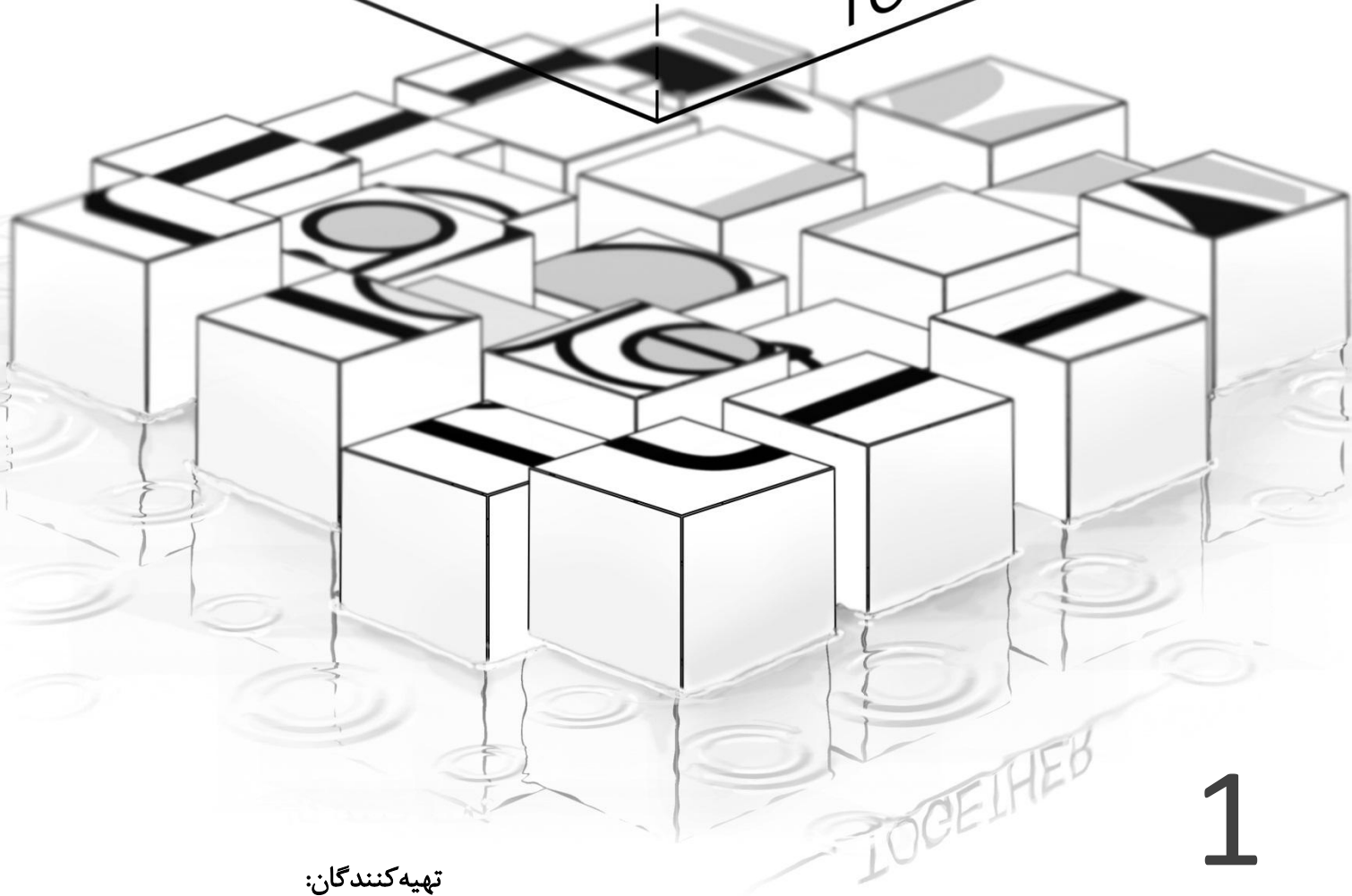


داروهای یک
پیولوژیک

TOGETHER



تهیه کنندگان:

پیاده سازی و ویرایش: آرزو رستگاری

تایپ: فرزانه آرام، سعیده سبزه ای

1



یکی از شعارهایی که به طور مکرر به آن برخورد می‌کنیم این است: پیشگیری همیشه بهتر از درمان است. برای پیشگیری راه‌های گوناگونی را پیش رو داریم که یکی از این راه‌ها استفاده از واکسن است. واکسن‌ها جزو فرآورده‌های بیولوژیک تقسیم بندی می‌گردند که این مبحث (فرآورده یا داروهای بیولوژیک) را می‌توان در کتاب‌های مختلف تحت عنوان *Biological drugs* و *Biologics* دنبال نمود.

فرآورده‌های بیولوژیک (*Biological product*): فرآورده‌هایی که به وسیله موجودات زنده تولید می‌شوند.

موجودات زنده را می‌توان به دو دسته تقسیم‌بندی کرد:

1- تک سلولی

2- پرسلولی

فرآورده‌هایی که توسط این دو دسته تولید می‌شوند عبارتند از:

تک سلولی: ماست (تخمیر شیر توسط باکتری‌های موجود در آن)، سرکه، الکل و آنتی‌بیوتیک‌ها (همان‌طور که می‌دانیم بیش‌تر آنتی‌بیوتیک‌ها از قارچ‌ها به دست می‌آیند، در ضمن آنتی‌بیوتیک‌ها گرچه برای درمان بیماری‌های عفونی مصرف دارند ولی آن‌ها را جزو داروهای بیولوژیک تقسیم بندی نمی‌کنند زیرا مستقیماً روی عامل بیماری‌زا اثر می‌کنند و تاثیری روی سیستم ایمنی ندارند).

پرسلولی: مانند انسولین (انسولین مانند آنتی‌بیوتیک‌ها در دسته فرآورده‌های بیولوژیک قرار می‌گیرد، نه داروهای بیولوژیک) و یا پاپایین که نوعی آنزیم است که از گیاه *Papaya* به دست می‌آید و برای نرم کردن گوشت از آن استفاده می‌شود. مورد استفاده کلینیکی آن برای از بین بردن گوشت اضافه رشد کرده در محل جراحی (جراحی پلاستیک) می‌باشد.

داروهای بیولوژیک (*Biological drugs*): فرآورده‌هایی که از موجودات زنده به دست می‌آیند و بر روی سیستم ایمنی اثر می‌گذارند. (در واقع می‌توان گفت داروهای بیولوژیک زیر مجموعه‌ای از فرآورده‌های بیولوژیک هستند.) این فرآورده‌ها به دو شیوه بر روی سیستم ایمنی اثر می‌گذارند:

الف- فعال (*Active*): این دسته از ترکیبات، فعالیت پادگنی داشته و آنتی‌ژن (پادگن) هستند و سبب پیش‌گیری طولانی مدت می‌شوند و بر روی هر دو سیستم ایمنی (هومورال و سلولار) اثر می‌گذارند.

* موادی که بالای 10 کیلو دالتون باشند جزء ترکیبات پادگن قرار می‌گیرند.

ب- غیر فعال (*Passive*): مکانیزم عمل این دسته شبیه آنتی‌بادی‌ها می‌باشد. در واقع ما آنتی‌بادی را که به روش‌های مختلف به دست می‌آید به بیمار تجویز می‌کنیم. به عنوان مثال در بیماری کزاز (که باید عامل بیماری‌زا یعنی سم باکتری را خنثی کنیم) از پادتن‌های ضد کزاز که در بدن انسانی دیگر یا حیوان تولید و خالص‌سازی شده استفاده می‌کنیم.

* داروهای بیولوژیک زیر مجموعه‌ای از فرآورده‌های بیولوژیک هستند.

داروهای بیولوژیک

داروهای بیولوژیک را به طور کلی به 5 دسته تقسیم بندی می‌کنند:

1- واکسن‌ها

2- سرم‌های درمانی

3- توکسوئید

4- آنتی توکسین‌ها

5- فرآورده‌های مشابه

حال به بررسی مختصر این 5 دسته می پردازیم:

1- واکسن‌ها (*Vaccines*?)

در قدیم چون منشا بیماری را نمی دانستند به آن زهرآگین یا *viruses* می گفتند و بعدها چون جنر اولین واکسن را علیه ویروس آبله ساخت، نام *Vaccine (Virus)* را به این فرآورده‌ی بیولوژیکی نسبت دادند. امروزه به فرآورده‌هایی که خاصیت آنتی‌ژنیک داشته و سیستم دفاعی را فعال می کنند واکسن می گویند.

طبق تعریف، واکسن‌ها فرآورده‌هایی هستند که به صورت سوسپانسیون حاوی موجودات ذره‌بینی بیماری‌زا و یا محلول‌های حاوی آنتی‌ژن می‌باشند و می‌توانند روی سیستم‌های دفاعی سلولی (*CMI*) و هومورال (*HI*) اثر بگذارند و آن‌ها را فعال کنند. بدیهی است که این فرآورده‌ها باید استریل باشند.

* منظور از استریل کردن واکسن این می‌باشد که فرآورده‌ی ما فقط حاوی ویروس یا باکتری یا ذره‌ی مورد نظر بوده و فاقد هرگونه میکروارگانسیم و عامل اضافی باشد (در واقع شرایط استریلیزاسیون را طوری انتخاب می‌کنند که تمام میکروارگانسیم‌ها به غیر از باکتری یا ویروس مورد نظر از بین برود).

* واکسن فقط جنبه‌ی پیشگیری دارد و اغلب در پروسه درمان قرار نمی‌گیرد.

بهترین فرم واکسن به صورت پودر خشک است که بعداً به صورت سوسپانسیون در می‌آورند.

2- سرم‌های درمانی یا *Therapeutic serum*:

محلول‌های استریل و حاوی پادتن‌هایی هستند که از تزریق آنتی‌ژن به انسان یا حیوان به دست می‌آید و برای آنتی‌ژن ویژگی دارند.

دو فرق این گروه با واکسن‌ها:

الف- واکسن‌ها فقط برای پیش‌گیری به کار می‌روند اما پادتن هم برای پیش‌گیری و هم پروسه درمان به کار می‌رود.

ب- مدت ایمنی زایی واکسن‌ها طولانی‌تر از پادتن‌ها می‌باشد و پادتن‌ها یک ایمنی سریع و کوتاه مدت ایجاد می‌کنند. (بنابراین باید پس از درمان با سرم‌های ایمنی، در اولین فرصت واکسن تزریق شود).

3- شبه سم‌ها (*Toxoids*):

توکسوئیدها را جزو واکسن‌ها هم می‌توان دسته‌بندی کرد ولی چون منشا متفاوتی دارند در یک دسته‌ی جداگانه قرار گرفته‌اند.

منظور از سموم خارجی، همان اگزوتوکسین‌ها می‌باشند که با روش‌های خاصی مانند گرما یا مواد شیمیایی مثل فرمالدهید به *Toxoid* تبدیل شده‌اند. (می‌دانیم که اگزوتوکسین‌ها را نمی‌توان مستقیماً به فرد تزریق کرد و باید آن‌ها را تبدیل به توکسوئید کنیم)

به طور کلی شبه سم به فرآورده‌هایی می‌گویند که دارای ویژگی‌های زیر می‌باشند:

الف- محلول و استریل باشند.

ب- از سموم خارجی باکتری‌ها حاصل شده باشند (و خاصیت سمی اولیه‌ی خود را از دست بدهد)

ج- دارای خاصیت آنتی‌ژنیک باشد.

* توکسوئیدها فقط جنبه پیش‌گیری دارند.

خلاصه ای از روش تهیه *Toxoid* ها:

ابتدا باکتری را در محیط مایع اختصاصی کشت می‌دهیم و بعد از رشد و تکثیر، محصول را جمع‌آوری می‌کنیم و به آن فرمالدهید می‌افزاییم. سپس توکسوئیدها را جداسازی می‌کنیم و بعد از خالص‌سازی، مواد افزودنی دیگر را با نسبت خالص به آن می‌افزاییم.

4- آنتی‌توکسین ها *Anti-toxins*:

محلول‌های استریلی هستند که از سرم حیوان (که توکسوئید و یا توکسین خارجی باکتری باکتری‌ها با تیترا معینی به آن تزریق شده) به دست می‌آیند و می‌توانند توکسین ویژه‌ی خود را خنثی سازند. این مواد جنبه‌ی درمانی بسیار مهمی دارند. البته این فرآورده‌ها جنبه‌ی پیش‌گیری نیز دارند. به عنوان مثال در بیماری‌های کزاز و دیفتری، درمان با آنتی‌توکسین انجام می‌شود و خود باکتری‌های مولد این بیماری را با آنتی‌بیوتیک از بین می‌برند.

ایمونی سریع و کوتاه مدت ایجاد می‌کند ← در اولین فرصت توکسوئید تزریق شود.

5- فرآورده‌های مشابه *Equivalent product*:

این مواد به سه دسته تقسیم می‌شوند:

1- واکسن‌ها: تا حدود زیادی همان تعریف قبلی برای این دسته صادق است: یعنی فرآورده‌های استریلی هستند که سوسپانسیون می‌باشند. پس از تزریق به عنوان آنتی‌ژن در بدن عمل می‌کنند. اما تفاوت واکسن‌هایی که در این‌جا آورده شده این است که در این‌جا منظور از واکسن، فرآورده‌هایی است که در آن از خصوصیات میکروارگانیسم به کار رفته شده اطلاعی نداریم. برای مثال افرادی که مبتلا به نوعی جوش صورت (آکنه) هستند اگر داروهای رایج بر روی آن موثر نباشند بعد از نمونه‌گیری از آن، واکسن تهیه می‌کنند (از خود عامل آکنه) اما در واکسن‌هایی که جزء داروهای بیولوژیک می‌باشد ما از خصوصیات میکروارگانیسم مورد استفاده (مانند میزان بیماری‌زایی، میزان قدرت پادگنی، میزان سمیت) اطلاعاتی داریم.

2- خون و مشتقات آن: همان طور که می‌دانیم اگر خون را سانتریفوژ کنیم در لوله‌ی آزمایش به دو قسمت تقسیم می‌شود:

- رسوب: قرمز رنگ می‌باشد که حاوی *WBC* و *RBC* و پلاکت‌ها است.
- محلول شفاف: حاوی سرم یا پلاسما

ما از این دسته به عنوان فرآورده دارویی به سه صورت استفاده می‌کنیم:

الف- خون تام: از خون تام برای افرادی استفاده می‌کنیم که در اثر جراحی یا تصادف یا عامل دیگری خون از دست داده‌اند. در واقع خون تام به خون تازه‌ای که از فرد سالم گرفته شده باشد، می‌گویند. (این خون تازه اگر تا 6 روز بعد از خون‌گیری مورد استفاده قرار نگیرد، قسمت‌های مختلفش را از آن جدا می‌کنند)

ب- فرآورده‌های فرم یافته: مواد فرم یافته شامل *WBC*، *RBC* و پلاکت‌ها می‌شود. مثلاً *RBC* را بعد از استخراج می‌شویند تا سرم که حاوی پادتن می‌باشد از *RBC* جدا شود و برای افراد دچار آنمی استفاده کنند.

ج- پلاسما: در مواردی استفاده می‌شود که فرد دچار شوک (هیپوولمیک) و یا دچار سوختگی شده و مقدار آب قابل توجهی را از دست داده که در این صورت پلاسما به طور مستقیم تزریق می‌شود ولی باید توجه داشت به علت اینکه پلاسما حاوی مواد باارزشی می‌باشد باید از قبل، این مواد با- ارزش پلاسما را جداسازی کنیم.

تعدادی از این مواد باارزش عبارتند از: گلوبولین، آلبومین، پروتئین‌ها و یا فاکتورهای انعقادی.

د- آنتی‌ونین‌ها (*Anti venines*): در واقع همان سم است. در زبان فارسی گاهی بین سم مار و سم باکتری فرقی نمی‌گذاریم و برای هر دو از کلمه "سم" استفاده می‌شود. ولی اینجا ونین به سمی که از حیوان به دست می‌آید گفته می‌شود مثل سم مار، عقرب و ... (معادل ونین در زبان فارسی زهر است)

*سم پوست قورباغه یا بوفوتوکسین به علت وزن مولکولی پایین در دسته *Venin* ها قرار نمی‌گیرد.

اهمیت و لزوم مطالعه داروهای بیولوژیک:

1- تحقق بخشیدن به این شعار معروف و تکراری که "پیش‌گیری بهتر از درمان است"

2- جلوگیری از مرگ نوزادان

3- فراهم آوردن اطلاعات لازم در این زمینه برای داروسازان

4- کمک به ایجاد ایده‌های نو برای ساخت واکسن‌های جدید

واکسن‌ها:

کلمه‌ی واکسن که در زبان یونانی به معنی گاو ماده است از *Vacca* مشتق شده. پزشک انگلیسی به نام جنر در زمانی که آبله شایع بود (البته آبله انسانی) مشاهده کرد خانم‌هایی که شیر گاو می‌دوشند پشت دستشان تاولی شبیه تاول روی سینه گاو (گاوهایی که مبتلا به آبله گاوی بودند) وجود دارد؛ این افراد بعد از بهبود پیدا کردن دیگر به آبله انسانی مبتلا نمی‌شوند. او بعدها آزمایشی را به این صورت انجام داد که بر روی دست پسر بچه‌ای خراشی ایجاد کرد و محتویات تاول پستان گاو را روی خراش قرار داد و مشاهده کرد یک تاول کوچک روی دست پسر بچه ایجاد شد بعد از خوب شدن و پس از مدتی خراش دیگری روی دست پسر بچه ایجاد کرد این بار محتویات تاول آبله انسانی روی آن قرار داد و مشاهده کرد که فرد مورد آزمایش به آبله مبتلا نشد. بدین ترتیب نتیجه گرفت افرادی که به آبله گاوی مبتلا می‌شوند به آبله انسانی مبتلا نمی‌گردند.

جنر بر همین اساس توانست اولین واکسن را بسازد و در نهایت نام این فرآورده را *vaccine* گذاشت.

تقسیم بندی واکسن‌ها براساس منشا تولید آن:

1- واکسن‌های باکتریایی *Bacterial vaccines*

2- واکسن‌های ویروسی *Viral vaccines*

3- واکسن‌های ریکتزایی *Rickettsial vaccines*

4- توکسوئید *Toxoid*

5- *Other* (مثل تست‌های آلرژی)

واکسن‌های باکتریایی:

سوسپانسیون و یا محلول‌های استریلی هستند که حاوی باکتری به 3 صورت می‌باشند.

1- باکتری کشته شده که به این نوع *Killed or inactivated vaccines* می‌گویند. غیرفعال: *Adjuvant* اضافه می‌کنیم که اثر را بالا ببرد. دوزی به کار می‌بریم که اثرگذار باشد.

2- باکتری زنده یا ضعیف شده که به این نوع *Live attenuated vaccines* می‌گویند. ایجاد *Mutant* برای کاهش بیماری‌زایی (مثلاً چندین بار پاساژ می‌دهیم)

3- پادگن‌های آن باکتری مورد نظر که به این دسته "واکسن‌های آنتی‌ژنیک" می‌گویند.

* هر سه دسته باعث ایمنی فعال می‌شوند.

* منظور از *other* در کل فرآورده‌های پادگنی (مثلاً تهیه شده از آنتی‌ژن‌های موجود در دانه‌های گرده گل) است.

برای تهیه واکسن‌ها می‌توان از روش‌های مختلفی استفاده کنیم:

1- از طریق کشت باکتری‌ها و ویروس‌ها

2- خالص‌سازی آنتی‌ژن‌ها: از مزایای این روش کم کردن عوارض و از معایب آن می‌توان هزینه‌بر بودن آن را نام برد. چون در روش بالا، باکتری تام داریم امکان دارد عوارض ناخواسته داشته باشند پس قسمت پادگنی باکتری را خالص می‌کنند.

3- مهندسی ژنتیک و نوترکیبی: در این روش هزینه بسیار بالا می‌باشد. در این روش هم (مثل هیپاتیت B) قسمت مربوط به پادگن باکتری‌ها را تولید می‌کنند.

4- روش‌های جدید تهیه واکسن مانند استفاده از فناوری نانو تکنولوژی و ...

این واکسن‌ها، کیفیت بهتر، قیمت کمتر و مدت زمان پایداری بیشتری دارند. از این روش برای تولید واکسن علیه باکتری‌ها و ویروس‌هایی که با روش‌های قبلی، واکسنی برایشان تهیه نشده استفاده می‌شود.

مراحل تهیه واکسن از طریق کشت باکتری:

نمای کلی این روش به صورت زیر می‌باشد:

انتخاب سوش مناسب (سوش ممکن است خودی *Autogenous* و یا ذخیره‌ای *Stock* باشد).



کنترل زنده و فعال بودن: تشخیص باکتری و استریل بودن



انتخاب محیط کشت مناسب (مائی)



شست‌وشو و صاف کردن:

Live-1

2- شمارش باکتری ← کدورت سنجی ← تعیین قدرت

3- کشتن باکتری (UV، حرارت یا مواد شیمیایی) ← کنترل کشته شدن ← کنترل بیولوژیکی ← تهیه سوسپانسیون ← تعیین قدرت ← افزودن مواد لازم دیگر، تقسیم در ویال‌ها و کنترل دوباره استریل بودن واکسن‌ها به دو دسته تقسیم می‌شوند:

1- واکسن‌های خودی *Autogenous vaccines*

2- واکسن‌های ذخیره‌ای *Stock vaccines*

واکسن‌های خودی واکسن‌هایی هستند که برای یک فرد تهیه می‌کنیم مثلاً عامل بیماری را از خود فرد می‌گیریم و با طی مراحل برای آن فرد داروی مناسب را تهیه می‌کنیم.

اما واکسن‌های ذخیره‌ای واکسن‌هایی هستند که در لابراتوارهای بزرگ تهیه می‌شوند و به طور همه‌گیر مصرف می‌شوند.

سوش‌های مورد نیاز واکسن‌های ذخیره‌ای: از سازمان‌های معتبر جهانی تهیه می‌شوند.

این سازمان‌ها سوش‌های *Safe* و خوبی را تولید نموده‌اند و تمام خواص (قدرت بیماری‌زایی، پادگنی و سم‌زدایی) این سوش‌ها را می‌شناسند.

فهرستی از این سازمان‌ها به شرح ذیل است:

1- *(WHO) World Health Organization* ← در آمریکا

2- *(PHL) Public Health Laboratory* ← در انگلیس

3- *(NIH) National Institute of Health* ← در آمریکا

4- *Pasteur Institute* ← در فرانسه (در ایران هم شعبه دارد)

این چهار موسسه مشورند ولی امروزه خیلی از کشورها برای خودشان موسساتی به وجود آورده‌اند. مثل دانمارک، کشورهای یوگوسلاوی سابق، هلند و... که از سوش‌های بیماری‌زای کشور خودشان برای تهیه واکسن ذخیره کرده‌اند که نمونه‌های خوبی می‌باشند.

سازمان بهداشت جهانی توصیه می‌کند سوش‌هایی برای تهیه واکسن به کار برده شود که قبلاً امتحان خودشان را پس داده باشند.

به این ترتیب مرحله اول در تولید واکسن به روش کشت، انتخاب سوش مناسب است. باید بدانیم که کدام سوش را می‌خواهیم و از کجا باید تهیه کنیم. باکتری‌ها را به صورت سوش‌های لیوفلیزه (پودر خشک) درجه حرارت باکتری را تا 20- یا بیش‌تر پایین می‌آورند. سپس در خلا زیاد آن را به صورت پودر درمی‌آورند. (باکتری باید زنده باشد). در لوله‌های باریک دربسته و استریل قرار می‌دهند. بعد از تهیه سوش، حتماً باید آن را کنترل کرد:

1- آن را در یک بافر به صورت سوسپانسیون در می‌آوریم و روی محیط کشت جامد سواپ می‌کنیم و بعد از 24 ساعت باید به ما کلونی بدهد که این نشانه زنده و فعال بودن باکتری است.

2- باید مطمئن شویم باکتری دقیقاً همان سوشی است که می‌خواهیم.

3- باید استریل باشد. یعنی نباید هیچ باکتری دیگر همراه باکتری مورد نظر باشد.

بعد از اینکه از مناسب بودن سوش اطمینان حاصل کردیم، باید آن را افزایش دهیم که برای افزایش دادن از محیط‌های مایع (سرعت افزایش باکتری‌ها در این نوع محیط کشت خیلی بالاست). استفاده می‌کنیم (محیط‌های جامد در این مورد کارایی ندارند). بعد از انتخاب محیط، کلونی‌هایی را که داریم، به محیط‌های مائی می‌بریم و سپس محیط‌ها را در داخل تانک‌های تخمیر بزرگ می‌ریزیم. از مزایای تانک تخمیر این است که راه‌های ورودی و خروجی خاصی دارد و درونش کاملاً استریل است. محیط‌ها را استریل تهیه می‌کنند و باکتری را نیز در شرایط استریل به محیط اضافه می‌کنند. (برای به هم زدن محیط‌ها از روش هوادهی استفاده شود).

تانک تخمیر راه‌هایی دارد برای کنترل PH ، میزان اکسیژن، اضافه کردن محیط تازه و هم‌چنین دارای شیرینی است که برای برداشت محیط استفاده می‌شود. (وقتی میکروب به اندازه کافی رشد کرد).

بعد از این که باکتری به اندازه کافی تکثیر شد، شیر تخلیه را باز کرده و برداشت می‌کنیم. باکتری را از صافی‌های خاص که قطری حدود 0.22 یا 0.45 میکرون دارند رد می‌کنیم. باکتری پشت صافی می‌ماند و از محیط جدا می‌شود.

برای جدا کردن محیط کشت باقی‌مانده به همراه باکتری، از بافر معمولی استریل استفاده می‌کنند. پس از اینکه همه اثرات محیط کشت از بین رفت، یک باکتری می‌ماند که خالص، تام و استریل است. در تعریف گفتیم باکتری یا کشته شده است یا زنده و ضعیف شده ابتدا واکسن‌های کشته شده را بررسی می‌کنیم:

واکسن‌های کشته شده سوش‌هایی را دارا هستند که به هر طریقی نتوانسته‌اند خاصیت بیماری‌زایی‌اش را از بین ببرند. یعنی در مورد این سوش‌ها، پاتوژنیسیته با خاصیت پادگنی رابطه مستقیم دارد، هر چه پاتوژنیسیته بیش‌تر باشد، اثر بیش‌تری روی سیستم دفاعی بدن دارد. پس چون نتوانسته‌اند بیماری‌زایی را ضعیف کنند، باکتری را کشته‌اند. بنابراین از اول ما می‌دانیم سوشی را که می‌خواهیم با آن واکسن بسازیم، بیماری‌زاست و ضعیف نشده.

پس دو دسته واکسن داریم که با باکتری تام تهیه می‌شوند: 1- کشته شده 2- زنده و ضعیف شده

تا اینجا روش تهیه هر دو یکسان است. فقط نوع باکتری تفاوت دارد. اما:

واکسن‌های Killed:

3- راه برای کشتن باکتری داریم. انتخاب راه بستگی به پادگن‌های روی باکتری دارد. باید مراقب باشیم پادگنی که روی سیستم دفاعی بدن اثر می‌کند با روشی که انتخاب می‌کنیم از بین نرود:

1- حرارت: روش بسیار ساده و ارزانی است. باکتری را در 30 دقیقه در حرارت 56 یا 60 درجه قرار می‌دهیم و باکتری از بین می‌رود. این روش برای همه باکتری‌ها قابل استفاده نیست چون پادگن‌های برخی باکتری‌ها در اثر حرارت دناتوره (*Denature*) می‌شوند در نتیجه باکتری دیگر خاصیت پادگنی نخواهد داشت.

2- اشعه UV: اشعه UV با شدت‌های مختلف، اثرات مختلفی دارد. اثرات نامطلوب روی پوست، ضد عفونی کنندگی و... بنابراین می‌توانیم شدتی را به کار ببریم که باکتری را بکشد به شرطی که روی پادگن‌ها اثر سوئی نداشته باشد.

3- مواد شیمیایی: بیش‌تر از دو روش قبل به کار می‌رود. مواد شیمیایی مختلفی داریم. بیش‌تر از فرمالین استفاده می‌کنیم (فرمالین حتی برای کشتن ویروس‌ها هم به کار می‌رود). بعد از اینکه باکتری‌ها را کشتیم، کنترل باید مرتباً انجام شود. چون باکتری‌ها بیماری‌زا هستند، باید مطمئن شویم که کشته شده‌اند بنابراین باکتری‌های کشته شده را به صورت سوسپانسیون درمی‌آوریم سپس برداشت می‌کنیم و در محیط جامد کشت می‌دهیم. اگر هیچ‌گونه کلونی ایجاد نشده باشد، باکتری‌ها کشته شده‌اند ولی حتی اگر یک باکتری زنده باشد، مرحله کشتن باید دوباره تکرار شود.

در مرحله بعد کنترل بیولوژیکی را داریم که خیلی مهم است (سنجش قدرت پادگنی) برای اینکار از همان سوسپانسیون تهیه شده به حیوان تزریق می‌کنیم و این کنترل دو جنبه دارد: یکی اینکه حیوان نباید بیمار شود؛ یعنی این که باکتری‌ها واقعا کشته شده‌اند. دوم این که آیا به اندازه کافی روی سیستم دفاعی اثر گذاشته و پادتن تولید شده است؟ بعد از انجام این آزمایش واقعا یک واکسن داریم که باید قدرت آن را نیز تعیین کنیم. قدرت به منظور اندازه‌گیری دوز لازم انجام می‌شود.

در مرحله ای که باکتری را صاف کردیم، قبل از اینکه باکتری را بکشیم، یک سوسپانسیون از آن تهیه می‌کنیم و کلونی کانت (*Colony count*) یا شمارش باکتری را انجام می‌دهیم.

اگر به ویال حاوی واکسن توجه کنیم، قدرت را به دو فرم روی آن نوشته‌اند: یا بر اساس تعداد باکتری در میلی‌لیتر واکسن و یا بر اساس قدرت محافظت‌کنندگی‌اش. قدرت محافظت‌کنندگی همان میزان پادتن است که در کنترل بیولوژیکی سنجیده‌اند. مثلا واکسن حصبه معمولا به صورت لیوفیلیزه شده وجود دارد با حلالی که کنارش می‌گذارند مخلوط و مصرف می‌کنیم پشت ویال نوشته شده:

1 بلیون باکتری در ml . می‌دانیم که $8cc$ از محلول را باید تزریق کنیم. قدرت محافظت‌کنندگی هم پشت ویال به این صورت مشخص شده: 8 واحد محافظت‌کننده در میلی‌لیتر. (میزان پادتنی که این واکسن می‌تواند ایجاد کند).

گفتیم وقتی باکتری هنوز زنده است، به صورت سوسپانسیون در می‌آورند؛ ممکن است تعداد باکتری‌ها انقدر زیاد باشد که کلونی کانت مشکل باشد. بنابراین سوسپانسیون را رقیق می‌کنند تا وقتی که رقت تهیه شده روی پلیت، کلونی‌های قابل شمارش بدهد. کلنی‌ها را می‌شمارند و در عکس ضریب رقت ضرب می‌کنند و تعداد باکتری را در سوسپانسیون اولیه به دست می‌آورند. شمارش باکتری به این روش بسیار مشکل است چون باکتری زنده است، این کار را یک بار برای رقت‌های مختلف انجام می‌دهند و بعد کدورت سنجی می‌کنند یعنی لوله را در مقابل شاهد در دستگاه اسپکتوفتومتر قرار می‌دهند و از اپتیکیال دوزش (OD) می‌توانیم تعداد باکتری را از روی گراف به دست آوریم.

در نهایت باید محصول را به فرم واکسن در بیاوریم و به بازار بفرستیم. باید در مراحل آخر هم اطمینان حاصل کنیم که واکسن استریل است. وقتی در ویال می‌ریزیم و می‌ماند، یک محیط مناسب است برای رشد ویروس و قارچ و باکتری برای جلوگیری از آلودگی به واکسن مواد محافظ اضافه می‌کنند. ماده محافظی که معمولا شرکت‌ها استفاده می‌کنند فنول 0.5٪ است. بعضی شرکت‌ها قبلا تایمروسال اضافه می‌کردند تایمروسال یک ماده ضد عفونی‌کننده است که در ترکیب جیوه دارد. این ترکیب چندین سال به عنوان ترکیب محافظ اضافه می‌شد ولی اخیرا در بررسی‌هایی که انجام شده، متوجه شدند بعضی عوارض جانبی واکسن مربوطه به جیوه موجود در این ترکیب است. الان واکسن‌های موجود در بازار ممکن است حاوی این ماده باشند چون هنوز تاریخ انقضایش نگذشته است ولی این سری واکسن‌ها که تاریخ انقضایش بگذرد. واکسن‌های جدید به علت منع سازمان غذا و داروی آمریکا فقط حاوی فنول هستند.

پس از اضافه کردن فنول، به اندازه لازم در ویال می‌ریزیم و به فرم دلخواه در می‌آوریم. واکسن‌ها یا به فرم مائی (سوسپانسیون) هستند و یا لیوفیلیزه (پودر خشک). واکسن‌ها قبل از ورود به بازار در یک اتاق نگهداری می‌شوند. داروسازی که مسئول کنترل است به طور تصادفی از فرآورده‌های نهایی نمونه‌گیری می‌کند و دوباره استریل بودنش را می‌سنجد. اگر استریل بود که برگه مربوطه را امضا می‌کند. قبل از امضا شدن این برگه فرآورده حق خروج از کارخانه و ورود به بازار را ندارد.

در مرحله‌ای که باکتری‌ها زنده‌اند با تهیه رقت‌های مختلف و کشت شمارش کلنی‌ها و با در نظر گرفتن ضریب رقت، تعداد را تعیین می‌کنند.

← colony count-1

کدورت نمونه را با دستگاه فوتومتر می‌سنجند و سپس استفاده از لوله‌ی استاندارد مک فارلند تعداد باکتری نمونه را محاسبه می‌کنند.

← 2- کدورت سنجی

2- میزان پادتن ایجاد شده
(قدرت محافظت‌کنندگی)

1- شمارش

روش‌های تعیین قدرت باکتری