نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۷ تابستان ۱۳۹۴
DOI:10.22034/vj.2015.101272

مطالعه شرائط کشت رده سلولی سویه واکسن S15 در سیستم بیوراکتور هوازی به روش Fed-batch

• **غلامرضا حبیبی (نویسنده مسئول)**
دانشیار بخش تحقیق و تولید واکسن‌های انگلی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
• **کسری اسمعیل نیا**
استادیار بخش تحقیق و تولید واکسن‌های انگلی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
• **حسن ایزدی**
هیئت علمی بخش تحقیق و تولید واکسن تب برفکی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
• **صغری بزرگی**
کارشناس بخش تحقیق و تولید واکسن‌های انگلی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: دی ماه ۹۲ تاریخ پذیرش: آبانماه ۹۳
Email: g.habibi@rvsri.ac.ir

چکیده

واکسن تیلریوز گاوی بروش فلاسک نزدیک به چهار دهه است که در ایران تولید می شود. با توجه به نیاز واکسن ضروری است شرائط تولید از نظر کمی و کیفی بهبود یافته تا نیازهای داخلی و خارجی تامین گردد. کشت سلول های رده واکسن در محیط کشت استوکر(Stoker) حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی در ظروف ساده کشت ولف (Wolf)، بیومیکسر (Biomixer) و همچنین بیوراکتور هوازی تمام کنترلی لبفورس (Labfors) به روش کشت منقطع (fed-batch) نشان داد که رشد و تکثیر سلول های حاوی شیزونت تیلریا آنولاتا در سیستم های ساده و پیشرفته بخوبی قابل انجام است. نتایج حاصل از کشت سلول های رده حاوی شیزونت تیلریا آنولاتا در روش پیشنهادی نسبت به شیوه معمول کشت در بطری های مخصوص (Roux bottle) نشانگر رشدی بیش از ۲۵۰ درصد در ظرف ولف و ۱۸۰ درصد در بیوراکتور هوازی و ۲۰۰ درصد در بیومیکسر بود. همچنین بررسی و ارزیابی کنترل کیفی محصول تولید شده در روش بیوراکتور، نشاندهنده تولید مطلوب و با کیفیت واکسن تیلریوز گاوی در این سیستم می باشد. با توجه به نتایج بدست آمده، تولید واکسن تیلریوز گاوی در سیستم بیوراکتور هوازی می تواند نتایج مثبتی در افزایش تولید و کاهش دستکاری های حین تولید و همچنین صرفه جوئی در نیروی انسانی، محیط های کشت سلولی، وسایل مصرفی، مکانیزه کردن تولید و تحت کنترل داشتن بهتر فرآیند به همراه داشته باشد.

کلمات کلیدی: واکسن، بیوراکتور، شیزونت تیلریا آنولاتا

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 107 pp: 60-66

Study on cultivation of S15 vaccine strain cell Line in aerobic bioreactor fed-batch system

By: Habibi, GH., (Corresponding Author) Parasite Vaccine Research and Production Department of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran. Esmaeil Nia, K,. Parasite Vaccine Research and Production Department of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran. Izadi, H,. Foot and Mouth Disease Vaccine Research and Production Department of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran. Bozorgi, S,. Parasite Vaccine Research and Production Department of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Email: g.habibi@rvsri.ac.ir

Received: January 2013 **Accepted: November 2014**

Bovine Theileriosis have been producing in Iran nearly four decades. While Bovine Theileriosis vaccine administration is now very crucial for disease control, therefore it is important to improve the quantity and quality of the vaccine for providing the national and export markets. The growth of *Theileria annulata* infected cell line S15 vaccine strain in Stoker cell culture medium including 10% adult bovine serum in wolf simple cell culture vessel, Biomixer and in "Labfors" fully controlled aerobic bioreactor fed-batch system has revealed the efficient growth of *T. annulata* infected cell line in all employed vessels. The obtained results determined the 250% cell growth in "Wolf" vessel, 180% in Labfors aerobic bioreactor and finally 200% for Biomixer vessel. The results for quality control of produced vaccine in proposed technique have shown the good quality of the prepared bovine Theileriosis vaccine in aerobic bioreactor system. In conclusion, according to the achieved findings, the production of bovine Theileriosis vaccine in aerobic bioreactor system might be used for high production and less manipulation of production processes as well as saving labor in order to mechanizing the production and better controlling the process of manufacturing.

Key words: Vaccine, Bioreactoer, Schizont of *Theileria annulata*

مقدمه

تیلریوز گرمسیری از بیماری های انگلی بومی حاد و گاه کشنده ای در ایران است که حاصل عفونت سلول های منوسیت ماکروفاژی و لمفوسیت‌های B بـه تـک یاخته تیلریا آنولاتـا می باشد (۵ و ۹). تیلریوز گرمسـیری در نواحی وسیعی از مناطق حاره و نیمه حاره ای نیمکره شمالی شامل مناطقی از جنـوب اروپا، شمال افریقا، خاورمیانه، هنـد تا شرق دور (چین) گزارش شده است (۸). تاثیر تیلریوز بر صنعت دامپروری و تولیدات دامی قابل توجه است. با مشاهده حیوانات بهبود یافته از تیلریوز و مقاومت آن ها در آلودگی مجدد این موضوع مورد توجه قرار گرفت که ایمنی می تواند بطور اکتسابی بوجود آمده و امکان ایجاد ایمنی فعال میسـر می باشد. با گذشت بیش از یـک قـرن از کشف تک یاخته تیلریا، تحقیقات گسـترده ای در استفاده از روش هـای مختلف ایمن سازی بـر علیه تیلریوز گـاوی بمنظور کنترل و پیشگیری انجام شده اسـت. روش های قدیمی شامل تلقیح خون آلوده به تیلریـا بود ولی سپس بـه روش آلوده سازی و درمان داروئی همزمان تغییر یافـت و نهایتـاً به تولید واکسـن های کشت سلولی منجـر شد. تاریخچه تولید واکسـن تیلریوز گاوی در ایران به سال ۱۳۵۳ بر می گردد بطوریکه تحقیقـات اولیه بر روی جدایه های بدست آمـده از حیوانات بیمار و تهیه رده‌هـای سلولی و بررسی های بیولـوژی، پاتولوژی و همچنین ایمونولوژی حیوانات تحت آزمایش صورت گرفت که منجر به تلقیح وسیع واکسـن در سطح گسـترده ای گردید (۴). امروزه تولید واکسن تیلریوز گاوی در ایران با استفـاده از سویه S15 تیره سلولی آلوده به شیزونت تیلریا آنولاتا صورت مـی گیرد (۶). روش تولیـد براساس کشت در فلاسک های شیشه ای قابل استریل و به تعداد زیاد انجام می شود که انجام این فرآیند مستلزم مهارت پرسنـل و خطر دستکاری های فـراوان است که بطور تقریبی بیش از ۶۰۰ بار در هر نوبت تولید درب فلاسک های کشت باز و بسـته می شود که هر چند این روند در شرائط استریل و در اتاق تمیز انجام می گیرد لیکن خطر آلودگـی همیشه از تهدیدهـای این روش است، از طرفی نیـاز به امکانات لازم جهـت شسـتشو و استریل نمودن فلاسک هـای کشت سلول از دیگر مشکـلات این روش می‌باشد. با اینحال از آنجائی که بهترین روش مبارزه و کنترل بیماری براساس یافته های محققین در این زمینه و همچنین توصیه سازمـان OIE استفاده از واکسـن زنده کشت نسـجی در مناطق اندمیک می‌باشـد (۲ و ۱۰)، بنابـر ایـن لازم اسـت ضمن تداوم تولید واکسـن به روش فعلـی، شرائط تولیـد بهینه و تکنولوژی ساخت از سیسـتم فلاسک بـه روش بیوراکتـور تغییـر پیدا کنـد. در این ارتباط تنهـا بررسی علمی منتشـر شـده مربوط به یک گـزارش مختصر است کـه در حجم دو و نیم لیتـر کشت تیلریا انجام شده ولی جزئیاتی اشـاره نشده است (۷). طراحی

Bioreactor اصـولاً فرآیندی پیچیده و مهندسی است که با در نظر گرفتن اصـول مهندسی بیوشیمیایی انجام می‌شـود. عوامل موثر در طراحی bi-reactor بـه فاکتورهائی مانند گاز (اکسـیژن، نیتروژن، دی اکسـید کربن) همچنیـن میزان جریان مایـع (محیط کشت) و حرکـت آن داخل راکتور بسـتگی دارد ضمناً دما، pH و درصد اکسیژن محلول و سرعت هم زدن نیز لازم اسـت بدقت کنترل و نظارت شـود. اکثر بیوراکتورهای صنعتی دارای مخزن، حسـگرها و سیستم های کنترلی هستند که با هم متصل و مرتبط هستند. امروزه اکثر تولید کنندگان فرآورده های دارویی، دستورالعمل های خـود را بر اساس روش fed-batch تنظیم مـی کنند زیرا این شیوه با بهره وری حجمی بالا و حداقل دستکاری و پیچیدگی همراه می باشد.

هدف از این مطالعه، بررسی و امکان جایگزینی روش کشت در سیستم بیوراکتـور هوازی بجای بهره گیـری از روش متداول کشت در بطری های Roux بـود. برای این منظور شرائط کشت سلول بطور معلق و متحرک در سه ظرف مختلف راه اندازی و مورد ارزیابی قرار گرفت. بهینه سازی برخی از عوامل مهم موثر در رشد و ارزیابی های نهایی برای مقایسه دو روش کشت ثابـت و متحرک انجام گردید. محصول بدست آمده در سیسـتم بیوراکتور بشکل فرآورده نهایی واکسـن تیلریوز گاوی تهیه و برای ارزیابی های بعدی درون تنی نگهداری شد. نظر به نتایج بدست آمده در روش کشت بیوراکتور و ارزیابـی هـای کیفی بـرون تنـی و درون تنی روش پیشنهـادی حاضر می‌تواند بعنوان شیوه ای مناسب در تولید واکسـن در شرائط GMP مطرح گردد.

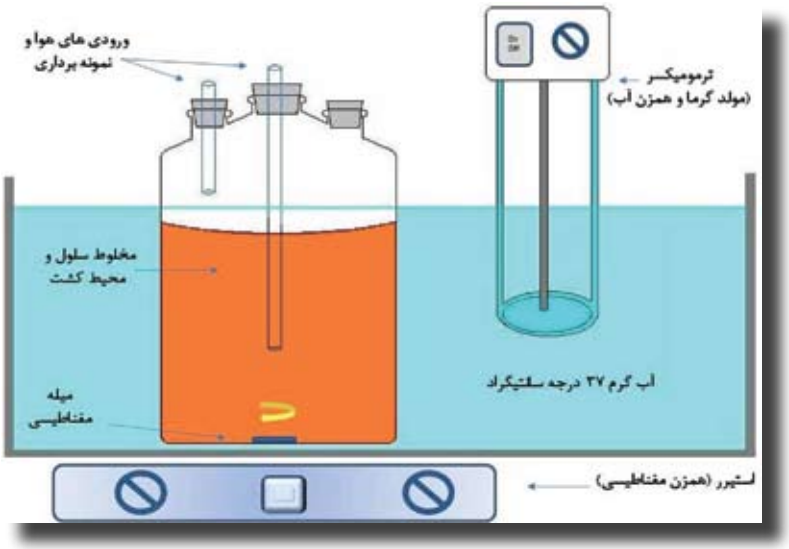
مواد و روش کار

رده سـلولی حاوی شـیزونت تخفیف حدت یافته تیلریا آنولاتا: رده سلولـی سویه واکسـن تیلریوز گاوی ایـران (S15) جهت کشت در دو سیستم فلاسک و بیوراکتور مورد استفاده قرار گرفت (۴ و ۱۲).

ظروف مورد اسـتفاده جهت کشت: در روش کشت ثابت در ظروف شیشـه ای پیرکـس بنام بطری هـای "رو" (Roux Bottle) و در سیسـتم بیوراکتـور از مخازن شیشه ای ۲ تا ۵ لیتری بنام "Wolf" با امکان هوادهی و نمونـه بـرداری از کشت سلول انجام گرفت (شکـل ۱). در مراحل بعد از بیوراکتورهای هوازی مجهـز به کنترلرهای پیشرفته تر استفاده شد (شکل ۲-الف) ضمن اینکه برای تولید در حجم های ۲۰ لیتر از Biomixer استفاده شد (شکل ۲-ب).

کشـت سلول: سلولهای حاوی شیزونت تیلریا آنولاتا در محیط کشت Stoker حاوی ۱۰ درصد سرم گاو غیرفعال شده بهمراه آنتی بیوتیک (پنی سیلیـن ۱۰۰ IU/ml و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسـین) در فلاسـک هـای مخصـوص کشت سلول (بیسـت و پنج سانتیمتر مربـع) در شرائط هوازی بهمـراه ۵ CO_2 درصـد کشت داده شدنـد. بررسی رشد بطـور روزانه و با مشاهـده فلاسک ها بـر روی میکروسکپ با لنز وارونـه (Inverted) انجام گرفت. رشد توده ای سلول ها و کاهش pH که با تغییر رنگ محیط مشخص مـی شد تعیین کننده زمـان انجام پاساژ سلولی بود کـه با افزودن محیط کشت استوکر حاوی ۱۰ درصد سرم به سلول های رشد کرده و تقسـیم در فلاسک های کشت سلولی و در شرائط استریل انجام می گرفت (۱۲).

پاسـاژ سـلولی: منظور از پاساژ سلول یک دوره رشد کامل سلول ها در محیـط کشت بوده تا جائـی که سلول ها نهایت رشد در محیط را انجام داده و بـا تغییر در رنگ محیط و نمونه بـرداری و شمارش سلول مشخص می گردد معمولاً در این زمان حدود۴ تقسـیم سلولی انجام گرفته است که در نوبـت بعـد سلول های رشد کرده با اضافه کـردن محیط کشت تازه در شرائـط استریل رقیق شده و به درون فلاسک های تازه تقسـیم می شوند (۱۲).



شکل ۱- تصویر شماتیک نحوه کشت و قرارگیری ظرف ولف "Wolf" در مخزن آب گرم جهت کشت سلول های آلوده به شیزونت تیلریا آنولاتا، از میله مغناطیسی بنام مگنت و استیرر زیر آن برای ایجاد حالت تعلیق سلولی یا سوسپانسیون استفاده شده است همچنین گرمای لازم و گردش گرما در مخزن آب گرم نیز بوسیله دستگاه ترمومیکسر تامین شده است.

هوادهـی: از آنجائی که کشت رده سلول هـای حاوی شیزونت تیلریا در شرائط هوازی می باشد بجای روش انتشار با تغییراتی در شرائط جدید، هوادهی بطور مستقیم و عمقی انجام پذیرفت.

اختلاط سوسپانسیون سـلولی (Agitation): این مرحله از کشت بـا استفاده از میله های مغناطیسـی یا پره های تعبیه شـده در بیوراکتور صورت گرفت.

اسـتفاده از مـواد ضـد کـف (Antifoam) و بافرهـای تنظیـم کننـده pH: درمراحل مختلف رشد، ضـرورت استفاده از Antifoam نظیر سیلیکـون ها، مـواد محافظ سلولـی ماننـد Carboxy methyl cellulose (CMC) و استفـاده از تنظیم کننده هـای pH (تغییر در شدت اسیدیته و قلیائی) نظیر بیکربنات سدیم در طول رشد سلول مورد توجه قرار گرفت.

بررسی میزان رشـد و مطالعه متغیرهای موثر در رشد سلول‌ها: تغییـر عوامل موثر در رشد جهت بهینه سازی رشـد و اخذ بهترین نتیجه مورد مقایسـه و بررسی قـرار گرفت. این متغیرها شامـل میزان بذر اولیه سلولی، میزان سرم موجود در محیط کشت، نسـبت محیط کشت به حجم بیوراکتـور، میزان pH اولیه و pH مناسب در طـول رشد سلول ها، میزان هوادهی، شدت اختلاط (Agitation) مورد نظر بودند.

انجام آزمایش های استریلیتی و شمارش سلول و تعیین درصد زنده بودن سـلول ها: درحین رشد بطـور روزانه بررسی های استریلیتی، شمـارش سلولـی، آزمایش درصد سلول های زنـده و مرده و pH از محیط حاوی سلول های در حال رشد انجام گرفت (۱۲).

کشـت در ظروف ساده ولف: در ابتدا بذر مناسب از سلول های رشد یافتـه، جهت کشت در بطری های ساده کشـت سلولی بنام ولف با محیط استوکـر و بـا هوادهی و عمل همـزدن بکار برده شد. گرمـای لازم جهت انکوباسیـون سلول‌ها توسط منبع مولـد گرما با نام "ترمومیکسـر" فراهم می شد به طوری که ظرف ولف حاوی سوسپانسیون سلولی در آب گرم ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داشت. هوا دهی به طور مستقیم در محیط کشت و با استفاده از فیلترهای قرارداده شده در مسیر عبور هوا انجام شد (شکل ۱).

فرایند کشـت و پاساژ در بیوراکتور ۱۳ لیتری Labfors (ساخت سـوئیس): شرائـط کشت مشابه سیسـتم ولف بود ولـی بدلیل هوادهی، اختلاط و جهت جلوگیری از تولید کف از مواد ضد کف در ابتدای هر پاساژ استفـاده شد. کلیـه انتقالات محیط کشت بـدرون بیوراکتور شامل محیط کشـت و سلول از طریق پمپ پریسـتالتیک انجام گرفـت (شکل ۲- الف). کنترل مقادیر اکسـیژن محلول، دور همزن، دما و pH در بیوراکتور، بوسیله حسگرهای تعبیه شده در دستگاه انجام پذیرفت.

کشـت انبوه سلول‌های حاوی شیزونت تیلریا آنولاتا: کشت انبوه در حجـم ۲۰ لیتـر در ظروف سـاده پیرکس "بن بـن" و همچنین ظرف مخصوص کشت با سیستم مخلوط کنندگی دیجیتال بنام Biomixer انجام شـد این ظرف بمنظور کشت میکروارگانیسـم های هـوازی توسط شرکت Thomas Scientific ارائه شده است (شکل ۲- ب).

مراحل کنسانتره سازی، فرمولاسـیون و بسته‌بندی: این مراحل در هـر دو روش فلاسک و بیوراکتور مشابه هم و مطابق دستورالعمل تولید واکسن تیلریوز گاوی صورت گرفت ضمن اینکه مراحل کنترل کیفی نیز از یک شیوه پیروی کردند (۱۲).

ارزیابی کمی و کیفی محصول تولید شـده: محصول نهایی پس از بسته بندی در ویال های ۲۰ میلی لیتری و نگهداری در برودت ۷۰- درجه سانتی گراد از نظر استریلیتی، شمارش سلولی، درصد زنده بودن و بیضرری مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۲).

روش محاسـبه و مقایسـه داده‌ها: اندازه گیری ها به تعداد سه بار و تعییـن میانگیـن یافته های مربـوط به هر کـدام از روش های تولید در

شکل۲- بیوراکتورهای مورد استفاده در کشت سلول های رده سلولی آلوده به شیزونت تیلریا آنولاتا. الف. بیوراکتور هوازی شرکت Labfors با امکانات کامل حسگرها و کنترل کننده های مختلف حین رشد و نمونه برداری لازم، در حجم ۸ لیتر مورد استفاده قرار گرفت. ب. ظرف نیمه پیشرفته Biomixer، جهت کشت سلول های آلوده به شیزونت تیلریا در حجم ۲۰ لیتر با سیستم الکترونیکی جهت کنترل مخلوط سازی محیط کشت و سلول.

ظـروف مختلف انجام گرفت. نمودار تغییرات مربـوط به هر روش براساس مقادیـر داده ها رسم گردید. آنالیز آماری، تعیین میانگین داده ها و انحراف معیار آنها با استفاده از نرم افزار موجود در برنامه Microsoft Office Excel ۲۰۰۷ انجـام شد و وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد تعیین گردید ($p < ۰/۰۵$).

نتایج

نتایج کشـت در ظروف ساده ولف و بیوراکتور ۱۳ لیتری: در این روش کشـت، متوسط حداکثـر رشد به بیش از ۲/۴۹ میلیون در میلی لیتر رسیـد که با توجه بـه میانگین معمول رشد در سیسـتم ثابت فلاسک که حـدود ۰/۸ میلیـون در هر میلـی لیتر است رشدی بیـش از ۲۵۰ درصد مشاهده شد (شکل ۳).

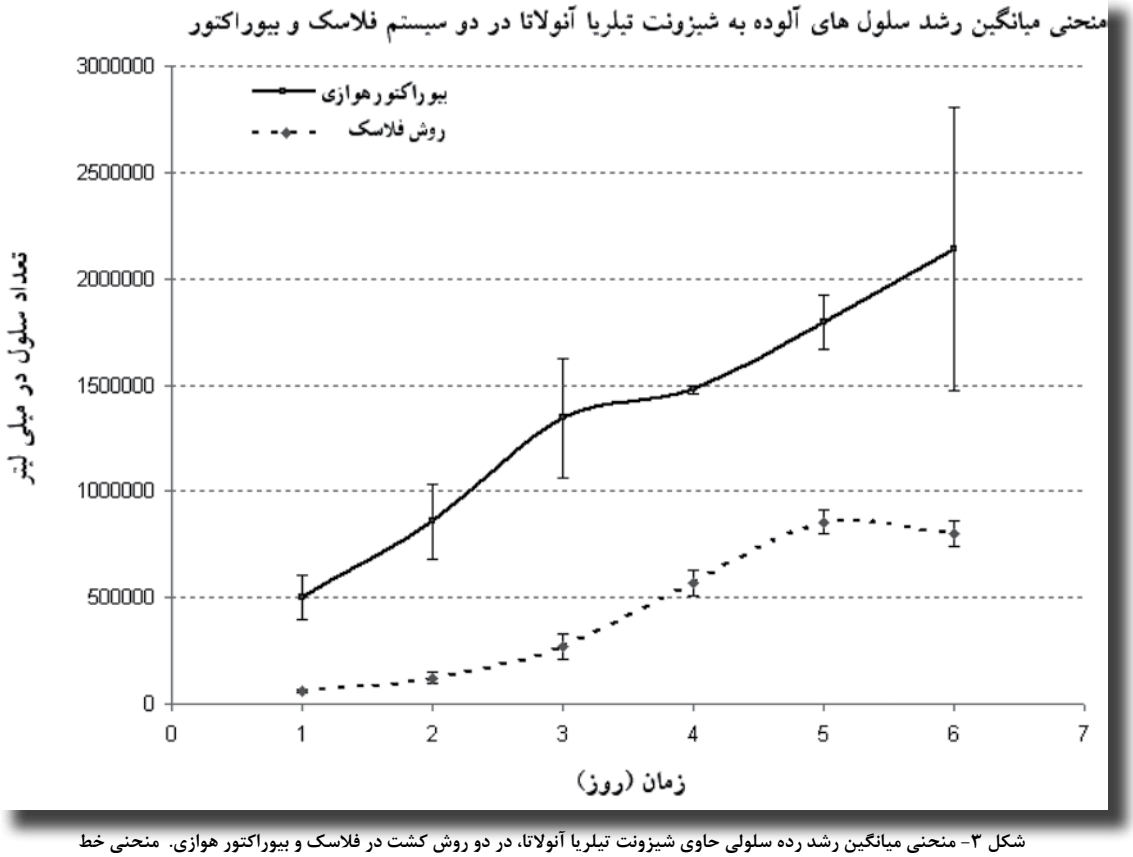
کشـت در بیوراکتورهای مجهـز به کنترل کننده هـای الکترونیکی با حجـم ۱۳ لیتـر تحت کنترل و بـا ورودی و خروجی هـای مختلف نمونه بـرداری، اندازه گیری حرارت، pH، اکسـیژن محلول و همزن پره ای انجام شـد. متوسـط حداکثـر رشد در ایـن روش به بیـش از ۱/۷۹ میلیون در میلـی لیتر رسید که رشدی تقریباً ۲۰۰ درصد را نسـبت به روش معمول کشت در سیستم فلاسک نشان داد.

نتایج کشت در مرحله انبوه یا نیمه صنعتی: کشت در حجم های بیش از ۱۰ لیتر در بن بن های ۲۰ و ۵۰ لیتری و سپس در بیومیکسـر با موفقیـت انجام شد. براساس نتایج حاصله، جمعیت سلولی بیش از دو برابر آنچه در روش معمـول حاصل می گردید، در این شیوه تولید شد، مشروط بـر آنکه میزان کافی بذر سلولی وجود داشته باشد تا جمعیت اولیه به ۳۰۰ تا ۳۵۰ هزار سلول درهر میلی لیتر برسد.

نتایـج محاسـبات آماری: نمونـه برداری های انجـام شده از کشت سلول های رده واکسـن در سیسـتم هـای ساده فلاسـک و بیوراکتور در نوبت هـای متعدد بروش استریل انجام گرفت. میانگین شمارش سلولی در روزهـای مختلف و با توجه به انحراف معیار موجود محاسبه و در شکل سه ترسیم شـده است. ضمن اینکه محاسبات آماری انجـام شده با استفاده از آزمون T –test نشان داد که اختلاف معنی دار میان دو روش کشت فلاسک و بیوراکتور وجود دارد ($p < ۰/۰۵$).

بحث

واکسـن زنـده تخفیف حدت یافتـه تیلریوز گاوی، فـرآورده ای است کـه با ایجـاد ایمنی متقاطع بیـن اکثر سویه هـای تیلریا آنولاتـا، ایمنی مطلوبـی در منطقه تحت پوشش واکسـیناسیون ایجاد می کند و از این رو



شکل ۳- منحنی میانگین رشد رده سلولی حاوی شیزونت تیلریا آنولاتا، در دو روش کشت در فلاسک و بیوراکتور هوازی. منحنی خط پیوسته نمایانگر تعداد سلول رشد یافته در روش بیوراکتور، و منحنی خط نقطه چین معرف تعداد سلول رشد کرده در روش فلاسک است. مقادیر اندازه گیری شده در دو روش و در روزهای مختلف با در نظر گرفتن خطای معیار (Standard error =SE) تعیین شده اند.

فرآورده ای بسیار موثر محسوب می شود. امروزه تنها واکسن موجود در بازار که مورد تائید سازمان OIE می باشد و برای استفاده تجاری و ایمن سازی گاوهای اصیل و دورگ بر علیه تیلریوز گرمسیری مصرف می شود واکسن کشت سلولی تخفیف حدت یافته تیلریوز گاوی است که در ایران و چندین کشور دیگر (چین، ترکیه، اسرائیل اشغالگر، جمهوری های تازه استقلال یافته آسیای میانه و هندوستان) ساخته و مصرف می شود. به گفته OIE واکسن تیلریا آنولاتا در میان سویه های مختلف پوشش ایمنی گسترده ای داشته و در تمامی نقاط اندمیک جهان لازم است واکسن استفاده شود از اینرو لازم است تا شرائط تولید بهینه و تکنولوژی ساخت از روش فلاسک به بیوراکتور تغییر و ارتقاء پیدا کند.

هر چند استفاده از فرمانتورهای مخصوص کشت باکتری ها از سابقه نسبتاً بالایی برخوردار است ولی تحقیقاتی نیز برای استفاده از بیوراکتورهای مخصوص جهت رشد برخی از سلول های حیوانی و بعبارتی اوکاریوت های عالی نیز شروع شده است. در گزارشی که بوسیله Demanga و همکاران انجام شده است، تکثیر فرم های مختلف پلاسمودیوم با استفاده از بیوراکتورهای موجی (Wave bioreactor) بجای روش های ایستا که با کمک فلاسک های کشت سلولی صورت می گیرد انجام شده و رشد مناسب تر و کیفی انگل مالاریا در مدت زمان کوتاه تری حاصل شده است (۱). در مطالعه دیگری رشد سلول های بند ناف انسانی در بیوراکتور با افزایشی نزدیک به چهل برابر در مقایسه با روش های ساده کشت در سیستم ثابت فلاسک بوسیله ریچارد و همکاران گزارش شده است. ضمن اینکه زمان دو برابر شدن سلول ها در این روش نیز کوتاه شده است (۱۱).

از آنجائی که استفاده از واکسن تیلریوز گاوی منحصر به تعدادی از کشورهای منطقه حاره و نیمه حاره ای و درگیر با بیماری بوده و تولید آن در فلاسک انجام می گیرد با اینحال تحقیقات مربوط به تولید واکسن تیلریوز بسیار ناچیز بوده و تنها سابقه تحقیقاتی مربوط به کشت رده سلولی آلوده به شیزونت تیلریا آنولاتا در سیستم بیوراکتور به یک بررسی محدود و مختصر می باشد (۷) و به جرات میتوان تحقیق حاضر را بعنوان اولین بررسی مفصل واکسن تولید شده مطرح نمود.

در این مطالعه به بررسی کشت تیره سلولی حاوی شیزونت تیلریا آنولاتا در سیستم غیر ساکن یا معلق پرداخته شد که در ضمن سنجش برخی فاکتورها از قبیل دور همزن، میزان اکسیژن موجود در محیط کشت و دمای محیط کشت و نمونه برداری از محیط کشت نیز با استفاده از هوای مثبت و در شرائط استریل انجام شد.

در مرحله نخست بهره گیری از ظروف ولف امکان کشت در شرائط تعلیق را ثابت کرد. در مرحله بعد عوامل مهم موثر در رشد با استفاده از کنترل کننده های دقیق الکترونیکی بدست آمد و نهایتاً در بیومیکسر تولید در مقادیر بیش از ۱۰ لیتر برای بررسی امکان تولید انبوه واکسن نشان داده شد. از دیگر یافته های مهم این بررسی اثبات تحمل سلول های حاوی شیزونت به ضربه های ناشی از همزن مغناطیسی و پره های بیوراکتور حتی با دورهای بالای ۳۰۰ دور در دقیقه و همچنین عدم ضرورت بکارگیری از مواد ضد کف در محیط کشت بود که امکان هوادهی مستقیم را بدون نگرانی از ایجاد کف و احتمال آلودگی فراهم می کرد.

نتایج کشت در مرحله انبوه در بن های ۲۰ و ۵۰ لیتری و سپس در مخزن بیومیکسر نشان داد که افزایش جمعیت سلولی بیش از دو برابر آنچه در سیستم فلاسک تولید می شود حاصل می گردد ضمن اینکه در روش بیومیکسر بدلیل دارا بودن همزن از بالا که بوسیله یک موتور برقی تامین می شود، نیازی به استفاده از همزن مغناطیسی نیست و بعلت قابلیت استریل شدن مجموعه بیومیکسر و سبک بودن وزن مخزن کار با آن راحت تر از بن بن می باشد.

در مجموع، استفاده از سیستم آئروبیک بیوراکتور نشان داد که این روش منجر به افزایش بهره وری بمیزان قابل توجهی می گردد چنانچه علاوه بر افزایش تولید، کاهش محیط کشت و فلاسک ها، رشد ۱۰۰ درصدی سلول ها در واحد حجم، کاهش آلودگی و دستکاری کمتر اپراتور را نیز در نظر قرار گیرد پیش بینی بسیار خوبی را می توان برای بالا بردن ظرفیت (scale up) و مکانیزه کردن تولید واکسن متصور شد.

نکات مشترک در هر سه روش بکار رفته، بهره مندی از دوز بالای بذر اولیه جهت کشت و نقش موثر و مثبت تنظیم pH در فرآیند کشت می‌باشد. یکی از عوامل مورد سنجش در سیستم بیوراکتور میزان اکسیژن محلول بود که با تنظیم آن و ورود میزان هوای لازم ضمن تثبیت هوای محلول در محیط به تنظیم pH و از طرفی اکسیژن رسانی خوب موجب افزایش کیفیت سلول و افزایش درصد سلول های زنده می گردید. نکته مهم دیگر زمان هاروست سلولی است که در صورت به تعویق افتادن ممکن است خسارات و افت قابل توجهی ایجاد کند ولی در این سیستم بدلیل وجود امکانات کنترلی می توان این زمان را تا چند ساعت به تاخیر انداخت بدون اینکه بر کیفیت و کمیت سلول ها آسیبی وارد شود. یکی دیگر از مزایای استفاده از سیستم بیوراکتور هوازی کنترل آلودگی است بطوریکه با محدود کردن شرائط و امکان ورود محدود و قابل کنترل ورودی ها و نمونه گیری ها موجب کنترل آلودگی گردید بطوریکه طی چهار پاساژ انجام شده و نمونه گیری های روزانه هیچگونه آلودگی ایجاد نگردید ولی در روش فلاسک احتمال آلودگی بیشتر می باشد. محصول تولید شده در روش بیوراکتور هوازی نشان داد که از همه نظر مناسب بوده و علاوه بر افزایش کمی سایر خصوصیات لازم از قبیل استریلیتی، میزان زنده بودن سلول ها، و بیضرری را دارا می باشد. واکسن تیلریوز گاوی در سیستم بیوراکتور هوازی پس از بهینه سازی شرائط تولید برای ارزیابی های اثربخشی روی حیوان حساس مورد آزمایش قرار گرفت و آزمایشات لازم در شرائط برون تنی و درون تنی نشان از کارائی مثبت فرآورده ساخته شده در شرائط جدید بود که در این بررسی ها از آزمون حساسیت تاخیری و اندازه گیری بیان ژن های سیتوکینی استفاده شد (۳).

با توجه به نتایج بدست آمده و مزایای بهره گیری از بیوراکتورهای استفاده شده، ظرفیت تولید بالا و محصول بدست آمده با حداقل دستکاری های حین تولید و از همه مهم تر نتایج مطلوب در بررسی های کیفی در شرائط برون تنی(*in vitro*) و درون تنی (*in vivo*) می‌توان تولید در سیستم بیوراکتور را جایگزینی مناسب و مطلوب در تولید واکسن تیلریوز گاوی پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی انجام گردید. از استاد ارجمند جناب آقای دکتر هاشمی فشارکی، آقای دکتر پیله چیان و آقای دکتر موذنی و همچنین کارشناسان محترم

آقایان اصغر افشاری و قاسمی تشکر و تقدیر می گردد.

منابع مورد استفاده

1. Demanga, CG., Eng, J., Dalton, J.P. (2012) A novel method for large-scale culture of *Plasmodium falciparum* asexual blood stage and gametocytes in a Wave Bioreactor cell culture system. Malaria Journal. 11(Suppl 1): P22.

2. Dolan, T.T., Linyonyi, A., McHardy, N., Bond, A.L. and Clampitt, R.B. (1988). Chemotherapy of East Coast fever: parvaquone treatment of Theileria parva parva at intervals after infection. Research in Veterinary Science. 44(1): 15-20.

3. Habibi, G.R., EsmaeilNia, K., Izadi, H., Ataei Amarloie, O., Afshari, A., Bordbar, N. (2014) Immunological Analysis of Aerobic Bioreactor Bovine Theileriosis Vaccine. Iranian Journal of Parasitology. 9 (3): 382-393.

4. Hashemi-Fesharki R. Control of *Theileria annulata* in Iran. Parasitology Today. 1988; 4(2): 36-40.

5. Hashemi-Fesharki R. Recent development in control of *Theileria annulata* in Iran. Parasite 1998; 5(2): 193-6.

6. Hashemi-Fesharki R, Shad-Del F. Vaccination of calves and milking cows with different strains of *Theileria annulata*. American Journal of Veterinary Research. 1973b ;34(11):1465-7.

7. Huang Jiong, Huang Liqian, Sawulie, Zuofeiya. Improvement of the Culture Conditions for Cattle's blood Leucocytes that Carry *Theileria annulata* in Bioreactor. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZGXQ903.015.htm. (visited 21 Jan 2014)

8. Irvin, A.D. (1987). Characterization of species and strains of Theileria. Advanced Parasitology. 26: 145-97.

9. McKeever, D.J. (2009). Bovine immunity - a driver for diversity in Theileria parasites? Trends in Parasitology. 25(6): 269-76.

10. OIE, 2008, Chapter 2.4.16 (http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng /Health _ standards / tahm/ 2.04.16_THEILIERIOSIS.pdf) (visited 22 Jan 2014)

11. Reichardt, A., Polchow, B., Shakibaei, M., Henrich, W., Hetzer, R, Lueders, C. (2013) Large scale expansion of human umbilical cord cells in a rotating bed system bioreactor for cardiovascular tissue engineering applications. Open Biomed Eng J. 7: 50-61.

12. Vaccine Master File (VMF) of Bovine Theileriosis, Strain 15, Razi Vaccine and Sreum Research Institute, Protozoal Vaccine research and Production Department. 2010.