DOI: 10.22092/vj.2018.100717.1014
شماره ۱۲۲ بهار ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی تغلیظ ویروس تب برفکی با استفاده از سیستم کراس فلو (Cross flow)

• همایون مهروانی
بخش تحقیق و تولید واکسن تب برفکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۱۷-۰۳-۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: ۲۱-۰۵-۱۳۹۷
Email: h.mahravandi@rvsri.ac.ir

چکیده

واکسن تب برفکی از جمله واکسن‌های غیرفعال ویروسی است و توانمندی آن به کیفیت آنتی‌ژن، میزان غلظت آنتی‌ژن در هر دز واکسن، و یاور بستگی دارد. در این مطالعه برای ارایه بهترین روش تغلیظ آنتی‌ژن، از سه تیپ ویروس تب برفکی شامل O، A05 و Asia فعال و غیرفعال استفاده شد. ویروس‌ها جداگانه در سلول BHK۲۱ تلقیح شدند و نیمی از هر سوسپانسیون ویروسی با اتیلن ایمین غیر فعال شد. پس از انجام آزمایش بی‌ضرری و اطمینان از غیر فعال شدن کامل ویروس‌ها، از روش فیزیکی اولترافیلتراسیون (سیستم کراس فلو) و روش شیمیایی تیمار با پلی اتیلن گلیکول (PEG ۶۰۰۰) برای تغلیظ ویروس‌ها استفاده شد. بر روی نمونه‌های تهیه شده از مراحل مختلف، آزمایش‌های جذب ویروس بر روی ژل هیدروکسید آلومینیوم، ثبوت مکمل، الایزا، عیارسنجی TCID50، و گرادیان غلظتی سوکروز برای برآورد میزان بازیافت ویروس پس از تغلیظ انجام شد. یافته‌های حاصل از این بررسی نشان داد میزان تغلیظ تأثیر قابل توجهی در جذب ویروس توسط ژل هیدروکسید آلومینیوم ندارد و میزان بازیافت در تغلیظ ویروس با استفاده از اولترافیلتر بیشتر از تیمار با PEG است.

کلمات کلیدی: ویروس تب برفکی، تغلیظ، پلی اتیلن گلیکول، اولترا فیلتر

Veterinary Researches & Biological Products No 122 pp: 17-23

Evaluation of Foot and Mouth Disease virus concentration by cross flow system

By: Mehravani H., Department of FMD Vaccine Research & Production, Razi Vaccine & Serum Research Institute, AREEO, Karaj, Iran.

Received: 2015-06-07 **Accepted: 2018-08-12**

Email: h.mahravandi@rvsri.ac.ir

Foot and Mouth Disease (FMD) vaccine is one of the inactivated vaccines and its potency depends on the antigen quality, antigen concentration per dose, and adjuvant. In this study to introduce the better antigen concentration method, both active and inactive of three serotypes O, A05, and Asia of FMD virus were used. Each of the virus type was cultivated in BHK21 cell culture and half of each viral suspension inactivated by ethylene imine. The physical method; ultra filtration (cross flow system) and the chemical method; treatment with poly ethylen glycole (PEG6000) were used for virus concentration following safety assay. The quantity of virus recovery was evaluated by virus adsorption by aluminum hydroxide gel, complement fixation, ELISA, TCID50 titration, and sucrose concentration on the collected samples. The results indicate that the concentration rate did not affect virus adoption by aluminum hydroxide gel and the quantity of virus recovery using ultra filtration was higher than PEG precipitation.

Key words: Foot and Mouth Disease virus, Concentration, Ultra filtration, Poly ethylen glycole

مقدمه

بی شك در طول تاریخ بروز بیماری‌های دامی، تب برفکی یکی از شاخص‌ترین و مهم‌ترین بیماری ویروسی دامی است که توان بالقوه زیادی برای ایجاد خسارات شدید اقتصادی در حیوانات زوج سم دارد. از علائم بارز این بیماری تب و ضعف عمومی، تاول و وزیکول روی زبان، لثه‌ها و محوطه دهانی، نوك پستان‌ها و نیز زخم و تاول در تاج سم و بین دو سم می‌باشد. میزان مرگ و میر بجز در حیوانات جوان بسیار کم است اما بیماری به سرعت گسترش و انتشار می‌یابد (۴). علی‌رغم توصیف بیماری تب برفکی در سال ۱۵۱۴ میلادی نقطه آغازین دانش کنونی در باره آن، تحقیقات لوفلر و فروش (۱۸۹۸) است که برای نخستین بار عامل بیماری را شناسایی کردند. عامل مولد بیماری تب برفکی یك آفتو ویروس از خانواده پیکورناویریده است. این ویروس در زمره کوچکترین ویروس‌های شناخته شده حاوی RNA قرار گرفته دارای ۳۰-۲۵ نانومتر قطر با ۲۲۰۰ اسید آمینه و وزن مولکولی ۸×۱۰^{۶} دالتون، و فاقد غشا خارجی می‌باشد. ویروس عامل بیماری نسبت به شرایط محیطی و تغییرات دمایی مقاوم بوده و ماندگاری زیادی در محیط دارد. وجه تمایز جنس آفتوویروس از دیگر جنس‌های خانواده پیکورنا ویریده خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن‌ها شامل حساسیت به pH پایین، داشتن چگالی بالا در رسوب با کلریدسزیم، برجسته بودن و در معرض قرار داشتن مناطق آنتی‌ژنی یا لیگاند ویروس به‌جای قرار گرفتن در کانیون است (۵).

ایمنی فعال در نشخوارکنندگان و سایر دام‌های حساس علیه تیپ‌های مختلف شایع ویروس تب برفکی، با استفاده از واکسن غیرفعال از نوع دو یا سه ظرفیتی (حاوی ۲ یا ۳ ویروس از تیپ‌های مختلف) که از سوش‌های در گردش بومی تهیه می‌شود امکان‌پذیر است. ویروس تب برفکی توانایی تحریك سیستم ایمنی هومورال را هم در حیوان آلوده و هم در حیوان واکسینه دارد. این پاسخ ایمنی علیه اپی توپ‌هایی است که ساختمان سه پروتئین خارجی ویروس شامل VP۱، VP۲ و VP۳ را تشکیل می‌دهند. ساخت واکسن تب برفکی در مسیر خود همواره شاهد استفاده از فن‌آوری‌ها و ابزارهای جدید برای کنترل بهینه و ریشه‌کنی بیماری بوده است. سه عامل اساسی در تولید این واکسن نقش دارند: تهیه آنتی‌ژن ویروسی کنسانتره در حجم زیاد، غیرفعال کردن ویروس به‌طور کامل بدون تاثیر قابل توجه روی ایمنی‌زایی، افزودن یاور غیر سمی مانند ژل هیدروکسید آلومینیوم و ساپونین که بتواند پاسخ ایمنی مناسب به‌ویژه در حیوانات بزرگ القا کند (FMD vaccine 2003). به هنگام تکثیر و رشد ویروس در سلول و پس از برداشت مایع رویی، چهار آنتی‌ژن قابل ردیابی هستند: ۱) ذرات با ضریب سدیمانتاسیون ۱۴۰ یا ذرات ویروسی کامل (ذره D) که ایمنی‌زاترین آنتی‌ژن محسوب شده و میزان تراکم آن یکی از معتبرترین معیارهای فیزیکی برای بررسی قدرت عمل و کارآیی واکسن به حساب می‌آید. ۲) ذرات ۷۵s یا C (کپسید بدون ژنوم) که ویروس بدون قرار گرفتن ژنوم داخل آن مونتاژ می شود. این ذره نیز با درصدی کمتر از ذره D ایمونوژن است. ۳) ذرات ۱۲s یا پروتئین‌های مونتاژشده کپسید شامل سه پروتئین خارجی که قدرت ایمنی‌زایی این ذرات در مقایسه با ویروس کامل بسیار کم است. ۴) ذرات ۳,۸s یا آنتی‌ژن VIA (Virus infected Associated Antigen) که فرم غیرفعال RNA پلی‌مراز ویروس هستند. حیواناتی که با ویروس کشته واکسینه می‌شوند قادر به تولید این آنزیم نیستند و در نتیجه آنتی بادی ضد VIA در سرم آن‌ها وجود ندارد و این افتراق اساس تشخیص حیوانات واکسینه از غیر واکسینه است (۶).

تعداد ذرات ویروس در یك دز واکسن غیرفعال تب برفکی تا حدود زیادی تعیین‌کننده کیفیت واکسن است. به وسیله تغلیظ می‌توان به تعداد ذرات ویروسی مناسب و نتیجه مطلوب رسید. بانک‌های واکسن ترجیح می‌دهند به‌جای ذخیره واکسن، آنتی ژن غیر فعال‌شده کنسانتره را در برودت بسیار پایین ذخیره سازند (۹). در گذشته از روش رسوب کمپلکس آنتی‌ژن همراه با $Al(OH)_3$ برای کنسانتره کردن ویروس استفاده می‌شد. پس از آن روش رسوب ویروس با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) ابداع شد که با اتصال ویروس به این پلیمر و ایجاد ذره سنگین، رسوب بوسیله سانتریفوژ امکان‌پذیر می‌شود. ساختار پلیمری این ماده سبب رسوب ذرات درشت تر می‌شود. پس از سانتریفوژ و حذف مایع‌رویی، ویروس‌ها به همراه PEG رسوب کرده و با استفاده از بافرهای خاص از PEG جدا می‌شوند (۱۱) . انواع رزین‌ها نیز برای تغلیظ و خالص‌سازی ویروس تب برفکی از سوسپانسیون ویروسی در شرایط آزمایشگاهی معرفی شده‌اند اما این سیستم برای حجم زیاد کاربرد ندارد (۴). غشاها به‌طور موفقیت‌آمیز در تغلیظ بسیاری از بیومولکول‌ها در سطح تولید انبوه استفاده شده‌اند. از دو دهه پیش، اولترافیلتر (UF) برای کنسانتره کردن آنتی‌ژن ویروس به‌کار گرفته شده است. این روش در آمریکای جنوبی در تولید واکسن‌های روغنی که به آنتی‌ژن با غلظت بسیار بالا نیاز است، کاربرد وسیعی دارد (۳). اگرچه این روش بسیار خوبی برای کنسانتره کردن ویروس در فرمانتور و با حجم بالا می‌باشد اما از نظر خالص‌سازی با محدودیت‌هایی مواجه است. برای تغلیظ ویروس تب برفکی با UF، ابتدا باید از سوسپانسیون ویروسی را از فیلتر ۰/۲ میکرومتر عبور داد سپس با استفاده از اولترا فیلتر ۲۵ الی ۴۰۰ بار ویروس را کنسانتره نمود (۱، ۱۰).
هدف از این تحقیق ارزیابی کمیت و کیفیت آنتی‌ژن سه تیپ ویروس تب برفکی شامل O، A۰۵ ، و Asia مورد استفاده در ساخت واکسن است که با استفاده از روش کراس فلو (UF) تغلیظ شده‌اند.

مواد و روش کار

ویروس تب برفکی

مقدار یک صد لیتر کشت سوسپانسیون از هر سه تیپ ویروس تب برفکی (هر ویروس ۱۰۰ لیتر) شامل O، A۰۵ ، و Asia با تلقیح در سلول BHK۲۱ کلون ۱۳ درفرمانتور تهیه شد. عیار ویروس‌ها با آزمایش TCID50 برآورد شد بدین ترتیب که سلول BA در میکروپلیت کشت داده شده و پنج چاهک با هر یک از رقت‌های ۱/۱۰ تا۱/۱۰۷ ویروس آلوده شدند. پس از ۴۸ ساعت آثار آسیب سلولی (CPE) که نشانگر فعالیت ویروس است بررسی شده و عیار از فرمول Reed & Meunch محاسبه شد. پس از تعیین عیار، ۱۰ میلی‌لیتر نمونه (S۱) از هر سوسپانسیون برداشته شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. هر یک از سوسپانسیون ویروسی به ۲ حجم ۵۰ لیتری تقسیم شد. یک حجم ۵۰ لیتری از ویروس‌ها فعال تهیه شده با ۰/۰۰۵ مول اتیلن ایمین (BEI) در حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ ساعت و در حالت میکس شدن در ظروف استیل مجهز به همزن و کنترل درجه حرارت غیر فعال شد. پس از اتمام مدت زمان غیر فعال‌سازی نمونه‌گیری جهت آزمایش بی‌ضرری (Safety) به منظور حصول اطمینان از عدم وجود ویروس زنده، انجام گرفت. برای انجام این آزمایش، ویروس تیمار شده با BEI، تا ۴ بار متوالی روی سلول BA پاساژ داده شد. پس از پاساژ چهارم عدم مشاهده CPE نشان دهنده غیر فعال‌شدن کامل در همه تیپ‌های ویروسی مورد آزمایش است. پس از آن ۱۰ میلی‌لیتر نمونه (S۲) از هر سوسپانسیون برداشته شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

شفاف‌سازی ویروس‌های زنده و غیرفعال

با استفاده از فیلتر Sartoclear در اندازه‌های منافذ ۱ و ۴ میکرو ن ، ۵۰ لیتر از سوسپانسیون ویروس‌ها فعال و۵۰ لیتر ویروس غیرفعال شده به طور جداگانه شفاف‌سازی شده و لاشه‌های سلولی آن‌ها جدا گردید. ۱۰ میلی‌لیتر نمونه از ویروس زنده (S۳) شفاف شده و ۱۰ میلی‌لیتر از ویروس غیرفعال (S۴) شفاف شده پس از فیلتراسیون برداشته شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

تغلیظ نمونه‌های ویروس

تغلیظ نمونه‌های ویروسی فعال و غیرفعال شفاف شده با فیلتر Sartoclear به دوصورت انجام شد .
۱ - با استفاده از ماده پلیمری پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (PEG ۶۰۰۰) به نسبت ۷/۵ درصد حجم ویروس .
۲ - با استفاده از روش اولترا فیلتراسیون با کاست های دارای کات اف ۱۰۰،۰۰۰ دالتون.

تغلیظ با استفاده از ماده PEG۶۰۰۰

مقدار دو لیتر از هریك از تیپ‌های ویروسی فعال و غیرفعال با عبور از فیلترسارتو کلیر شفاف شدند. سپس PEG۶۰۰۰ به میزان ۷/۵ ٪ کل حجم به ویروس اضافه شده و مدت سه ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از همزن مغناطیسی مخلوط شدند. پس از سانتریفوژ در RPM ۴۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه، از مایع‌رویی نمونه گرفته شد. رسوب جمع آوری شده در ۱۸۰ میلی‌لیتر بافر تریس به میزان ۴۰ برابر تغلیظ شد. رسوب در بافر TRIS توسط همزن مغناطیسی به مدت یك شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد و پس از سانتریفوژ در RPM ۵۰۰۰ با حذف رسوب، مایع‌رویی جمع‌آوری گردید. از ویروس تغلیظ شده نمونه‌ها گرفته شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

تغلیظ با اولترافیلتر

هریك از تیپ‌های ویروسی فعال و غیرفعال با استفاده از سیستم کراس فلو یا Tangential، دستگاه سارتوکن ۲ (II Sartocon) و کاست اولتراسارت (Ultrasart) با کات اف ۱۰۰،۰۰۰ دالتون تغلیظ شدند. با توجه به حجم ویروس‌ها و سطح موثر فیلترها برای هر ۵۰ لیتر نمونه سه کاست در نظر گرفته شد. ۱۰ میلی‌لیتر نمونه از ویروس‌های زنده و ویروس‌های غیر فعال تغلیظ شده برداشته شده و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بر روی نمونه‌های تهیه شده از مراحل مختلف، آزمایش‌های جذب ژل، ثبوت مکمل، الایزا، TCID50، و گرادیان غلظتی سوکروز برای اندازه‌گیری میزان ۱۴۰s و برآورد میزان بازیافت ویروس پس از تغلیظ انجام شد.

آزمایش جذب ژل

این آزمایش برای ارزیابی میزان جذب ویروس تب برفکی توسط ژل

هیدروکسید آلومینیوم و تاثیر تغلیظ و شفاف‌سازی روی جذب ژل، انجام شد. رقت‌های مختلف ژل با مقدار ثابت ویروس مجاور شده و پس از بیست دقیقه مخلوط ویروس و ژل سانتریفوژ شد. از مایع‌رویی برای بررسی وجود یا عدم وجود ویروس در آزمایش ثبوت مکمل نمونه‌برداری شد. بر حسب رقت ژل و عدم وجود ویروس در مایع‌رویی میزان مطلوب بودن جذب ویروس توسط ژل محاسبه شد.

آزمایش ثبوت مکمل

اساس آزمایش ثبوت مکمل مصرف کمپلمان با توجه به حضور یا عدم حضور آنتی‌ژن ویروس با استفاده از آنتی‌سرم اختصاصی هر تیپ است. در صورت مصرف کمپلمان توسط کمپلکس آنتی‌ژن و آنتی‌بادی اختصاصی آن، گلبول قرمزحساس شده گوسفند لیز شده در چاهك رسوب می‌کند. چنانچه آنتی‌ژن وجود نداشته باشد، کمپلمان به گلبول قرمز چسبیده و رسوب تشکیل نمی‌شود. در این مطالعه، رقت‌های مختلف از آنتی‌ژن ویروس تب برفکی تهیه شده و میزان آن در واحد حجم با این آزمایش براساس همولیز ۵۰٪ ارزیابی شد.

الایزا

آزمایش الایزا با استفاده از آنتی‌سرم‌های اختصاصی علیه تیپ‌های O A Asia، تهیه شده در خرگوش و خوکچه هندی به روش Sandwich Elisa انجام شد. بدین صورت که ابتدا آنتی‌بادی خرگوشی برعلیه تیپ‌های A O , Asia در پلیت‌ها ی جداگانه در کف پلیت کوت شده سپس نمونه ویروسی مورد ازمایش اضافه شده و در مرحله بعد انتی‌سرم خوکچه تهیه شده برعلیه ویروس تب برفکی تیپ‌های A , O , Asia به تناسب تیپ ویروسی پلیت اضافه می‌گردد. سپس آنتی‌بادی نشان‌دار شده با HRPO اضافه شده و بقیه مراحل مانند افزودن سوبسترا و کروموژن و متوقف کننده واکنش انجام شد و سرانجام پلیت‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر و توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد.

گرادیان غلظتی سوکروز

در این آزمایش ذرات کامل و ایمنی‌زای ۱۴۰ s ویروس در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون ویروسی از نظر وزنی اندازه‌گیری شدند. مقدار ذرات ۱۴۰s در هر میلی‌لیتر ویروس در گرادیان سوکروز ۱۵ تا ۴۵ درصد پس ازانجام اولتراسانتریفوژ در دور ۳۹۰۰۰ به مدت سه ساعت و خواندن جذب نوری در ۲۶۰ نانومترو با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$A = Ebc$

E = ضریب ثابت که برای ویروس تب برفکی ۷۶ است .

B = عرض کووت که معمولا به طور استاندارد یک سانتی متر است .

C = غلظت ماده مورد نظر که در اینجا ذره S ۱۴۶ است .

نتایج

نتایج حاصل از آزمایش بی‌ضرری نشان‌دهنده‌ی عدم وجود ویروس زنده پس از ۴۸ ساعت غیرفعال‌سازی در نمونه‌های ویروسی بود. نتایج آزمایش GAT نشان داد که ژل هیدروکسید آلومینیوم با همان رقتی که ویروس تلغیظ نشده را جذب می‌کند توانایی جذب ویروس تغلیظ شده را نیز دارد. از نظر ازمون آماری مربع کای قدرت جذب ژل تفاوت معنی‌داری بین ویروس‌های کنسانتره و غیرکنسانتره و هم چنین ویروس‌های فعال و غیرفعال وجود نداشت (p=۰/۵۷). نتایج آزمایش ثبوت مکمل نمونه‌های تهیه شده به تفکیك تیپ‌های ویروس در جدول ۱ آورده شده است.

نتایج آزمایش الایزا نمونه‌های تهیه شده به تفکیك تیپ‌های ویروس در جدول ۲ آورده شده است. هر چه میزان آنتی‌ژن ویروسی بیشتر باشد، OD خوانده شده بالاتر است بنابراین میزان آنتی‌ژن ویروس فعال و غیر فعال تیپ Asia، پس از تغلیظ با روش UF بیشتر از تیپ‌های دیگر است. نتایج آزمایش عیارسنجی (جدول ۳) بیانگر این است که میزان عیار در تیپ‌های O و Asia تقریبا مشابه هم و بیشتر از تیپ دیگر است. درصد میزان آنتی‌ژن بازیافتی در این تیپ پس از تغلیظ با روش UF بیشتر از تیمار با PEG می‌باشد.

آزمایش اندازه‌گیری میزان ۱۴۰s با روش گرادیان غلظتی سوکروز انجام گرفت که نتایج آن به تفکیک تیپ ویروسی در جدول ۴ آورده شده است. درصد میزان آنتی‌ژن بازیافتی در ویروس‌های فعال و غیر فعال پس از تغلیظ با روش UF بیشتر از تیمار با PEG می‌باشد.

بحث

در فرآیند تولید واکسن غیرفعال مؤثر و مناسب علیه ویروس‌های تب برفکی، تغلیظ ویروس با کارایی بالا ضروری است. روش‌های مختلفی برای کنسا نتره کردن آنتی‌ژن ویروسی وجود دارد مانند ترسیب ویروس با ژل هیدروکسید آلومینیوم، ترسیب ویروس با استفاده از پلیمر پلی اتیلن گلیکول، و استفاده از اولترا فیلتر (۲). در مراکز تولید واکسن بسته به توانایی و امکانات یکی از این روش‌ها یا آمیزه‌ای از آن‌ها استفاده می‌شود (۴). در این مطالعه برای تغلیظ ویروس تب برفکی تیپ‌های A۰۵، O، و Asia که در ایران بومی هستند از روش مکانیکی اولترافیلتر و روش شیمیایی پلی اتیلن گلیکول استفاده شد و کمیت و کیفیت آنتی ژن ۱۴۰s به عنوان ایمنوژن اصلی در دو مرحله پیش و پس از غیرفعال‌سازی ویروس، با آزمایش‌های مختلف ارزیابی شد.

اساس اولترافیلتر به روش کراس فلو عبور ذرات ریزتر از منافذ فیلتر که در این سیستم با دالتون نامگذاری می‌شوند و عدم عبور ذرات درشت‌تر استوار است. با پیشرفت کار از میزان مایع حاوی ذرات درشت‌تر (کنسانتره) کم شده و بر میزان مایع فیلتر شده که فاقد ذرات می‌باشد اضافه می‌گردد (۱۲). بدین ترتیب میزان تغلیظ قابل کنترل بوده و دستیابی به هر میزان از غلظت میسر خواهد بود. وزن مولکولی ویروس تب برفکی با قطر ۳۰-۲۵ نانومتر، ۸/۰۰۰/۰۰۰-۶/۰۰۰/۰۰۰ دالتون است و برای تغلیظ آن از کاست‌های ۱۰۰/۰۰۰ دالتون استفاده شد. پیش و پس از فیلتراسیون کلیه فیلترها با دستگاه آزمایش فیلتر بررسی شدند. با در نظر گرفتن سطح فیلتراسیون ۰/۷ متر مربعی، تعداد کاست‌های فیلتر براساس حجم مایع انتخاب شدند. در انتهای فیلتراسیون اغلب ۵۰ تا ۱۰۰ ویروس در مایع فیلتر شده وجود داشت که این امری طبیعی است اما چنانچه بیش از این مقدار باشد فیلتر آسیب دیده است. نتایج جذب ویروس در ژل هیدروکسید آلومینیوم نشان دهنده توانایی ژل در جذب ویروس‌های کنسانتره است. این میزان جذب تفاوتی با جذب ویروس‌های غیرکنسانتره ندارد و این به دلیل قدرت بالای جذب پروتئین توسط ژل هیدروکسید آلومینیوم است. کیفیت ژل بستگی مستقیم به نحوه عمل‌آوری و ساخت

آن دارد و درصورت کیفیت مناسب ضریب تغلیظ ۸۳ خواهد بود. بنابراین نگرانی در مورد جذب ویروس تغلیظ شده به ژل وجود ندارد و به رقت بیش از ۱/۶۵ ژل نیازی نیست.

در عمل تغلیظ ویروس نکته مهم میزان بازیافت است که تا چه حد به نسبت فاکتور تغلیظ، ویروس‌های تغلیظ شده بازیافت شده‌اند و نیز تا چه حد ویروس ازدست رفته است (۸). به طورکلی هرچه میزان بازیافت بیشتر باشد عمل تغلیظ بهتر انجام شده و با کمترین ضایعات همراه بوده است. اگرچه میزان بازیافت مطلق نبوده و به نوع آزمایش بستگی دارد (۱۳). در محاسبه‌ی ضریب بازیافت، میزان کنسانتره پیش و پس از تغلیظ در نظرگرفته شده است در نتیجه عدد ثابتی با توجه به تغییرات فاکتور رقت در آزمایش‌های مختلف بدست می‌آید که با یکدیگر قابل مقایسه هستند (۸). در این بررسی برای محاسبه ضریب بازیافت از آزمایش‌های TCID50، تبوت مکمل، و اندازه‌گیری میزان ۱۴۰s استفاده شد. با مقایسه‌ی نتایج به دست آمده، بیشترین بازیافت مربوط به آزمایش ثبوت مکمل می‌باشد که در هرکدام از ویروس‌های فعال و غیرفعال نسبت به دو آزمایش دیگر از میزان بالاتری برخوردار است. به طوری که بیشینه میزان بازیافت بین همه سروتیپ‌های مورد آزمایش ۹۸ درصد و کمینه آن ۷۸ درصد است. این میزان در آزمایش ۱۴۰s ۵۹ تا ۷۹ درصد و در TCID50 بین ۵۴ تا ۶۳ درصد محاسبه شد. مشابه با نتایج به دست آمده در این بررسی، Morrow (۱۹۷۲) میزان بازیافت ویروس تب برفکی در روش تغلیظ با اولترا فیلتر بین ۵۳ تا ۹۹ درصد را با آزمایش تبوت مکمل برآورد کرده است. دلیل بالاتر بودن میزان بازیافت در تبوت مکمل مشارکت بیشتر پروتئین‌های ویروسی چه به صورت کپسید کامل و چه به صورت پروتئین‌های کپسیدی مونتاژ نشده با آنتی‌بادی است. در حالی‌که در دو آزمایش دیگر کپسد کامل ویروسی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. علاوه بر این، در TCID50 فقط فعالیت ویروس زنده بررسی می‌شود در نتیجه امکان از دست رفتن فعالیت در مراحل تغلیظ مکانیکی و شیمیایی وجود دارد. (۱۰). در عمل امکان محاسبه ویروس زنده تغلیظ شده نسبت به پیش از تغلیظ وجود ندارد. در آزمایش گرادیان غلظتی سوکروز برای اندازه‌گیری میزان ۱۴۰s، ذره کامل ویروسی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد و احتمال این که در فرآیند تغلیظ تعدادی از ویروس‌ها واسرشت شده و ذره کامل خود را از دست بدهند وجود دارد. بنابراین میزان ۱۴۰s و در نهایت درصد بازیافت آن کاهش می‌یابد (۷) .

در این بررسی نشان داده شد میزان بازیافت هر سه تیپ O، A05، و Asia ویروس تب برفکی تغلیظ شده در تیمار با PEG نسبت به روش اولترافیلتر کمتر است. در روش شیمیایی مانند استفاده از PEG وترسیب ویروس باید پلیمر توسط بافر از ویروس جداشده و محلول ویروسی دوباره فیلتر شود. تمامی این مراحل احتمال آسیب رساندن به ویروس و کاهش میزان آنتی‌ژن را افزایش می‌دهند. بنابراین اولترافیلتر به عنوان بهترین روش تغلیظ ویروس تب برفکی و آزمایش تبوت مکمل به عنوان بهترین شاخص برای ارزیابی میزان بازیافت ویروس تغلیظ شده پیشنهاد می‌شوند.

تشکر و قدردانی

این پروژه با حمایت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و شماره مصوب ۸۷۰۱۹-۱۸-۱۸-۲ انجام شده است. بدین وسیله از همکاران بخش تحقیق و تولید واکسن تب برفکی سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

1- Adkane, H.V., Nene, S.N., et al. (1997). Concentration of foot and mouth disease virus by ultrafiltration. *Journal Of Membrane Science*, Vol 132, pp: 91-96.

2- Atha, D.H., Ingham K.C. (1981). Mechanism of Precipitation of proteins by polyethylene glycols, *Journal of Biological Chemistry,* Vol, 256, No. 23. pp: 12108-12117.

3- Barteling, S.J. (2002). Development and performance of inactivated vaccine against foot and mouth disease, *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties,* Vol, 21, No. 3. pp : 577 - 588 .

4- Doel, T.R . (2003). FMD vaccines, *Virus Research,* Vol, 91, pp: 81-99.

5- Doel, T.R., Pullen, L. (1990). International bank for Foot-and-Mouth Disease vaccine: stability studies with virus concentrates and vaccine prepared from them, *Vaccine*, Vol, 8, pp: 473-478 .

6- Herrera, M., Grande-perez, A., Perales, C., Domingo, E. (2008). Persistence of foot and mouth disease virus in cell culture revisited: implications for contingency in evolution, *Journal of General Virology,* Vol, 89, No.1. pp: 232-244.

7- Ichim, C., Wells, R. (2011). Generation of high titer viral preparations by using successive rounds of ultracentrifugation, *Methodology*, Vol, 9, No. 137. pp: 1-8.

8- Morrow, A.W. (1972). Concentration of the virus of foot-and-mouth Disease in a tangential flow ultrafiltration unit, *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology*, Vol, 22, pp: 501-505.

9- Rodriguez, L.L., Grubman, M.J. (2009). Foot and mouth disease vaccines, *Vaccine*, Vol, 5, No. 27. pp: 90-94.

10- Ryan, E., Mackay, D., Donaldson, A. (2008). Foot and mouth disease virus concentrations in products of animal origin, *Trans Boundary Emergency Diseases*, Vol, 55, No. 2. pp: 89-98.

11- Sim, S.L., He, T, Tscheliessnig, A., Muller, M., Tan, R.B., Jungbauer, A. (2012). Protein precipitation by polyethylene glycol: a generalized model based on hydrodynamic radius, *Journal of Biotechnology*, Vol, 157, No. 2. pp: 315-319.

12- Venkatachalam, A.R.K., Szyporta, M., Kiener, T.K., Balraj, P., Kwang, J. (2014). Concentration and purification of entrovirus 71 using a weak anion exchange monolithic column, *Virology Journal,* Vol 11, No. 99. pp: 1-1.

13- Yvonne, E.T., Aart, G., Monique, G.C., et al. (2013). Next generation inactivated polio vaccine manufacturing to support post-polio eradication biosafety goals, *Journal Plos ONE*, Vol, 10, No. 1371. pp: 1-14.

جدول ۱- نتایج آزمایش ثبوت مکمل بر روی نمونه های ویروس های فعال و غیر فعال تب برفکی تیپ های O، A۰۵ ، و Asia پس از تغلیظ با روش UF و تیمار با PEG

نمونه	روش تغلیظ	O				A۰۵				Asia´			
		آنتی ژن اولیه	آنتی ژن تغلیظ شده			آنتی ژن اولیه	آنتی ژن تغلیظ شده			آنتی ژن اولیه	آنتی ژن تغلیظ شده		
نمونه	روش تغلیظ	عیار CFU/ml	عیار CFU/ml	فاکتور تغلیظ*	آنتی ژن بازیافتی*	عیار CFU/ml	عیار CFU/ml	فاکتور تغلیظ	آنتی ژن بازیافتی	عیار CFU/ml	عیار CFU/ml	فاکتور تغلیظ	آنتی ژن بازیافتی
ویروس فعال	UF	۱۱۸	۵۵۴۶	۵۰	۹۴ درصد	۱۲۳	۹۲۹۰	۸۳	۹۱ درصد	۱۱۴	۵۰۷۳	۵۰	۸۹ درصد
ویروس غیر فعال	UF	۱۶۸	۶۵۸۵	۴۰	۹۸ درصد	۱۱۲	۶۱۰۶	۵۸	۹۴ درصد	۱۳۱	۷۵۵۳	۶۲	۹۳ درصد
ویروس غیر فعال	PEG	۱۶۸	۴۷۶۷	۳۳	۸۶ درصد	۱۱۲	۳۸۹۷	۴۰	۸۷ درصد	۱۳۱	۴۰۸۷	۴۰	۷۸ درصد

* فاکتور تغلیظ از تقسیم حجم آنتی ژن اولیه بر حجم آنتی ژن تغلیظ شده به دست می آید.

◙ آنتی ژن بازیافتی از تقسیم CFU/ml کل در آنتی ژن تغلیظ شده به CFU/ml کل در آنتی ژن اولیه × فاکتور تغلیظ به دست می آید.

جدول ۲- نتایج آزمایش الایزا بر روی نمونه های ویروس های فعال و غیر فعال تب برفکی تیپ های O، A۰۵ ، و Asia پس از تغلیظ با روش UF و تیمار با PEG

نمونه	روش تغلیظ	O			A۰۵			Asia´		
		آنتی ژن اولیه	آنتی ژن تغلیظ شده		آنتی ژن اولیه	آنتی ژن تغلیظ شده		آنتی ژن اولیه	آنتی ژن تغلیظ شده	
ویروس فعال		OD	OD	فاکتور تغلیظ	OD	OD	فاکتور تغلیظ	OD	OD	فاکتور تغلیظ
ویروس غیر فعال	UF	۰,۶۸۴	۲,۰۶۳	۵۰	۰,۵۸۵	۱,۹۱۵	۵۰	۰,۹۸۵	۲,۶۸۷	۵۰
ویروس غیر فعال	UF	۰,۶۰۱	۱,۸۰۲	۶۲	۰,۵۰۲	۱,۶۲۴	۶۲	۰,۸۰۱	۲,۲۵۰	۶۲
	PEG	۰,۶۰۱	۱,۵۱۸	۴۰	۰,۵۰۲	۱,۵۱۲	۴۰	۰,۸۰۱	۱,۹۹۳	۴۰

جدول ۳- نتایج آزمایش عیار سنجی بر روی نمونه های ویروس فعال تب برفکی تیپ های O، A۰۵ ، و Asia پس از تغلیظ با روش UF و تیمار با PEG

نمونه	روش تغلیظ	O				A۰۵				Asia´			
		آنتی ژن اولیه	آنتی ژن تغلیظ شده			آنتی ژن اولیه	آنتی ژن تغلیظ شده			آنتی ژن اولیه	آنتی ژن تغلیظ شده		
		عیار /TCID۵۰ ml	عیار /TCID۵۰ ml	فاکتور تغلیظ*	آنتی ژن بازیافتی*	عیار /TCID۵۰ ml	عیار /TCID۵۰ ml	فاکتور تغلیظ	آنتی ژن بازیافتی	عیار /TCID۵۰ ml	عیار ml/TCID۵۰	فاکتور تغلیظ	آنتی ژن بازیافتی
ویروس فعال	UF	$۱۰^{۶.۷۵}$	$۱۰^{۸/۲۵}$	۵۰	۶۳ درصد	$۱۰^{۷.۲۵}$	$۱۰^{۹..۸}$	۸۳	۵۴ درصد	$۱۰^{۷/۲۵}$	$۱۰^{۹}$	۵۰	۸۹ درصد
ویروس فعال	PEG	$۱۰^{۶.۷۵}$	$۱۰^{۸}$	۴۰	۵۴ درصد	$۱۰^{۷.۲۵}$	$۱۰^{۸}$	۴۰	۴۶ درصد	$۱۰^{۷/۲۵}$	$۱۰^{۸.۶۷}$	۴۰	۶۶ درصد

* فاکتور تغلیظ از تقسیم حجم آنتی ژن اولیه بر حجم آنتی ژن تغلیظ شده به دست می آید.

* آنتی ژن بازیافتی از تقسیم ml/TCID۵۰ آنتی ژن تغلیظ شده به ml/TCID۵۰ آنتی ژن اولیه × فاکتور تغلیظ به دست می آید.

جدول ۴- نتایج آزمایش گرادیان غلظتی سوکروز بر روی نمونه های ویروس های فعال و غیر فعال تب برفکی تیپ های O، A۰۵ ، و Asia پس از تغلیظ با روش UF و تیمار با PEG

نمونه	روش تغلیظ	O				A۰۵				Asia´			
		آنتی ژن اولیه	آنتی ژن تغلیظ شده			آنتی ژن اولیه	آنتی ژن تغلیظ شده			آنتی ژن اولیه	آنتی ژن تغلیظ شده		
		عیار ۱۴۰s/µg/ ml	عیار ۱۴۰s/µg/ ml	فاکتور تغلیظ*	آنتی ژن بازیافتی◙	عیار ۱۴۰s/µg/ ml	عیار ۱۴۰s/µg/ ml	فاکتور تغلیظ	آنتی ژن بازیافتی	عیار ۱۴۰s/µg/ ml	عیار ۱۴۰s/µg/ ml	فاکتور تغلیظ	آنتی ژن بازیافتی
ویروس فعال	UF	۴,۶۵	۱۸۳,۶۷	۵۰	۷۹ درصد	۵,۲۱	۲۹۴	۸۳	۷۱ درصد	۶,۲۱	۲۲۹,۷	۵۰	۷۴ درصد
ویروس غیر فعال	UF	۴,۲۱	۱۲۲,۹۳	۴۰	۷۳ درصد	۳,۹۲	۱۵۴	۵۸	۶۸ درصد	۵,۷۱	۲۴۷,۸	۶۲	۷۰ درصد
ویروس غیر فعال	PEG	۴,۲۱	۹۴,۴۷	۳۳	۶۸ درصد	۴,۱۵	۹۷,۹۴	۴۰	۵۹ درصد	۵,۷۱	۱۴۳,۸	۴۰	۶۳ درصد

* فاکتور تغلیظ از تقسیم حجم آنتی ژن اولیه بر حجم آنتی ژن تغلیظ شده به دست می آید.

◙ آنتی ژن بازیافتی از تقسیم ۱۴۰s/ml کل در آنتی ژن تغلیظ شده به ۱۴۰s/ml کل در آنتی ژن اولیه × فاکتور تغلیظ به دست می آید.