم در کشور کره و هم در آمریکا غلظت مناسب anti-HBs و در حد بالاتر از حداقل سطح حفاظتی (minimal protective level)، به میزان 10 mIU/mL را داشته است. این موضوع عمدتاً به استراتژی‌های مختلف ملی ایمن‌سازی در این کشورها مرتبط است، در کشور آمریکا و کره واکسیناسیون روتین از سال ۱۹۹۱ آغاز شده است. هر چند وقوع طبیعی عفونت‌های مختلف، ایمنی‌زایی واکسن‌ها و دیگر عوامل نیز می‌تواند در محصولات هر کشور تأثیرگذار باشد (۱۱).

حداقل تیتراژ آنتی‌بادی بر علیه هپاتیت B برای محصول IVIG در فارماکوپه اروپا برابر با 0.5 IU/g IgG تعیین شده است (۳).

مقادیر آنتی‌بادی در محصولات ایمونوگلوبولین تهیه شده از پلاسماهای ایرانی تیتراژ بسیار بالاتری را نسبت به مطالعه انجام گرفته توسط سویانگ و همکارانش نشان داده است. در مطالعه سویانگ تیتراژ anti-HBs در محصولات کره بین $438-965 \text{ mIU/mL}$ و در محصولات ژاپن بین $157-123 \text{ mIU/mL}$ و در محصول مشابه آمریکایی 1945 mIU/mL گزارش شده بود. بنابراین میانگین تیتراژ مشاهده شده 2487 mIU/mL در مطالعه اخیر و در محصول به دست آمده از پلاسماهای ایرانی به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از مطالعه سویانگ می‌باشد.

نتایج به دست آمده نشان‌دهنده وضعیت ایمنی هزاران اهداکننده خون سالم است و بنابراین می‌تواند ابزار ارزشمندی برای مطالعه‌های سرواپیدمیولوژیک باشد. میزان بروز عفونت‌های HBV و HAV در کشورهای توسعه یافته در مقایسه با کشورهای در حال توسعه کمتر است. البته این نکته حائز اهمیت است که عفونت HAV وابستگی

نتیجه‌گیری

علی‌رغم روند رو به کاهش شیوع عفونت‌های هپاتیت ویروسی (A & B) در دنیا و نگرانی ناشی از احتمال تاثیر این میزان کاهش در فرآورده‌های ایمونوگلوبولینی از نظر تامین سطوح حفاظتی آنتی‌بادی در بیماران، این مطالعه نشان داد تیتراژ آنتی‌بادی موجود در محصولات تهیه شده از پلاسماهای ایرانی برای درمان‌های جایگزینی مناسب می‌باشد. در واقع تیتراژ آنتی‌بادی‌ها بر علیه ویروس هپاتیت A و یا B، نه تنها برای درمان‌های جایگزینی کافی به نظر می‌رسد، بلکه از مقادیر ذکر شده در مطالعه‌های اروپا و آمریکا بالاتر نیز بوده است. بنابراین دو نکته اساسی در این مطالعه قابل استنتاج می‌باشد. اول این که تیتراژ متفاوت آنتی‌بادی‌ها در انواع مختلف پلاسما (پلاسماهای بازیافتی و یا پلاسماهای منبع) می‌تواند در برنامه‌ریزی‌های استراتژیک پلاسمایی مد نظر قرار گیرد. دوم این که تیتراژ آنتی‌بادی‌ها بر علیه هپاتیت B و A از تیتراژهای موجود در مطالعه‌های انجام گرفته در دنیا بسیار بالاتر بوده است. بنابراین از آن جایی که برای تهیه مشتقات پلاسمایی، پلاسما بدون هیچ‌گونه غربالگری اولیه مورد استفاده قرار گرفته است، در صورتی که هدف تهیه محصولات ایمونوگلوبولینی هیپرایمیون باشد، غربالگری اولیه و انتخاب افراد با تیتراژ آنتی‌بادی بالا، برای تولید محصولات اختصاصی و هیپرایمیون پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این پروژه تحقیقاتی توسط مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین مالی شده است. همچنین بدین وسیله از شرکت پالایش و پژوهش خون برای اهدای ویال‌های IVIG تهیه شده از پلاسماهای بازیافتی و از شرکت درمان آرا برای اهدای ویال‌های IVIG تهیه شده از پلاسماهای منبع، تشکر و قدردانی می‌شود.

زیادی به وضعیت اجتماعی و اقتصادی جامعه دارد، در حالی که ابتلا به HBV از طریق خون، سمن و یا انتقال پری‌ناتال از مادر آلوده به نوزاد صورت می‌گیرد و به همین دلیل تیتراژ آنتی‌بادی در کشورهای توسعه یافته کمتر از کشورهای در حال توسعه است. اگرچه واکسیناسیون گسترده نقش مهمی در پیشگیری از عفونت ایفا می‌کند، اما توجه به این نکته مهم است که بدون مواجهه طبیعی و یا واکسیناسیون بدون پاسخ‌های یادآور تقویت‌کننده، تیتراژ آنتی‌بادی به تدریج کاهش می‌یابد (۱۱).

تمام محصولات IVIG به دست آمده از پلاسماهای ایرانی، Anti-HGV، Anti-HEV، Anti-HBC مثبت بودند. در مورد عفونت ویروسی هپاتیت E و در مطالعه آنکورن، ۱۰ محصول مختلف از ایمونوگلوبولین مورد بررسی قرار گرفت که همه آن‌ها سطح مناسبی از anti-HEV داشته و قادر به خنثی کردن آنتی‌ژن‌های HEV بودند (۱۴). در همین راستا مطالعه‌های سال‌های اخیر در نقاط مختلف ایران، عفونت ویروسی هپاتیت E را به صورت اندمیک و با شیوع سرمی HEV ۱۰٪ نشان داده است که این میزان در ایران مشابه عربستان سعودی، کمتر از کشورهای آسیای جنوبی و بیشتر از کشورهای اروپایی بوده است (۱۶، ۱۵)، به طوری که وجود anti-HEV در تمام محصولات کمک به سلامت اولیه کرده و از ایجاد عفونت در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی جلوگیری می‌کند. در مورد عفونت ویروسی هپاتیت G بر اساس مطالعه آمینی و همکاران، HGV یک ویروس شایع در ایران است و در ۴/۸٪ اهداکنندگان HGV RNA گزارش شده است (۱۷). بنابراین همان طور که قابل پیش‌بینی هم بود در کلیه محصولات IVIG تهیه شده از پلاسماهای ایرانی anti-HGV و نیز anti-HEV مثبت گزارش گردید، در حالی که anti-HDV در کلیه محصولات منفی بود.

References:

- 1- Additional Standards for Human Blood and Blood Products: Part 640 : Food and Drugs Administration; 2019. Available from: [https:// www. govinfo. gov/ content/ pkg/CFR-2019-title21-vol7/xml/CFR-2019-title21-vol7-part640.xml](https://www.govinfo.gov/content/pkg/CFR-2019-title21-vol7/xml/CFR-2019-title21-vol7-part640.xml).
- 2- Guideline on core SmPC for human normal immunoglobulin for intravenous administration (IVIg): European Medicines Agency: Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); 2021. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/ documents/ scientific-guideline/guideline-core-smpc-human-normal-immunoglobulin-intravenous-administration-ivig-rev-6_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-core-smpc-human-normal-immunoglobulin-intravenous-administration-ivig-rev-6_en.pdf).
- 3- European Pharmacopoeia. 10th ed. Council of Europe, Strasbourg Cedex, France: Human normal immunoglobulin for intravenous administration; 2019. p. 2862-3.
- 4- Lejtenyi D, Mazer B. Consistency of protective antibody levels across lots of intravenous immunoglobulin preparations. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(1): 254-5.
- 5- Planitzer CB, Modrof J, Kreil TR. West Nile virus neutralization by US plasma-derived immunoglobulin products. *J Infect Dis* 2007; 196(3): 435-40.
- 6- Farcet MR, Planitzer CB, Stein O, Modrof J, Kreil TR. Hepatitis A virus antibodies in immunoglobulin preparations. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(1): 198-202.
- 7- Keller MA, Stiehm ER. Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(4): 602-14.
- 8- Casadevall A, Dadachova E, Pirofski LA. Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2(9): 695-703.
- 9- Ben-Nathan D, Gershoni-Yahalom O, Samina I, Khinich Y, Nur I, Laub O, *et al.* Using high titer West Nile intravenous immunoglobulin from selected Israeli donors for treatment of West Nile virus infection. *BMC Infect Dis* 2009; 9(1): 1-8.
- 10- Assarehzadegan MA, Shakerinejad G, Amini A, Rezaee SR. Seroprevalence of hepatitis E virus in blood donors in Khuzestan Province, southwest Iran. *Int J Infect Dis* 2008; 12(4): 387-90.
- 11- Lee S, Kim HW, Kim KH. Antibodies against Hepatitis A and Hepatitis B virus in intravenous immunoglobulin products. *J Korean Med Sci* 2016; 31(12): 1937-42.
- 12- Wu CY, Wang HC, Wang KT, Shih DYC, Lo CF, Wang DY. Analyzing titers of antibodies against bacterial and viral antigens, and bacterial toxoids in the intravenous immunoglobulins utilized in Taiwan. *Biologicals* 2013; 41(2): 88-92.
- 13- Buchacher A, Kaar W. Intravenous immunoglobulin G from human plasma--purification concepts and important quality criteria. In: Bertolini J, Goss N, Curling J. Production of plasma proteins for therapeutic use; 2013. p. 185-205.
- 14- Ankorn M, Moreira F, Ijaz S, Symes A, Buckland MS, Workman S, *et al.* Absence of persistent hepatitis E virus infection in antibody-deficient patients is associated with transfer of antigen-neutralizing antibodies from immunoglobulin products. *J Infect Dis* 2019; 219(2): 245-53.
- 15- Behzadifar M, Lankarani KB, Abdi S, Mirghaed MT, Beyranvand G, Keshavarzi A, *et al.* Seroprevalence of hepatitis E virus in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Middle East J Dig Dis* 2016; 8(3): 189-200.
- 16- Jamali R. Epidemiologic studies on viral hepatitis: a short review. *Thrita* 2014; 3(1): e15376.
- 17- Kafi-Abad S, Samiei S, Talebian A, Maghsudloo M, Gharehbaghian A. Hepatitis G virus infection in Iranian blood donors and high-risk groups. *Hepat Mon* 2009; 9(4): 282-6.

Original Article

Evaluation of anti-hepatitis antibodies in intravenous immunoglobulin products from Iranian plasma

Zadsar M.¹, Sharifi Z.¹, Aghaie A.¹

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Intravenous immunoglobulin (IVIG) is a biological product containing a mixture of IgGs which is needed to protect special patients against various microbial pathogens. Due to worldwide decrease in the prevalence of viral hepatitis, the protective effect of immunoglobulins in treatment needs to be re-examined. For this reason the presence of, anti-HAV, anti-HBs, Anti HBc, anti-HGV, anti-HDV and anti-HEV antibodies in the IVIG products of Iranian plasma have been investigated.

Materials and Methods

In this randomized descriptive cross-sectional study, the presence or absence of antibodies against hepatitis A, hepatitis E, hepatitis D, hepatitis G, antibodies against hepatitis B surface antigen and hepatitis B core antigen in 38 different lots of IVIG products from the Iranian recovered and source plasma was determined by ELISA method and anti-HAV and anti-HBs antibodies were titrated.

Results

Total anti-HAV in IVIGs was 38304 ± 17735 mIU/mL and this titer was significantly higher in IVIGs from recovered plasma compared with source plasma. Total anti-HBs titer in IVIGs was equal to 2487 ± 965 mIU/mL, and no significant difference was observed between the two types of recovered and source plasma. Anti-HBc, Anti-HEV and Anti-HGV were detected in all products, while no anti-HDV was found.

Conclusions

Despite the worldwide decrease in the prevalence of viral hepatitis and reports of a decrease in anti-HAV and anti-HBs titers in IVIG products, IVIG products prepared from Iranian plasma have acceptable anti-HAV and anti-HBs titers according to the European Pharmacopeia and are suitable for replacement therapy.

Key words: Intravenous Immunoglobulin, Hepatitis, Iran, Plasma

Received: 23 Jan 2023

Accepted: 1 Mar 2023

Correspondence: Aghaie A., PhD of Immunology. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052183; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: aghaie.a@gmail.com