مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۶، شماره ۳، ۱۴۰۰، ۳۸۰-۳۷۲
مقاله پژوهشی

تخلیص و تغلیظ ویروس هاری با استفاده از فیلتراسیون جریان مماسی (TFF) جهت تولید واکسن هاری دامی

علی خدایی‌پور[۱]، زهره افتخاری[۲]، ارسلان افراسیابی[۱]، بابک بیک‌زاده[۳]، مهیار جلوداری‌ممقانی[۴]

[۱] دانش آموخته دانشگاه آزاد تهران شمال، تهران، ایران
[۲] بخش کنترل کیفیت، مجتمع تولیدی و تحقیقاتی، انستیتوپاستور ایران، کرج، ایران
[۳] گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
[۴] دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۲۳ اسفند ماه ۱۳۹۹، **تاریخ پذیرش:** ۲ خرداد ماه ۱۴۰۰

10.22059/jvr.2020.293328.2994 20.1001.1.20082525.1400.76.3.10.2

چکیده

زمینهٔ مطالعه: جهت ساخت واکسن هاری دامی از سلول BHK-21 و ویروس سویه پاستور استفاده می‌شود. اگرچه پروتکل‌های مختلفی برای خالص‌سازی در پروسه تولید واکسن پیشنهاد شده است لیکن این پروتکل‌ها اثرات منفی بر محصول نهایی دارند و نیازمند بهینه‌سازی می‌باشند.

هدف: در مطالعه حاضر تلاش شد تا روش تغلیظ و خالص‌سازی ویروس مورد استفاده جهت ساخت واکسن هاری دامی بهینه‌سازی گردد.

روش‌کار: ابتدا ویروس هاری سویه پاستور در سلول‌های BHK-21 به مدت ۵ روز با کمک DMEM، ۷ درصد سرم جنین گاوی کشت داده شد. سپس خالص‌سازی با استفاده از فیلتراسیون جریان مماسی (TFF) انجام شد. کیفیت ویروس‌های خالص‌سازی شده از طریق تیتراسیون ویروسی و الکتروفورز عمودی سنجیده شد. سپس غیرفعال شدن نمونه‌ها توسط بتاپروپیولاکتون انجام و در شرایط درون تنی و برون تنی مورد بررسی قرارگرفت. در نهایت، قدرت و کارایی واکسن فرموله شده با روش NIH مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: مطالعه تیتراسیون ویروسی در نمونه‌های TFF نشان‌دهنده افزایش تیتر ویروسی در مقایسه با گروه کنترل بود ($P<۰/۰۵$). تجزیه و تحلیل ژل الکتروفورز عمودی نمونه‌های خالص شده و تغلیظ شده نشان دادند ویروس‌هایی که با استفاده از TFF خالص‌سازی و تغلیظ شده بودند در مقایسه با نمونه‌های تغلیظ نشده از خلوص بیشتری برخوردارند. علاوه بر این، در مطالعه ارزیابی قدرت و پتانسی واکسن افزایش ۱۰ برابری قدرت و کارایی واکسن نیز مشهود بود.

نتیجه‌گیری نهایی: مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از روش TFF برای حجم بالای مایع ویروسی جهت تغلیظ و تخلیص بسیار مناسب است و قابلیت اجرا در مقیاس صنعتی جهت افزایش میزان قدرت و کارایی واکسن تولید شده را دارد.

کلمات کلیدی: ویروس هاری، تخلیص، فیلتراسیون جریان مماسی (TFF)، قدرت و کارایی واکسن، واکسن

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: زهره افتخاری، بخش کنترل کیفیت، مجتمع تولیدی و تحقیقاتی، انستیتوپاستور ایران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: z_eftekhari@pasteur.ac.ir

مقدمه

هاری، بیماری حاد دستگاه عصبی می‌باشد که تمام پستانداران از جمله انسان را گرفتار می‌کند. عامل این بیماری، ویروسی عصب دوست است که متعلق به خانواده رابدوویریده و از جنس لیساویروس می‌باشد. ویروس هاری سبب التهاب سیستم اعصاب مرکزی در همه پستانداران می‌شود و به عنوان یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌های زئونوز شناخته می‌شود (۱۸). ویروس هاری، پروتوتایپ ویروسی نوروتروپیک بوده و حاوی ژنوم RNA تک رشته‌ای سنس منفی، کوچک بوده که پنج پروتئین را رمزگذاری می‌کند که عبارتند از نوکلوپروتئین (N)،

فسفوپروتئین (P)، پروتئین ماتریکس (M)، گلیکوپروتئین (G) و پلیمراز (L). ویروس هاری با ظاهری شبیه به گلوله، قطری در حدود ۷۵ نانومتر و طولی در حدود ۱۸۰ نانومتر دارد. ژنوم همه اعضای خانواده رابدوویریده دارای دو مؤلفه ساختاری اصلی هستند که شامل یک هسته ریبونوکلئوپروتئینی مارپیچی و یک پوشش در اطراف می‌باشد (۱۹،۱۵).

وزن مولکولی گلیکوپروتئین‌های هاری حدود ۱۸۰-۲۴ کیلودالتون است و وزن مولکولی گلیکوپروتئین جی حدود ۷۰ کیلودالتون می باشد (۱۱) که اصلی‌ترین آنتی‌ژن برای تولید آنتی بادی‌های خنثی کننده بعد از واکسیناسیون علیه هاری محسوب می‌شود (۸،۱۰). عموماً، در تولید واکسن هاری دامی از کشت سلولی مداوم که از سلول‌های کلیه همستر گرفته شده‌اند، استفاده می‌شود. واکسن هاری دامی که در ایران به طور معمول استفاده می‌شود حاوی ویروس‌های هاری سازگار با کشت بافت تولید شده بر روی سلول‌های BHK-21 (Baby Hamster Kidney strain 21) می‌باشد که برای ایمن‌سازی حیوانات اهلی بی خطر است (۶،۱۴). برای دستیابی به قدرت و کارایی واکسن بالا، انتخاب روشی که در کنار تضمین بازدهی و قدرت و کارایی واکسن بالا، خاصیت آنتی ژنیسیته را نیز حفظ کند، ضروری است. از روش‌های مختلفی جهت تغلیظ ویروس به منظور افزایش کارایی واکسن استفاده می‌شود. معمول‌ترین روش‌های تغلیظ، استفاده از اولتراسانتریفوژ و الکتروفورز گرادیان ساکاروز است که سابقاً در تولید واکسن‌های ویروسی مانند واکسن نیوکاسل مورد استفاده قرار گرفته است. اما امروزه، با معرفی فیلتراسیون با جریان مماسی، که اساس آن جداسازی اجزا از هم برپایه وزن ملکولی و تغلیظ مداوم و حذف ذرات اضافی می‌باشد، روش جایگزین مناسبی در تولید واکسن‌های ویروسی مختلف معرفی شده است که می‌تواند کارایی واکسن تهیه شده را افزایش دهد (۲،۶،۷). اساس این روش، تغلیظ ویروس و آنتی ژن‌های مؤثر ویروس برای ایمن‌سازی واکسن و حذف سلول‌ها و پروتئین‌های بزرگ غیرساختمانی و غیرایمن بر اساس سایز ملکولی می‌باشد که می‌توانند در کارایی ویروس در ایمنی‌زایی واکسن تأثیرگذار باشد. از محاسن دیگر این روش، عدم استفاده از مواد و معرف‌های توکسیک، زمان جداسازی سریع و جریان مماسی مداوم در سراسر فیلتر غشایی با کات آف مناسب تحت شرایط کنترل شده می‌باشد. فیلتراسیون با جریان متقاطع/مماسی، نوعی از فرآیند فیلتراسیون است که در آن جریان مایع از روی غشاء یک فیلتر عبور کرده و جداسازی در آن صورت می‌گیرد.

مزیت مهم این روش این است که به دلیل متقاطع بودن جریان نسبت به غشاء، مواد به دام افتاده در پشت غشاء دائماً شسته شده و فیلتر کیک ضخیمی ایجاد نمی‌شود، همچنین با توجه به تنظیم سرعت و نوع فیلتر امکان جداسازی انتخابی اجزای نمونه وجود دارد (۹،۱۷). از آنجایی که یکی از مهم‌ترین راه‌های پیشگیری هاری در انسان و دام، واکسیناسیون مناسب دام‌ها می‌باشد، تهیه واکسن مناسب با کارایی و ایمنی‌زایی مناسب، نیازمند بررسی و ارتقا روش تولید و بهینه‌سازی مراحل مختلف تولید می‌باشد.

هدف از مطالعه حاضر، دستیابی به شرایط ایده‌آل برای خالص‌سازی و تغلیظ مایعات سلولی حاوی ویروس با استفاده از فیلتراسیون جریان مماسی به‌منظور افزایش قدرت و کارایی واکسن هاری دامی و کاهش هزینه تمام شده محصول نهایی و افزایش کیفیت محصول می‌باشد.

مواد و روش کار

کشت سلول BHK21C13: در داخل فلاسک کشت سلول ۱۷۵ سانتی متر مربع (۶۰۰ میلی‌لیتری)، ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول حاوی محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)، ۷ درصد سرم جنین گاوی (Gibco™) و سلول BHK21 ($1/5\times10^5$ سلول/ میلی‌لیتر) در زیر هود کشت سلول در شرایط مناسب ریخته شد. سپس، فلاسک در انکوباتور Co_2 دار ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد (۱۲،۱۵).

کشت در داخل ارلن و تلقیح و کشت ویروس هاری: ابتدا از هر فلاسک زیر هود، یک نمونه برداشته و تعداد سلول‌ها با کمک رنگ آمیزی با تریپان بلو ۰/۴ درصد زیر میکروسکوپ شمارش گردید و تعداد سلول‌های زنده و مرده یادداشت شد. فلاسک‌های حاوی سلول‌های رشد کرده در زیر هود و تحت شرایط آسپتیک به داخل ارلن منتقل شد، به طوری که در داخل هر ارلن، حدود ۷۰۰ میلی‌لیتر محیط حاوی محیط کشت DMEM، ۷ درصد سرم جنین گاوی و سلول BHK21C13 (2×10^5 سلول/میلی‌لیتر) باشد (۱،۱۵). MOI (Multiplicity of infection) سلول‌های آلوده شده محاسبه و در زمانی که این آلودگی سلول‌ها به ویروس ۰/۳ محاسبه شد، ویروس PV (Pasteur strain vaccines) اضافه و محتویات به مدت ۵ روز در داخل بیوراکتور ۱۰ لیتری قرار داده شدند. پس از ۵ روز، حداکثر تراکم سلول‌های زنده ($2-3\times10^6$ سلول/میلی‌لیتر) بدست آمد (۱۲). تمام مراحل تلقیح ویروس در شرایط استاندارد و زیر هود BSCII انجام شد.

خالص‌سازی و تغلیظ ویروس: پس از برداشت مایع ویروسی فعال از بیوراکتور، نمونه به دو قسمت تقسیم شد. بر روی یک قسمت غیر فعال‌سازی با کمک بتاپروپیولاکتون انجام شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید و بر روی قسمت دیگر تغلیظ ویروس با کمک TFF به شرح ذیل انجام شد (۵):

خالص‌سازی و تغلیظ ویروس با استفاده از روش فیلتراسیون جریان مماسی (TFF) روی غشاهای نیمه تراوا (پلی اترسولفون Biomax) با کات آف وزن مولکولی ۱۰۰۰۰۰ دالتون، در ۴ درجه سانتی‌گراد برای تغلیظ انجام شد (Pellicon® XL 50 Cassette and Labscale TFF System Cat No: XX42 LSS 13). فشار ورودی که توسط پمپ پریستالتیک هدایت می‌شود بر روی کمتر از ۲۰ پوند بر اینچ مربع و فشار خروجی در حدود ۵ پوند بر اینچ مربع تنظیم شد (تصویر ۱). برای ضد عفونی نمودن مخازن و اتصالات از آب مقطر و محلول‌های ۰/۱ تا ۱ مولار سود استفاده شد تا ویروس و محیط کشتی برای استفاده مجدد باقی نمانده باشد. به منظور استفاده مجدد از کاست، آب مقطر استفاده شد تا pH در هر دو قسمت عبور کرده (Permeate) و باقی مانده تغلیظ شده در مخزن (Retentate) خنثی شود (۶،۷،۱۲،۱۶).

روش سنجش پلاک ویروسی (تیتراسیون ویروسی): به منظور تیتراسیون ویروسی هریک از نمونه‌ها (گروه کنترل، قسمت عبور کرده و باقی مانده تغلیظ شده در مخزن) تهیه رقت سری (از 10^{-1} تا 10^{-6}) در محیط کشت اختصاصی انجام شد و ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت ویروسی به یک چاهک کف تخت کشت بافت (Nunc® Lab-Tek® II chambered cover glass; Sigma Z734853) منتقل شد. سپس، سلول‌های BSR معلق شده (غلظت $10^5 \times 1$ سلول/ ۰/۲ میلی‌لیتر) و به هر چاهک اضافه شدند و به مدت ۲۱ ساعت در انکوباتور co2 دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سلول‌ها با استفاده از استون فیکس شده و با کونژوگه ضد نوکلئوکپسید هاری (Bio-Rad #3572114) رنگ‌آمیزی شدند. لام در جای مرطوب در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد و بعد از یک ساعت با آب تامپون مخصوص (pH= ۷/۷-۲/۴) شستشو انجام شد. سپس لام را خشک کرده و با کمک میکروسکوپ فرابنفش در طول موج ۲۵۴ نانومتر قرائت شد. آخرین رقتی که در آن سلول‌های آلوده به ویروس دیده شد، رقت مایع ویروسی و عکس آن عیار ویروسی در ۰/۱ میلی‌لیتر می‌باشد. این فرایند جهت بررسی تکرار پذیری ۳ بار انجام گرفت.

در شرایط برون تنی نیز از مایعات ویروسی غیر فعال شده بر روی کشت سلول استفاده شد. بدین ترتیب در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای سلول‌های BSR تریپسینه شده به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. به طوری که در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سلول (۵۰۰۰۰ سلول/ میلی‌لیتر+DMEM+آلبومین سرم گاوی ۰/۳ درصد+آنتی بیوتیک) بود. بعد از ۲۴ ساعت، مایعات ویروسی غیر فعال شده در مجاورت سلول قرار داده شد (۱۰۰ میکرولیتر از ویروس غیر فعال شده) و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه داخل انکوباتور حاوی دی اکسید کربن قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، شستشو توسط محلول نمک فسفات با خاصیت بافری انجام و نمونه‌ها توسط استون فیکس گردید. سپس، با کمک کونژوگه اختصاصی هاری رنگ‌آمیزی شد. نمونه‌ها در طول موج مناسب فلورسانس خوانده شدند و تیترهای آلوده کشت بافت Spearman-Karber بر اساس روش تشکیل واحدهای کانونی فلورسنت (FFU) بر اساس گلیکوپروتئین هاری ارزیابی شدند. واحدهای تشکیل دهنده کانون فلورسنت توسط میکروسکوپ ایمنوفلورسنت مشاهده شده و با ضرب کردن آن در رقت معکوس آن چاهک، تعداد ویروس‌های بدست آمده در هر رقت مشخص شد (۱۲).

الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید: نمونه‌های به دست آمده از قسمت عبور کرده، تغلیظ شده و گروه کنترل با استفاده از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید بر اساس روش Laemmli ارزیابی شدند (۱۰). ژل متراکم کننده به غلظت ۴ درصد و ژل جدا کننده به غلظت ۱۲ درصد جهت ارزیابی وزن مولکولی نمونه‌ها استفاده شد. به طور خلاصه، برای آماده‌سازی، بافر نمونه تهیه شده را با نسبت ۱ به ۳ به نمونه افزوده، سپس به مدت ۵ دقیقه در آب جوش ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در این شرایط، پروتئین‌ها به واسطه اثر SDS و ماده احیا کننده (در حالت الکتروفورز احیایی) کاملاً دناتوره می‌شوند. بعد از افزودن بافر نمونه به نمونه تغلیظ شده و قبل از بارگذاری روی ژل، مخلوط آن‌ها ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس، با سمپلر مناسب ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه تغلیظ شده، نمونه عبور کرده و نمونه مارکر پروتئینی (Prestained Protein Ladder شرکت سینا کلون) را به دقت در چاهک ریخته و بعد از اتمام با کمک رنگ کوماسی بلو به مدت ۱۲ ساعت رنگ آمیزی ژل انجام و سپس با کمک متانول، اسید استیک و آب رنگ‌زدایی انجام شد.

غیرفعال سازی ویروس: نمونه‌های تغلیظ شده با کمک بتاپروپیولاکتون در غلظت مناسب (۱ به ۴۰۰۰)، به مدت ۲ ساعت در

دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و ۱۵ دقیقه بر روی استیرر در محیط خنک غیر فعال شدند (۱۲).

آزمون ارزیابی غیرفعال شدن نمونه‌ها و ارزیابی قدرت و کارایی واکسن فرموله شده: از دو محیط Soyabean Casein Digest Agar with Lecithin و Sabouraud Dextrose Agar (SDA) جهت بررسی آلودگی احتمالی نمونه‌ها در طی ماه‌های اول، سوم، ششم و دوازدهم استفاده شد. جهت کنترل غیر فعال بودن ویروس، تست غیرفعال بودن ویروس بر روی نمونه‌ها انجام شد. برای هر نمونه، ۲۰ سر موش کوچک آزمایشگاهی غیر همخون (NMRI) ماده با وزن تقریبی ۱۴-۱۱ گرم جهت تزریق داخل مغزی انتخاب شدند. تزریق مایع ویروسی غیر فعال شده به صورت داخل مغزی (۰/۰۳ میلی‌لیتر)، در همه گروه‌های مورد ارزیابی انجام و ۲۱ روز کنترل روزانه صورت گرفت (۸،۱۲،۱۳). جهت تعیین قدرت ایمنی بخشی واکسن هاری تهیه شده بر روی کشت سلولی از آزمون NIH استفاده شد. در این آزمون جهت ارزیابی قدرت و کارایی هر نمونه، از ۱۶ سر موش کوچک آزمایشگاهی غیر همخون (NMRI) ماده به وزن ۱۶-۱۲ گرم استفاده شد. به‌طوری که در هفته اول به هر سر موش ۰/۵ میلی‌لیتر به‌صورت داخل صفاقی از واکسن تولید شده، نمونه تغلیظ شده، نمونه عبور داده شده و واکسن استاندارد (۱۰ واحد بین المللی در میلی لیتر BRP EDQM) تزریق شد. هفته دوم نیز تزریق واکسن یادآور به هر گروه به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر تزریق انجام شد. در هفته سوم از ویروس چالش هاری دامی به میزان ۰/۰۳ میلی‌لیتر به صورت داخل مغزی تزریق انجام و به مدت ۱۴ روز تعداد تلفات، علائم‌دار و زنده‌ها یادداشت شد. در نهایت واکسن باید به نقطه‌ای از قدرت و کارایی برسد که حاوی ۵۰ درصد قدرت پوشانندگی باشد؛ یعنی در بالاترین دوز تزریقی حداقل ۷۰ درصد موش‌ها زنده بمانند و در پایین‌ترین دوز تزریقی جهت چالش باید دوز کشندگی ۵۰ درصد بالای ۱۰ باشد که دوز کشنده پنجاه و دوز مؤثر پنجاه به روش Spearman-Karber محاسبه می‌شود. روش محاسبه روش حجمی است که از تقسیم نمودن End point dilution 50 درصد (رقتی از واکسن که در آن ۵۰ درصد موش‌ها حفظ می‌شود) واکسن مورد نظر به واکسن رفرانس حاصل شد که رابطه به صورت زیر است:

$$\text{Log10 50\% end point dilution}=-x_0(x_0-d/2+d\sum r_i/n_i) \quad (۱)$$

RP=Reciprocal of ED50 of TV/Reciprocal of ED50 of RV× Dose of TV/Dose of RV

در خاتمه، پس از اتمام تست NIH، با توجه به قانون معدوم‌سازی حیوانات آزمایشگاهی با حداقل درد و حداکثر بازدهی در مجتمع تولیدی تحقیقاتی از محفظه گاز دی اکسید کربن و اکسیژن برای کشتار به روش انسانی استفاده شد و در نهایت به دلیل جلوگیری از آلودگی محیطی، موش‌های تلف شده در کوره سوزانده شدند (۶،۱۲،۱۹).

تأیید اصول اخلاقی: تمام مراحل آزمون درون تنی توسط کمیته اصول اخلاقی انستیتو پاستور ایران (IR.PII.REC.1394.30) مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفت.

بررسی آماری داده‌ها: جهت بررسی آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ استفاده گردید. آنالیز آماری تعیین کارایی و قدرت ایمنی‌زایی نمونه‌ها در سه گروه با کمک آزمون One Way ANOVA انجام شد ($P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد).

نتایج

آزمایش تیتراسیون و غیر فعال بودن: آزمایش تیتراسیون ویروس با روش سنجش پلاک ویروسی نشان داد که تیتر ویروسی خالص و تغلیظ شده با TFF در مقایسه با گروه کنترل استفاده شده در بخش هاری به میزان قابل توجهی افزایش یافت ($P<۰/۰۵$) (جدول ۱). بر این اساس تعداد ویروس‌ها در نمونه تغلیظ شده به حدود ۸۰۰ میلیون ذره ویروس در هر میلی‌لیتر رسیده بود که در مقایسه با نمونه کنترل افزایش قابل توجهی را نشان می‌داد. براساس ارزیابی درون تنی و برون تنی بر روی نمونه‌های غیرفعال تغلیظ شده، پس از ۲۱ روز، نه تنها هیچ تلفاتی در موش‌های واکسینه گزارش نشد بلکه هیچ سلول آلوده‌ای در سلول مورد ارزیابی با ایمنوفلورسنت نیز رویت نشد.

جدول ۱. تیتراسیون ویروس با روش تیتراسیون عیار سنجی ویروس در نمونه‌های permeate، retentate و نمونه‌های رایج تولیدی.

نمونه	تیتر ویروس
نمونه کنترل ۱	۸×۱۰^{۵}
نمونه کنترل ۲	۲×۱۰^{۶}
نمونه retentate ۱	۲×۱۰^{۷}
نمونه retentate ۲	۸×۱۰^{۸}
نمونه permeate ۱	۰
نمونه permeate ۲	۰

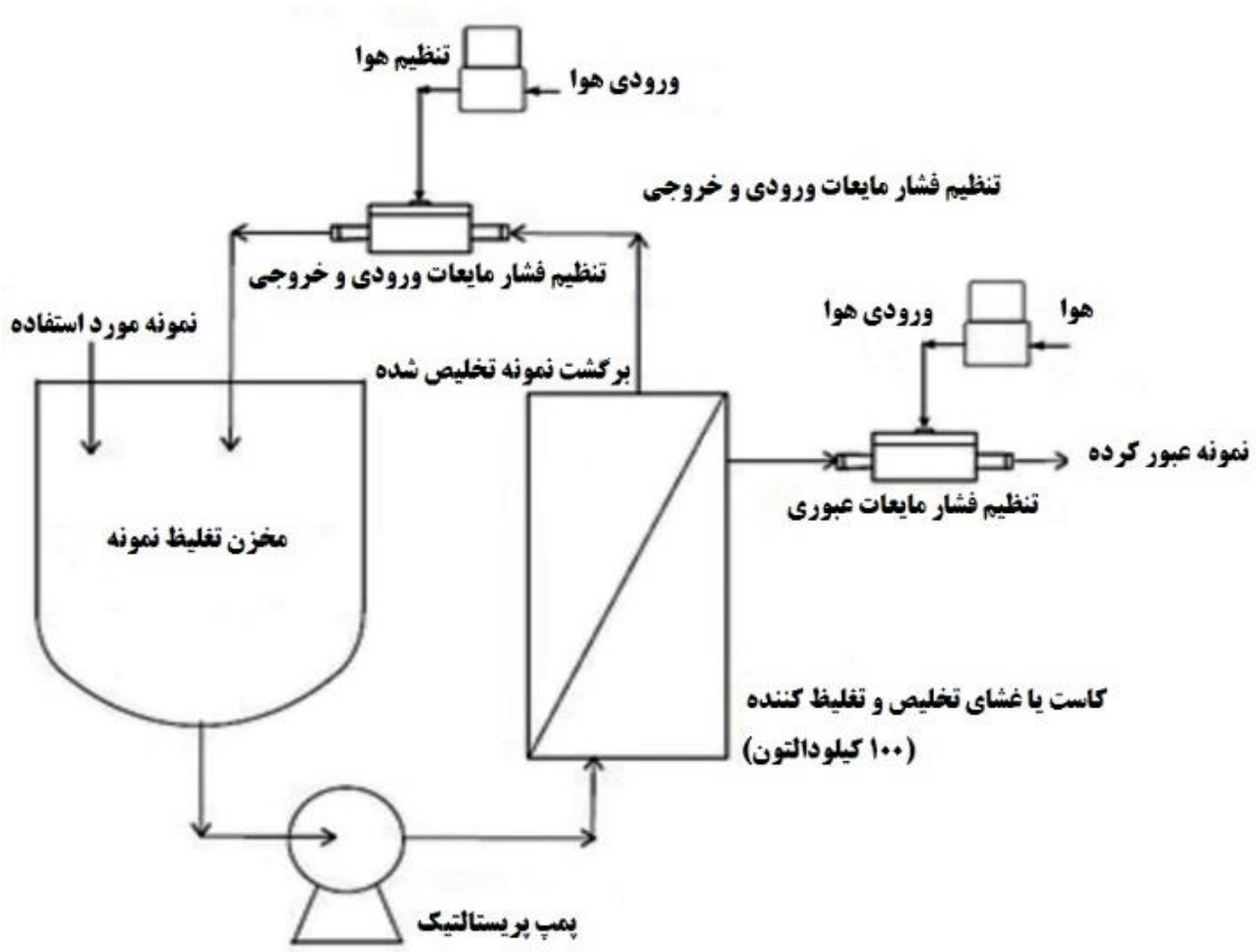
آزمایش استریل بودن: بر اساس بررسی پایداری واکسن در دراز مدت از لحاظ رنگ ظاهری و ارزیابی در دو محیط Soyabean Casein Digest Agar with Lecithin و Sabouraud Dextrose Agar (SDA)، هیچ گونه آلودگی در طول دوره مطالعه در ماه‌های اول، سوم، ششم و دوازدهم رشد قارچ، باکتری گرم مثبت و گرم منفی مشاهده نشد.

الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید: تجزیه و تحلیل ژل الکتروفورز نمونه‌های خالص و تغلیظ شده، نمونه تولیدی و نمونه عبور کرده نشان داد که ویروس خالص شده نسبت به نمونه‌های تغلیظ نشده از خلوص بیشتری برخوردار است. علاوه بر این، در نمونه‌های عبور کرده، هیچ ذره ویروس شناسایی نشد که با آزمایش تیتراسیون نیز تأیید شد که نشان‌دهنده حذف دبری‌ها و ناخالصی‌ها در طی پروسه خالص‌سازی و تغلیظ نمونه بود (تصویر ۲).

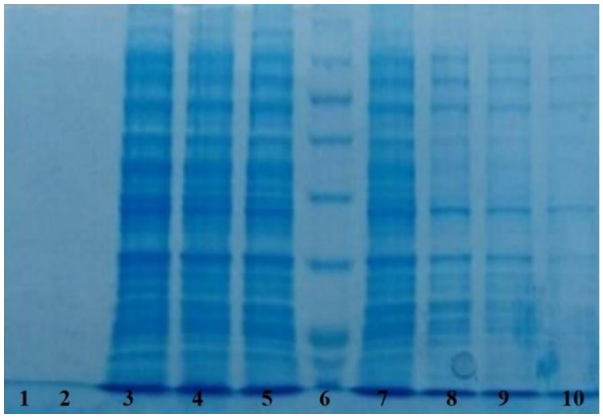
آزمون قدرت و کارایی واکسن: براساس نتایج به دست آمده از ارزیابی درون تنی قدرت و کارایی واکسن نمونه‌های تغلیظ شده و تخلیص شده در مقایسه با نمونه کنترل تولیدی در بخش، افزایش حدود ۱۰ برابری قدرت و کارایی واکسن بر اساس دوز کشنده ۵۰ درصد را نشان داد که از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$).

بحث

واکسیناسیون حیوانات، یکی از بهترین راه‌های جلوگیری ابتلا به هاری در انسان و حیوان است. تهیه واکسن مناسب با کارایی و ایمنی‌زایی مناسب نیازمند بررسی و ارتقا روش تولید می‌باشد. علاوه بر این، اهمیت کنترل ویروس هاری در زمینه‌های دامپزشکی و انسانی، محققان و شرکت‌های تولیدی را مجبور کرده است که واکسن را از طریق روش‌های مختلفی خالص‌سازی کنند. تغلیظ پروتئین‌های ایمنوژنیک و حذف سایر پروتئین‌های غیر آنتی ژنی و باقی مانده‌های سلولی، نقش مهمی در افزایش کارآیی واکسن تهیه شده ایفا می‌کند (۷). گلیکوپروتئین (G) ویروس هاری که در سطح خارجی آن قرار دارد، ۵ نانومتر طول و ۳ نانومتر قطر و وزن مولکولی حدود ۶۶ کیلودالتون داشته که اصلی‌ترین ایمونوژن برای نوترالیزاسیون آنتی بادی تولید شده بعد از واکسیناسیون محسوب می‌شوند که در مطالعه حاضر تلاش شد با خالص‌سازی سلول‌های آلوده به ویروس، ویروس‌های هاری حاوی گلیکوپروتئین تغلیظ و خالص شوند، که نقش مهمی در افزایش قدرت و کارایی واکسن و ایمنی‌زایی واکسن تولیدی داشته است (۱۷،۱۸). امروزه در دنیا استفاده از این روش جهت تغلیظ و خالص‌سازی پروتئین مرسوم شده است اما در سیستم تولید واکسن هاری دامی در کشور روش نوینی می‌باشد، که می‌تواند گام بزرگی در جهت افزایش قدرت و کارایی واکسن باشد. از سوی دیگر، حفظ کارایی و قدرت ایمنی‌زایی واکسن در طول دوره نگه‌داری از اهمیت بالایی برخوردار است. با توجه به این‌که غلظت بالای ویروس در زمان تولید واکسن نقش مهمی در میزان قدرت و کارایی آن ایفا می‌کند، تغلیظ ویروس با کمک این تکنیک بر عملکرد مناسب واکسن در طول دوره نگه‌داری تأثیرگذار می‌باشد. بهبود فرآیندهای پایین دستی در تولید واکسن یک گام بسیار مهم است. از معمول‌ترین روش‌ها، استفاده از اولتراسانتریفوژ و الکتروفورز گرادیان ساکاروز بوده که سابقاً در تولید واکسن‌های ویروسی استفاده می‌شد. اما امروزه، فیلتراسیون جریان مماسی که اساس آن جداسازی اجزا از هم بر پایه وزن مولکولی و تغلیظ مداوم و حذف پارتیکل‌های اضافی می‌باشد، روش جایگزین مناسبی در تولید واکسن می‌باشد که می‌تواند کارایی واکسن تهیه شده را افزایش دهد (۱۷،۱۸). اساس این روش تغلیظ ویروس و آنتی ژن‌های مؤثر ویروس برای ایمن‌سازی واکسن و حذف سلول‌ها و پروتئین‌های بزرگ غیر ساختمانی و غیرایمنی‌زا بر اساس سایز ملکولی می‌باشد، که می‌توانند در کارایی ویروس در ایمنی‌زایی واکسن تأثیرگذار باشد. از محاسن دیگر این روش، عدم استفاده از مواد و معرف‌های توکسیک، زمان جداسازی سریع و جریان مماسی مداوم در سراسر فیلتر غشایی با کات آف مناسب ۱۰۰۰۰۰ دالتون (۱۰۰ کیلودالتون) تحت شرایط کنترل شده می‌باشد (۲،۱۲). بر اساس مطالعات انجام شده بر روی ویروس آنفلوانزای مرغی (H9N2)، فعالیت هماگلوتینین در هر دو نمونه فعال و غیرفعال تغلیظ شده با TFF بر اساس سنجش پروتئین تام به روش برادفورد، روش ایمونوسوربنت متصل به آنزیم غیرمستقیم و آزمایش تیتر پروتئین هماگلوتنین پس از ۶ ماه در ۴ درجه سانتی‌گراد یک ثبات پایدار را نشان داد (۱۶). در مطالعه دیگری که بر روی ویروس آنفولانزا گرفته شده از انسان با ظرفیت احیای بالای فعالیت پروتئین هماگلوتنین بود، نشان داده شد که تغلیظ و خالص‌سازی ویروس با کمک TFF و با استفاده از یک کاست ۱۰۰۰۰۰ دالتون دارای عملکرد مناسبی است (۹).



تصویر ۱. تصویر شماتیک پروسه TFF، پمپ پریستالتیک، هوای ورودی و خروجی، کاست تغلیظ و تخلیص کننده، مخزن، ورودی و خروجی مایعات تخلیص شده و تغلیظ‌شده همراه با تنظیم کننده فشارهای ورودی و خروجی.



تصویر ۲. رنگ آمیزی کوماسی بلو نمونه‌ها برای تجزیه و تحلیل ژل الکتروفورز. خط ۶: استاندارد پروتئین Precision Plus Protein™- خطوط ۸، ۹ و ۱۰ نمونه تغلیظ نشده بدون استفاده از TFF و تولید شده به صورت روتین در انستیتو پاستور ایران- خطوط ۳ و ۴ و ۵ و ۷ نمونه‌های تغلیظ شده با TFF (قسمت تغلیظ و تخلیص شده یا همان retentate) و خطوط ۱ و ۲ مربوط به نمونه عبور کرده و یا permeate.

در مطالعه حاضر، خالص‌سازی و تغلیظ ویروس هاری به روش TFF انجام شد و تأثیر این روش بر قدرت و کارایی واکسن با استفاده از آزمایش NIH ارزیابی شد که بیانگر افزایش میزان قدرت و کارایی واکسن در مقایسه با نمونه مشابه بود. این نتیجه با نتایج مطالعه قبلی پیرامون خالص‌سازی نوکلئوپروتئین ویروس هاری با تکنیک اولتراسانتریفیوژ که نوکلئـــوپروتئین ویروس هاری خالص‌سازی شده توسط ژل الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت، مطابقت دارد (۱،۳). در مطالعه حاضر، سلول آلوده به سویه PV ویروس هاری فعال از طریق سیستم TFF با استفاده از یک کاست ۱۰۰ کیلو دالتونی تغلیظ و تخلیص شد که در نمونه‌های عبور کرده ارزیابی شده بر اساس آزمایش تیتراسیون، هیچ گونه فعالیتی از گلیکوپروتئین G قابل شناسایی نبود اما در قسمت تغلیظ شده فعالیت گلیکوپروتئین مذکور افزایش یافته بود. در مطالعه Meslin

و همکاران در سال ۱۹۹۶ که بر روی تغلیظ ویروس نیوکاسل انجام شده است با کمک روش تغلیظ جریان مماسی مداوم ویروس در حداکثر فشار قسمت ورودی و حداقل فشار خروجی، حداکثر قدرت و کارایی واکسن را نشان داد (۱۲). روش فیلتراسیون ویروسی برای جداسازی پارتیکل ویروس از پروتئین‌ها یا اجزای کوچک محیط کشت در موارد نیاز به حذف ویروس یا یکی از مراحل هاروست ویروس به کار می‌رود. Jagannathan و همکاران در سال ۲۰۱۵ از این روش برای تغلیظ ویروس کشت داده شده بر روی سلول‌های vero و غیر فعال شده با بتاپروپیولاکتون استفاده کردند و نتایج حاصل از بررسی واکسن تهیه شده با روش سنجش سطح آنتی بادی با تست سریع ممانعت از تشکیل اجسام فلورسانس و کروماتوگرافی پروتئین‌های ویروس هاری بیانگر مؤثر بودن روش در تولید واکسن هاری انسانی دارد (۷). Grzenia و همکاران در سال ۲۰۰۶ بیان کردند که یکی از روش‌های مناسب جهت تخلیص ویروس پاروا برای تولید واکسن و ژن تراپی، استفاده از سیستم TFF می‌باشد (۴).

از سوی دیگر، Thomassen و همکاران در سال ۲۰۱۳ جهت تصفیه ویروس فلج اطفال از سیستم فیلتراسیون معمولی ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرومتر استفاده کردند و جهت تغلیظ ویروس، از سیستم فیلتراسیون مداوم مماسی با پور سایز ۱۰۰ کیلودالتون استفاده شد، که سبب افزایش قدرت ایمنی‌زایی واکسن تهیه شده و افزایش ماندگاری قفسه‌ای واکسن شد (۱۷). در این مطالعه نیز از سیستم فیلتراسیون مداوم مماسی با پور سایز ۱۰۰ کیلودالتون استفاده شد که قدرت ایمنی‌زایی واکسن تهیه شده و ماندگاری قفسه‌ای واکسن افزایش پیدا کرد که از لحاظ آماری، افزایش معنی‌داری را نشان می‌داد. همچنین دبری‌ها و ذرات ناخالص ایجاد شده در پروسه تولید نیز کاهش یافت که خود در ارتقای کیفیت واکسن تولیدی نقش مهمی دارد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست آمده در شرایط برون تنی که به روش تیتراسیون ویروسی انجام شد و در شرایط درون تنی که با کمک ارزیابی قدرت و کارایی واکسن با روش NIH بررسی گردید، چنین به نظر می‌آید که استفاده روش فیلتراسیون غشای مماسی جهت تغلیظ و تخلیص مایعات ویروسی می‌تواند سبب افزایش قدرت و کارایی واکسن در حیوانات واکسینه شود و با توجه به وجود این تجهیزات، امکان اجرای این روش در مقیاس تولید صنعتی واکسن هاری دامی وجود دارد.

شرکت نمودن انسان یا استفاده از حیوان در مطالعه: آزمایش NIH و آزمایش غیرفعال سازی این مطالعه با تأیید کمیته اصول اخلاقی تحقیقات انسانی و حیوانی انستیتو پاستور ایران مطابق با بیانیه نهادی و ملی اصول اخلاقی از حیوان انجام شد. شماره کد اصول اخلاقی آن (IR.PII.REC.1394.30) می‌باشد. همچنین اشاره شد که این مطالعه تحت نظارت انستیتو پاستور ایران انجام شده است.

سپاسگزاری

هزینه‌های مطالعه حاضر توسط مجتمع تولیدی و تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران به مبلغ ۱۳۰۰۰۰۰۰۰ ریال تأمین شد و از تمام پرسنل بخش تولیدی واکسن‌های ویروسی مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران کمال تشکر را دارد.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Cashdollar, J., Wymer, L. (2013). Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies. J Appl Microbiol, 115, 1-11. https://doi.org/10.1111/jam.12143 PMID: 23360578
2. Cussler, K., Bruckner, L., Halder, M. (2006). Three Rs approaches in the quality control of inactivated rabies vaccines: The report and recommendations of an ECVAM workshop. Dev Biol, 125, 241-241. https://doi.org/10.1177/026119290303100409 PMID: 15601248
3. Dastkhosh, M., Rahimi, P., Haghighat, S., Biglari, P., Howaizi, N., Saghiri, R., Roohandeh, A. (2014). Cell culture extraction and purification of rabies virus nucleoprotein. Jundishapur J Microbiol, 7(9), e11734. https://dx.doi.org/10.5812%2Fjjm.11734 PMID: 25485056
4. Grzenia, D.L., Carlson, J.O., Czermak, P., Han, B., Specht, R., Wickramasinghe, S.R. (2006). Purification of densonucleosis virus by tangential flow ultrafiltration. Biotechnol Prog, 22(5), 1346-1353. https://doi.org/10.1021/bp060077c PMID: 17022673
5. Hemminki, K. (1981). Reactions of β-propiolactone, β-butyrolactone and γ-butyrolactone with nucleic acids. Chem Biol Interact, 34(3), 323-331. https://doi.org/10.1016/0009-2797(81)90104-6 PMID: 6161710
6. Jagannathan, S., Gandhi, P.R., Vijayakumar, R. (2013). Kinetics analysis of beta-propiolactone with tangential flow

filtration (TFF). J Biol Sci, 13(6), 521-527. http://dx.doi.org/10.3923/jbs.2013.521.527
7. Jagannathan, S., Mani, K., Vijayakumar, R. (2015). Analysis of alternative purification of beta-propiolactone inactivated, Tangential Flow Filtration concentrated Vero cell derived rabies vaccine. J Vacc and Vaccinat, 6, 1-6. https://doi.org/10.4172/2157-7560.1000269.
8. Jackson, A., Wunner, W. (2003). Rabies virus. Rabies. (1st ed.) Elsevier Science Publishers Ltd. Manitoba, Canada, p. 23-77.
9. Kalbfuss, B., Wolff, M., Morenweiser, R., Reichl, U. (2007). Purification of cell culture-derived human influenza A virus by size-exclusion and anion-exchange chromatography. Biotechnol Bioeng, 96(5), 932-944. https://dx.doi.org/10.1002%2Fbit.21109 PMID: 16937411
10. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-5. https://doi.org/10.1038/227680a0 PMID: 5432063
11. Mebatsion, T., König, M., Conzelmann, K.K. (1996). Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. Cell, 84(6), 941-951. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81072-7 PMID: 8601317
12. Meslin, F.X., Kaplan, M.M., Koprowski, H. (1996). Laboratory techniques in rabies. (3rd ed.) Hilary and World Health Organization Publisher, Geneva, Switzerland, p. 314-422.
13. Morgeaux, S., Tordo, N., Gontier, C., Perrin, P. (1993). β-propiolactone treatment impairs the biological activity of residual DNA from BHK-21 cells infected with rabies virus. Vaccine, 11(1), 82-90. https://doi.org/10.1016/0264-410X(93)90343-V PMID: 8427040
14. Müller, T., Bätza, H.J., Beckert, A., Bunzenthal, C., Cox, J.H., Freuling, C.M., Fooks, A.R., Frost, J., Geue, L., Hoeflechner, A., Marston, D., Neubert, A., Neubert, L., Revilla-Fernández, S., Vanek, E., Vos, A., Wodak, E., Zimmer, K., Mettenleiter, T.C. (2009). Analysis of vaccine-virus-associated rabies cases in red foxes (Vulpes vulpes) after oral rabies vaccination campaigns in Germany and Austria. Arch Virol, 154(7), 1081-1091. https://doi.org/10.1007/s00705-009-0408-7 PMID: 19521660
15. Schuster, P., Müller, T., Vos, A., Selhorst, T., Neubert, L., Pommerening, E. (2001). Comparative immunogenicity and efficacy studies with oral rabies virus vaccine SAD P5/88 in raccoon dogs and red foxes. Acta Vet Hung, 49(3), 285-290. https://doi.org/10.1556/004.49.2001.3.4 PMID: 11702339
16. Shirvan, A.N., Samianifard, M., Ghodsian, N. (2016). Purification of avian influenza virus (H9N2) from allantoic fluidby size-exclusion chromatography. Turk J Vet Anim Sci, 40, 107-111. https://doi.org/10.22092/ari.2017.111120.1135 PMID: 31077122
17. Thomassen, Y.E., Van Oever, A.G., Vinke, M., Spiekstra, A., Wijffels, R., Van der Pol, L., Bakker, W.A. (2013). Scale-down of the inactivated polio vaccine production process. Biotechnol Bioeng, 110(5), 1354-1365. https://doi.org/10.1002/bit.24798 PMID: 23192424
18. Wickramasinghe, S., Kalbfuss, B., Zimmermann, A., Thom, V., Reichl, U. (2005). Tangential flow microfiltration and ultrafiltration for human influenza A virus concentration and purification. Biotechnol Bioeng, 92(2), 199-208. https://doi.org/10.1002/bit.20599 PMID: 16041807
19. World Health Organization. (1998). Emerging and other communicable diseases, surveillance and control. In Yellow fever: technical consensus meeting, Geneva, Switzerland.

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 76, Number 3, 2021
Original Article

Clarification and Concentration of Rabies Virus using Tangential Flow Filtration (TFF) for Veterinary Rabies Vaccine Production

Ali Khodaeipour[1], Zohre Eftekhari[2], Arsalan Afrasiabi[1], Babak Beikzadeh[3], Mahyar Jeloudari Mamaghani[4]

[1] *Graduated from the Tehran Shomal University, Tehran, Iran*
[2] *Department of Quality Control, Research and Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Karaj, Iran*
[3] *Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran*
[4] *Graduated from the Faculty of Urmia University, Urmia, Iran*

10.22059/jvr.2020.293328.2994

Received: *13 March 2021*, ***Accepted:*** *23 May 2021*

Abstract

BACKGROUND: The veterinary Rabies vaccine was produced using BHK-21 cells and PV strain. Although various protocols have been suggested for virus purification, they have an adverse effect on the final production and require further optimization.

OBJECTIVES: The present study aimed to optimize the concentration and purification of the virus for rabies vaccine production.

METHODS: First of all, the Pasteur virus strain (PV) was cultured by using BHK 21 cells with DMEM media contain bovine fetal serum (7 %) for five days. Subsequently, the virus purification was done via tangential flow filtration (TFF) system. The quality of purifying viruses was an assessment with titration and SDS-PAGE. Secondly, the virus inactivation was optimized using Minitab software based on three factors, namely time, temperature, and concentration. Afterwards, the inactivity of the samples was tested on mice. Finally, the virus potency was evaluated by the National Institute of Health (NIH) method.

RESULTS: The viral titration test in TFF samples revealed that viral titer increased in comparison with the control group ($P<0.05$). The SDS-PAGE analysis of the purified and concentrated samples showed that the purified virus via TFF had a higher purity compared to the not-concentrated samples. Moreover, the NIH test indicated a 10-fold increase in potency result in the TFF group.

CONCLUSIONS: The present study implied that the TFF method is highly suitable for condensation and purification of a high volume of viral fluid and could be applied on an industrial scale to increase the potency of the vaccine produced.

Keywords: Rabies virus, Purification, Tangential flow filtration (TFF), Potency, Vaccine

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: z_eftekhari@pasteur.ac.ir Tel/Fax: 026-36101641/026-36102999

How to cite this article:

Khodaeipour, A., Eftekhari, Z., Afrasiabi, A., Beikzadeh, B., Jeloudari Mamaghani, M. (2021). Clarification and Concentration of Rabies Virus using Tangential Flow Filtration (TFF) for Veterinary Rabies Vaccine Production. J Vet Res, 76(3), 372-380. https://doi.org/10.22059/jvr.2020.293328.2994

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Titration virus with Labtek Virus Titration method in the permeated sample, retentated sample, and the sample without any procedure.

Figure 1. Schematic image of concentration and purification of the process via TFF method.

Figure 2. Coomassie brilliant blue staining of SDS-PAGE analysis of the samples: Lane 6: Precision Plus Protein™ three-color protein standard, molecular weight (kDa); Lanes 2, 3, 4: the samples without TFF procedures and produced in Pasteur Institute of Iran; Lanes 5, 7, 8, 9, 10: PV clarified and purified with TFF; Lane 1: the permeated sample.