

## مقایسه‌ی چهار نوع مختلف حامل برای رشد سلول Vero و تکثیر ویروس هاری برای تولید واکسن هاری انسانی

سید مهدی حسن زاده<sup>۱</sup>، دکتر احمد فیاض<sup>۲</sup>، دکتر علی رضا زواره<sup>۳</sup>، دکتر حسین خان احمد<sup>۴</sup>، دکتر علی رضوانی<sup>۴</sup>

نویسنده‌ی مسئول: تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش تحقیقات و مرکز رفانس هاری WHO. Fayaz@pasteur.ac.ir

دریافت: ۸۹/۱۲/۹ پذیرش: ۹۰/۷/۲۱

### چکیده

**زمینه و هدف:** در این مطالعه توانایی سلول Vero برای رشد روی فیبراسل دیسک، و سه نوع ریز حامل (microcarrier) شامل سیتودکس-۱ و سیتودکس-۳ و سیگما سولوویل در فلاسک‌های همزن دار با حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر حاوی محیط کشت سرم دار ((Fetal Calf Serum (FCS) ۱۰٪ + DMEM)) و محیط کشت بدون سرم (VP-SFM) مورد مقایسه قرار گرفت. سپس تکثیر سویه‌ی فیکس ویروس هاری (Pasteur Virus) PV در سلول‌های رشد یافته در شرایط فوق به منظور تولید واکسن هاری بررسی و مقایسه شد. روش بررسی: در فاز رشد از سامانه‌ی تعویض گامی محیط کشت (Stepwise Perfusion) استفاده شد و فاز تولید ویروس در سامانه‌ی ثابت (Batch) با استفاده از Bovine Serum (BSA) Albumin ۲٪ + M199 به عنوان محیط سرم دار و VP-SFM به عنوان محیط فاقد سرم انجام شد. مقدار ریز حامل استفاده شده بر حسب سطح (سانتی‌متر مربع) و تعداد سلول اولیه‌ی تلقیح شده به محیط کشت در آزمایش‌ها یکسان و به ترتیب برابر  $12000 \text{ cm}^2$  و  $12500 \text{ cells/cm}^2$  تعیین گردید.

**یافته‌ها:** بیشترین تعداد سلول با استفاده از فیبراسل دیسک در محیط کشت DMEM برابر با  $10^7 \text{ cells/cm} \pm 0.7/1$  در روز نهم به دست آمد در حالی که کمترین تعداد سلول با استفاده از سیتودکس-۳ در محیط کشت VP-SFM برابر با  $10^7 \text{ cells/cm} \pm 0.2/4$  حاصل شد. بیشترین تیترو ویروس هاری برابر با  $10^7 \text{ FFU/ml} \pm 4/4$  در محیط کشت VP-SFM حاوی فیبراسل دیسک و کمترین تیترو در محیط M199 حاوی سیتودکس-۳ برابر  $10^7 \text{ FFU/ml} \pm 0.4/6$  حاصل شد. نتیجه‌گیری: در مجموع آزمایش‌ها فیبراسل دیسک بهتر از انواع ریز حامل رشد سلول‌ها را حمایت کرد و استفاده از DMEM برای رشد سلول و استفاده از VP-SFM برای تولید ویروس نتایج بهتری را نشان داد. واکسن تجربی تهیه شده با ویروس‌های جمع‌آوری شده از VP-SFM ایمنی‌زایی (Potency) قابل قبول معادل  $2/75 \text{ IU}$  داشت. با توجه به نتایج این تحقیق و امکان تولید و روش ساده استفاده از فیبراسل دیسک، این حامل برای کشت سلول Vero و به منظور تکثیر ویروس هاری توصیه می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** ریز حامل، سیتودکس، فیبراسل دیسک، Vero، هاری

۱- دانشجوی دکترای فرآورده‌های بیولوژیک، انستیتو پاستور ایران، مجتمع تولیدی تحقیقاتی، بخش کنترل کیفیت

۲- دکترای دامپزشکی، استادیار انستیتو پاستور ایران

۳- دکترای تخصصی فرآورده‌های بیولوژیک، استادیار انستیتو پاستور ایران، مجتمع تولیدی و تحقیقاتی

۴- دکترای تخصصی فرآورده‌های بیولوژیک، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

## مقدمه

هاری، عفونت ویروسی سیستم اعصاب مرکزی است و شخص هار گزیده در صورت بروز علائم اولیه بیماری محکوم به مرگ خواهد بود. هاری سالیانه با مرگ بیش از ۵۵ هزار مرگ انسان در سراسر دنیا یکی از نگرانی‌های مهم کشورهای در حال توسعه است و به جز استرالیا، اروپای غربی، شمال آفریقا و آمریکای شمالی، در سایر نقاط همچنان قربانی می‌گیرد. هاری در ایران اندمیک است. طبق گزارش سال ۲۰۰۹ انستیتو پاستور ایران به WHO، ۲ مورد مرگ انسان و بیش از ۳۰۰ مورد مرگ حیوان ناشی از هاری از بیشتر استان هادر آن سال گزارش شده است (۳-۱). در بسیاری از کشورها برنامه‌های منظم آموزشی جهت کنترل، پیشگیری و درمان سریع هاری برقرار است. برخی کشورها تولید واکسن هاری به روش سنتی با کشت ویروس در بافت عصبی و یا جنین جوجه را برای سال‌ها ادامه داده‌اند؛ اگرچه طبق یافته‌های جدید، این نوع از واکسن‌ها می‌توانند برای مصرف‌کننده بالقوه خطر آلودگی با عوامل ویروسی، پریون، مایکوپلاسما و ایجاد حساسیت را به همراه داشته باشند (۵۶). طی سالیان گذشته، شرکت‌های کوچک و بزرگ، رویه‌ی تولید واکسن را از تخم مرغ به بیوراکتورها تغییر داده و کشت سلول‌هایی چون Vero و MRC5 را جایگزین جنین جوجه و بافت عصبی نموده‌اند (۸-۶). واکسن هاری تولید شده با استفاده از سلول Vero ایمن و موثرتر از انواع تولید شده روی بافت‌های عصبی بوده، از انواع تولید شده با استفاده از سلول‌های دیپلوئید انسانی نظیر MRC5 اقتصادی‌تر می‌باشند (۱۶-۱۳). Vero یک سلول وابسته به اتصال (Anchorage-Dependent Cell) می‌باشد که برای تکثیر نیازمند چسبیدن به سطحی مناسب مانند فلاسک یا ریز حامل (Microcarrier) است (۹) اگرچه تلاش‌هایی برای ایجاد انواع تک سلولی شناور نیز انجام شده است (۱۷). ریز حامل‌ها با افزایش نسبت سطح به حجم، سطح وسیعی را در

حجم کمی از محیط کشت یا بیوراکتور برای رشد سلول‌ها فراهم می‌کنند به نحوی که توده سلول یا فراورده سلولی تا بیش از ده برابر قابل حصول در فلاسک‌های غلطان افزایش می‌یابد (۴۲-۱۸). استفاده از انواع ریز حامل برای کشت سلول‌های چسبان نظیر Vero قدمتی چند دهه دارد و سیتودکس یکی از انواع ریز حامل‌های رایج در کشت سلول و فیبراسل دیسک (New Brunswick Scientific) به دلیل اندازه‌ی میلی‌متری و ساختار آن، درشت حامل خلل و فرج‌دار محسوب گشته، حدود یک دهه از معرفی آن می‌گذرد. برخی از ویژگی‌های حامل‌های استفاده شده در این تحقیق در جدول شماره‌ی ۱ دیده می‌شود. با توجه به اینکه فیبراسل دیسک برای اولین بار در این تحقیق برای تولید ویروس هاری مورد ارزیابی قرار می‌گیرد، در اینجا به برخی دیگر از ویژگی‌های اشاره می‌شود ایجاد سطح زیادت‌ر در واحد حجم کمتر محیط کشت به نحوی که ۱۰ گرم فیبراسل دیسک قابل استفاده در یک حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت است و سطحی برابر  $12000 \text{ cm}^2$  سانتی‌متر مربع ایجاد می‌کند که قابل مقایسه است با  $5/2$  گرم سیتودکس در حالی که مقدار مصرف سیتودکس به‌طور معمول ۳ گرم در لیتر است. سلول‌های چسبیده درون الیاف دیسک‌ها نسبت به سطح ریز حامل‌های شناور بهتر در برابر نیروهای برشی (Shear Force) ناشی از همزن و یا صدمات ناشی از برخورد دانه‌های ریز حامل به یکدیگر محافظت می‌شوند. محیط کشت و اکسیژن به‌راحتی در تمام فضای دیسک‌های متراکم شده قادر به جریان هستند. محیط کشت و یا فراورده سلول را می‌توان به‌راحتی از سلول‌های متصل به دیسک‌ها جدا نمود (۲۰ و ۱۹). عموماً در تهیه‌ی واکسن‌های ویروسی حاصل از کشت سلول، از فراورده‌های حیوانی نظیر انواع سرم [Fetal Calf Serum (FCS)] استفاده می‌شود (۲۱). سرم دارای ویژگی منحصر به فرد است که حذف آن را از محیط کشت مشکل می‌سازد. برای نمونه می‌توان این موارد را نام برد حاوی انواع مختلفی از

فاکتورهای ضروری و مفید شامل املاح، ویتامین‌ها و هورمون‌ها است که همگی برای رشد سلول ضروری هستند.

جدول ۱. مشخصات انواع ریزحامل استفاده شده در این تحقیق

کارخانه‌ی سازنده	محیط (سانتی‌متر مربع در گرم)	تراکم استفاده شده (گرم در ۵۰۰ میلی‌گرم)	اندازه به نوع و داده	حامل
GE Healthcare, Sweden Cat# 17-0448-01,	۴۴۰۰	۲/۷۲	190 $\mu\text{m}$ spherical, non-porous dextran matrix, positively charged, hydrophilic	Cytodex-1
GE Healthcare, Sweden Cat# 17-0485-01	۲۷۰۰	۴/۴۴	175 $\mu\text{m}$ spherical, non-porous DEAE-dextran beads coated with denatured porcine-skin collagen	Cytodex-3
Sigma, Cat# Z378674	۳۶۰	۱۵	125-212 $\mu\text{m}$ , spherical, non-porous porcine collagen coated polystyrene beads,	Sigma Solohill
New Brunswick scientific, Edison,NJ (USA) Cat# M1292-0088	۱۲۰۰	۱۰	6 mm porous disks, non-woven, polystyrene-polypropylene fabric.	FibraCel disk

استفاده شود. VP-SFM محصول شرکت GIBCO یک محیط کشت بدون سرم و مناسب برای رشد سلول‌هایی نظیر CHO, Vero و BHK-21 و مناسب برای تولید ویروس است (۲۵ و ۱۰). به هر حال یک محدودیت دیگر در استفاده از محیط بدون سرم حساسیت بیشتر سلول‌های موجود در سطح ریز حامل نسبت به فشارهای مکانیکی ناشی از برخورد ریز حامل‌ها به یکدیگر است در حالی که به نظر می‌رسد سلول‌های متصل به فیبراسل دیسک کمتر تحت تاثیر قرار داشته باشند (۲۹ و ۱۰). اگرچه چند دهه از ساخت اولین واکسن انسانی ضد هاری با استفاده از نخاع خرگوش آلوده شده توسط لویی پاستور (۱۸۸۵) می‌گذرد و امروزه انواعی از واکسن‌های معتبر تهیه شده با استفاده از کشت سلول نیز موجود است، از آنجا که هاری یک چالش اجتماعی و بهداشتی در بیشتر کشورهای در حال توسعه باقی مانده است، تحقیق در جهت تولید واکسن هاری انسانی با کیفیت مناسب

حاوی انواعی از خنثی کننده‌های پروتئاز است که به‌ویژه در هنگام تریپسینه کردن سلول‌ها موثر است. سلول‌ها را در برابر نیروهای برشی اعمال شده توسط همزن به‌طور غیراختصاصی تا حدی محافظت می‌کند. توانایی اتصال به برخی مواد سمی را داشته، موجب حذف آن‌ها از دسترس سلول‌ها می‌گردد. در کنار این مزایا، مواردی از معایب سرم نیز باعث شده است حذف سرم در دستور کار محققین و برخی از تولید کننده‌های فرآورده‌های حاصل از سلول قرار بگیرد مانند تفاوت خصوصیات انواع سرم تهیه شده از منابع مختلف جغرافیایی، امکان وجود عوامل مضر شناخته شده و ناشناخته نظیر ویروس، پریون و مایکوپلازما، تحمیل مراحل جداسازی جهت تخلیص فرآورده و شرایط خاص نگهداری و حمل و نقل (۲۵-۲۱ و ۱۳). انواع زیادی از محیط کشت‌های بدون سرم (Serum Free Media) به‌صورت تجاری در دسترس است که می‌تواند به‌طور اختصاصی برای هر رده‌ی سلولی

شرکت New Brunswick Scientific (NBS) خریداری شد و مطابق دستورالعمل کارخانه‌ی سازنده آماده شد. سیتودکس قبل از استفاده، در بافر فسفات (PBS) بدون کلسیم منیزیم به مدت ۶ ساعت خیس‌انده شد و پس از اتوکلاو شدن و تخلیه PBS به فلاسک همزن دار (Spinner Flask) حاوی محیط کشت اضافه گردید. سیگما سولو هیل پس از قرار گرفتن به مدت ۲ ساعت در آب مقطر و پس از اتوکلاو شدن در PBS به محیط کشت گرم اضافه شد. فیبراسل دیسک ابتدا در فلاسک همزن دار (Spinner Basket, NBS. cat# M1222-9991) حاوی PBS استریل شد و سپس محیط کشت جایگزین PBS گردید.

**سازش پذیری (Adaptation) سلول به محیط SFM:** برای این منظور از روش آدپتاسیون متوالی (sequential) که توسط شرکت Invitrogen توصیه می‌شود، استفاده شد. ابتدا یک آمپول حاوی سلول از حالت فریز به سرعت یخ زدایی شد و در فلاسک کوچک (۲۵ سانتی متر) حاوی محیط کشت DMEM + FBS (10%) در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد حاوی CO<sub>2</sub> ۵ درصد برای ۴ تا ۳ روز قرار گرفت تا لایه‌ی سلولی کامل در تمام سطح فلاسک ایجاد شد. سلول‌ها در فاز لگاریتمی رشد به روش استاندارد تریپسینه شدند و تعداد ۳/۵ × ۱۰<sup>۵</sup> سلول به فلاسک حاوی ۷۵ درصد از DMEM حاوی سرم و ۲۵ درصد از VP-SFM منتقل شد و سلول‌ها در انکوباتور قرار گرفتند. پس از تشکیل لایه‌ی تک سلولی کامل، مجدداً سلول‌ها تریپسینه شدند و مراحل فوق در محیط حاوی ۵۰ درصد محیط سرم‌دار و ۵۰ درصد محیط بدون سرم تکرار شد. این کار تا رسیدن به کشت سلول در محیط کاملاً بدون سرم و حصول غلظت ۳ × ۱۰<sup>۶</sup> سلول در شرایطی که بیش از ۹۰ درصد سلول‌های نهایی زنده باشند ادامه یافت. از سلول‌های آدپته شده پس از چند تکثیر، به روشی که توسط Rourou شرح داده شده است بانک کاری سلول تهیه شد. در این مرحله سلول‌های تکثیر یافته در

و ارزان با استفاده از روش‌های سستی و یا نوین در کشورهایی نظیر چین، تایلند، هند، پاکستان، تونس، برزیل در حال انجام است (۱ و ۲۶). ایران به‌عنوان کشوری آلوده به هاری تاکنون تنها خریدار این واکسن بوده است و تا امروز تحقیق بنیادی برای تولید آن انجام نشده است. گزارشی در مورد استفاده از سلول Vero رشد یافته بر فیبراسل جهت تولید ویروس هاری به چاپ نرسیده است. در این تحقیق تولید ویروس هاری به منظور ساخت واکسن انسانی علیه هاری در حد آزمایشگاه با استفاده از سلول Vero رشد یافته روی فیبراسل دیسک به عنوان یک بستر جدید و سه نوع حامل دیگر مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت تا شاید نتایج حاصله زمینه‌ساز آغاز تحقیقات بیشتر برای تولید صنعتی این واکسن باشد.

### روش بررسی

**رده‌ی سلولی:** سلول Vero با شماره‌ی پاساژ ۱۴۰ از انستیتو پاستور فرانسه تهیه شد. طی ۱۰ پاساژ بانک کاری سلول (WCB) آماده گردید. برای استفاده از محیط کشت بدون سرم بانک سلول آدپته شده به محیط VP-SFM نیز ایجاد شد.

**سویه‌ی ویروس:** ویروس هاری سویه (Pasteur Virus) PV از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. PV یک ویروس تثبیت شده (fixed) و یکی از سویه‌های منتخب برای تولید واکسن هاری برای مصارف انسانی و دامی می‌باشد (۲۷).

**محیط کشت:** محیط‌های کشت DMEM, M199, VP-SFM از شرکت Invitrogen خریداری شد. FCS و سرم آلبومین گاوی (BSA) از شرکت Gibco و سایر مواد و معرف‌ها از سیگما تهیه گردید.

**آماده سازی انواع حامل‌ها:** Cytodex-1 (cat# 17-0448) و Cytodex-3 (cat# 17-0485-01) از شرکت GE-Healthcare (Sigma Solohill) (cat# z378674) از شرکت Sigma و FibraCel disk (cat# M1292-0088.) از

کشت برای اندازه‌گیری pH، غلظت گلوکز، لاکتات و آمونیوم به‌صورت روزانه استفاده گردید. از کیت‌های ساخت شرکت Biovision برای اندازه‌گیری گلوکز (Cat # k606-100) و لاکتات (Cat# k627-100) و برای اندازه‌گیری آمونیوم از کیت ساخت سیگما (Cat# AA0100) استفاده شد. برای شمارش سلول‌های متصل ابتدا ریز حامل‌ها و دیسک‌ها سه مرتبه با PBS شسته شدند، بافر تخلیه شد و محلول کریستال و یوله حاوی اسید سیتریک (۰/۱ مول) و تریتون X-100 (۰/۱ درصد) داخل لوله‌ها اضافه شد. پس از نگهداری نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، سلول‌ها لیز شده، هسته‌ی سلول‌ها با استفاده از لام هموسیستمتر شمارش گردید که بیانگر تعداد سلول متصل به حامل‌ها می‌باشد. نرخ اختصاصی رشد (Specific Growth Rate) توسط معادله زیر محاسبه شد (۳۰):

$$\mu = \frac{\ln X_n - \ln X_{n-1}}{t_n - t_{n-1}}$$

در این فرمول  $\mu$  نشان دهنده‌ی نرخ اختصاصی رشد بر حسب ساعت ( $h^{-1}$ )،  $X$  نشان دهنده‌ی غلظت سلول در زمان نمونه‌برداری و  $t$  نشان دهنده‌ی زمان بین دو نمونه‌برداری است. برای پایش وضعیت اتصال سلول‌ها روی حامل‌ها، روزانه یک قطره از محیط کشت حاوی ریز حامل روی لام ساده با درشت‌نمایی  $100\times$  توسط میکروسکپ (Inverted) بررسی شد و نسبت سلول‌های چسبیده و نسبت سطح خالی مانده در ۱۰۰ عدد ریز حامل به‌صورت چشمی تخمین زده شد (۲۶).

**تلقیح ویروس و ارزیابی سلول‌های آلوده:** پس از قرار گرفتن سلول‌ها در اواخر فاز لگاریتمی رشد، محیط کشت تخلیه شد؛ و سلول‌ها دو مرتبه با محیط تولید ویروس شسته شدند سپس محیط کشت حاوی ویروس PV با غلظت عفونت‌زایی (Multiplicity of Infection) برابر  $MOI = 0.3$  به هر فلاسک انتقال یافت. برای ارزیابی سلول‌های آلوده به ویروس متصل

شرایط بدون سرم به تعداد  $2 \times 10^6$  در هر ویال در محیط VP-SFM حاوی (۱۰ درصد) DMSO و متیل سلولوز (۰/۱ درصد) به‌منظور کاهش صدمات فیزیکی فریز شدند (۲۸).

**رشد سلول‌ها در فلاسک:** برای رشد سلول‌ها روی ریز حامل‌ها از اسپینر فلاسک ۵۰۰ میلی‌لیتری و برای رشد سلول‌ها روی فیبراسل دیسک از اسپینر بسکت ۵۰۰ میلی‌لیتری استفاده شد. ابتدا سلول‌ها در فلاسک کوچک کشت شدند و سپس در فلاسک متوسط (۷۵ سانتی‌متر) تجدید کشت به دفعات لازم انجام شد تا تعداد کافی سلول ( $1/25 \times 10^4$  سلول در سانتی‌متر مربع) برای تلقیح به فلاسک‌ها آماده گردد. از VP-SFM+ 4mM l-glutamine به‌عنوان محیط کشت فاقد سرم و از DMEM دارای ۱۰ درصد FCS به‌عنوان محیط دارای سرم استفاده شد. فلاسک‌های حاوی محیط کشت (pH=۷/۲)، حامل و سلول به انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد دارای ۵ درصد  $CO_2$  درصد منتقل شده در حالی‌که شیکر در ابتدا با سرعت ۳۰ rpm و پس از ۶ ساعت با ۴۵ rpm تنظیم شد. در فاز رشد از سامانه‌ی تعویض گامی محیط کشت (Stepwise Perfusion) استفاده شد که در آن روزانه ۷۰ درصد از محیط کشت مصرف شده با محیط کشت تازه تعویض می‌گردد. در این تحقیق هر آزمایش (جدول ۲) به‌صورت یک‌بار تکرار (Duplicate) انجام شد.

**نمونه‌برداری:** جهت شمارش سلول‌ها و اندازه‌گیری pH و متابولیت‌ها روزانه ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی ریز حامل تحت شرایط آسپتیک در لوله‌ی آزمایش جمع‌آوری شد. برای نمونه‌برداری از فیبراسل دیسک درون اسپینر بسکت، در شرایط آسپتیک و با استفاده از یک پنس بلند روزانه ۱۰ عدد دیسک و ۵ میلی‌لیتر محیط کشت در یک لوله آزمایش جمع‌آوری گردید. اندازه‌گیری متابولیت‌ها و شمارش سلول‌ها: نمونه محیط

عنوان واکسن تجربی به روش NIH (National Institute of Health) مورد ارزیابی قرار گرفت (۳۱). در این روش ابتدا موش‌های سوری با تزریق واکسن تجربی در صفاق در دو نوبت صفر و ۷ روز ایمن سازی شدند و سپس ویروس سویه‌ی CVS که ویروس استاندارد چالش بر (Challenge Virus Standard) می‌باشد داخل مغز (Cerebral) موش‌های ایمن شده تزریق گردید. همزمان و برای کنترل از واکسن خارجی مورد تایید نیز استفاده شد. توان ایمنی‌زایی واکسن به‌صورت واحد بین‌المللی در دوز تزریقی (IU) گزارش گردید.

### یافته‌ها

طی ۸ آزمایش مجزا (جدول ۲) تعداد سلول، غلظت گلوکز، لاکتات، آمونیم، تعداد ویروس و تعداد سلول پس از آلودگی به‌صورت روزانه پایش شد.

**رشد سلول:** اتصال سلول‌ها به فیبراسل سریع‌تر رخ داد به نحوی که بیش از ۹۵ درصد سلول‌ها در فاصله‌ی زمانی ۲۵ تا ۴۵ دقیقه از محیط کشت ناپدید شده، به الیف فیبراسل متصل شدند. کمترین گرایش برای اتصال نیز مربوط است به سیتودکس-۳ به نحوی که پس از ۱۰ ساعت حدود ۸۰ درصد سلول‌ها به ریز حامل‌ها متصل شدند (نتایج نشان داده نشده است). با توجه به شکل ۱ بیشترین تعداد سلول معادل  $7/1 \times 10^6$  سلول در میلی‌لیتر در فلاسک حاوی DMEM و ۱۰ گرم فیبراسل دیسک در روز نهم ( $SGR = 0/015$ ) حاصل شده است در حالی که کمترین تعداد سلول به‌دست آمده برابر ( $SGR = 0/016$ )  $2/91 \times 10^6$  سلول در میلی‌متر مربوط است به فلاسک حاوی VP-SFM و ۲/۷۵ گرم سیتودکس-۳ در روز ششم. سلول‌های متصل به سیگما سولوویل در روز چهارم به بیشترین غلظت خود برابر ( $0/017$ )  $SGR = 2/35 \times 10^6$  رسیدند. با توجه به نمودار ۲ دانسیته‌ی نهایی سلول‌های سازش یافته به محیط کشت بدون سرم (VP-SFM) کمتر اما قابل مقایسه با محیط دارای سرم می‌باشد.

به ریزحامل، یک میلی‌لیتر از محیط حاوی میکروکریر سه مرتبه با PBS شسته شد سپس سلول‌ها با استفاده از محلول استاندارد تریپسین از حامل جدا شدند و پس از آنکه توسط بافر PBS شسته شدند یک قطره از آن روی لام قرار گرفت و در زیر هود لامینار خشک شد. سپس گسترش در محلول استن ۸۰ درصد خنک به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت تا سلول‌ها روی لام ثابت شدند. سطح لام با محلول فلورسئین ایمونوگلوبولین ضد نوکلئوکسید هاری به مدت یک ساعت رنگ شد و سپس با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد (۲۶).

**تیتراسیون ویروس هاری:** غلظت ویروس هاری به روش Modified Rffit (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test) اندازه‌گیری شد و به‌صورت (Fluorescent Focus Units) FFU/ml گزارش شد (۲۹، ۳۰، ۴۳). این روش بر اساس توانایی رقت‌های مختلف نمونه حاوی ویروس در آلوده سازی کشت تک لایه یک سلول حساس مانند BHK-21 در میکرو پلیت است. پس از اضافه شدن آنتی ریونوکلئوپروتئین کنژوگه ضد هاری به هر چاهک، تعداد واحد تجمع درخشان سلول‌های آلوده (FFU) که با میکروسکپ اینورت قابل شمارش است، نمایانگر غلظت ویروس می‌باشد. برای محاسبه‌ی نرخ تولید ویروس از فرمول زیر استفاده شد:

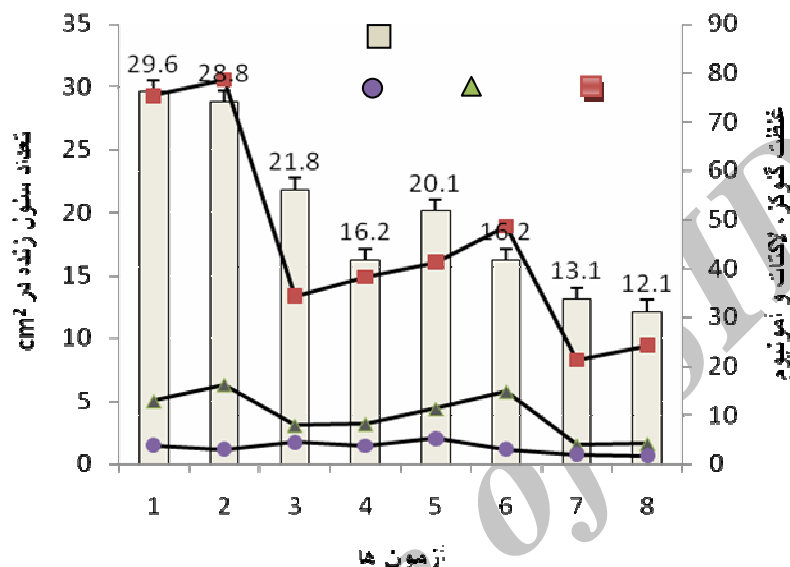
$$P = \frac{C}{(X_i - X_e)} \times \frac{1}{IP}$$

در این معادله P: نرخ تولید ویروس (Overall Virus Productivity) بر حسب C: FFU/ml/hr، غلظت ویروس،  $X_i$ : تعداد سلول در هنگام آلوده شدن،  $X_e$ : تعداد سلول در پایان تولید ویروس، IP: مدت زمان آلودگی سلول بر حسب ساعت می‌باشد.

**اندازه‌گیری توان ایمنی‌زایی (Potency) واکسن هاری:** محیط کشت حاوی ویروس پس از عبور از فیلتر ۰/۴۵ میکرون با استفاده از بتا پروپیولاکتون (1:4000) غیرفعال گردید و به

آمونیم برابر ۰/۳۷ میلی‌مول بود. نتایج مختلف نشان می‌دهد که در محیط کشت فاقد سرم (VP-SFM) غلظت گلوکز مصرفی و لاکتات تولید شده بیشتر و غلظت آمونیم تولید شده کمتر بوده است.

پایش متابولیت‌های سلولی: در نمودار ۲ دیده می‌شود که بیشترین مقدار گلوکز مصرفی برابر با ۷۸/۵۵ میلی‌مول مربوط به استفاده از فیبراسل دیسک و DMEM است. در این آزمایش مقدار نهایی لاکتات برابر ۱۲/۷۸ و مقدار نهایی



نمودار ۱: دانسیته‌ی سلول Vero ( $\times 10,000$ ) رشد یافته روی انواع حامل (مطابق جدول ۲) و ارزیابی مقدار مصرف گلوکز تولید لاکتات و آمونیم ( $\times 10\text{mM}$ ) در ۸ آزمایش جداگانه مطابق جدول ۲.

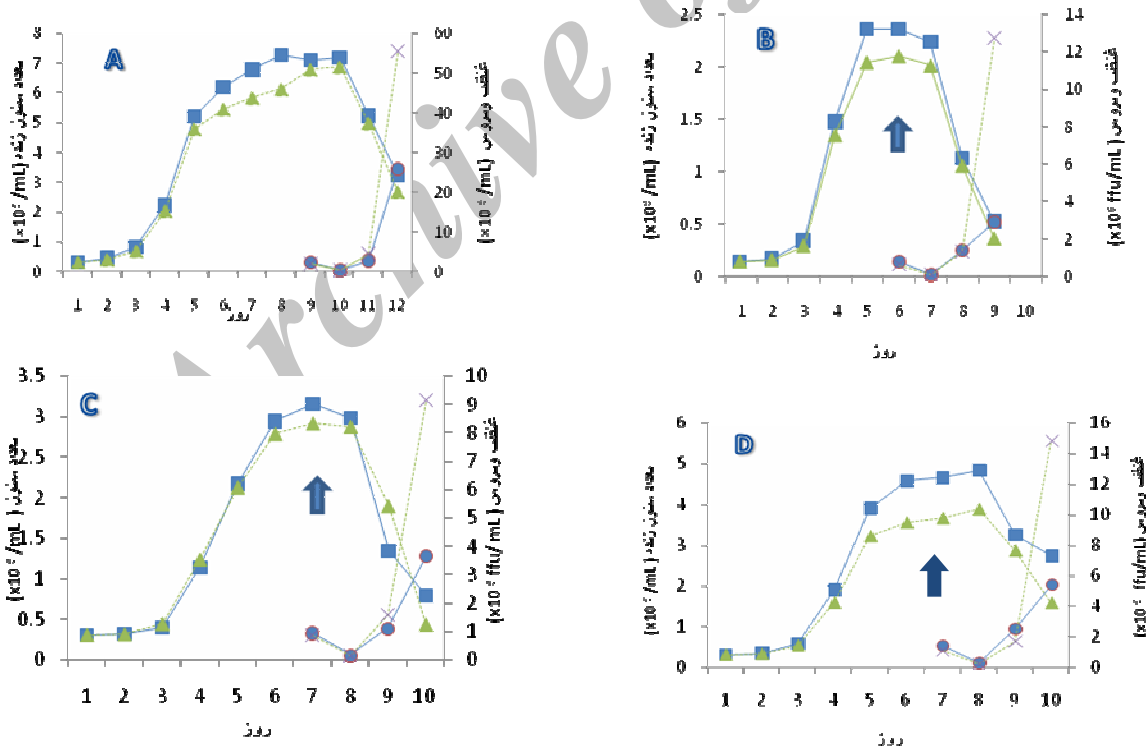
سلول‌های متصل شده به سیتودکس-۳ (FFU/cell/hr) ۰/۲۱) و سیگما سولوویل (که به واسطه‌ی مقدار سطح کمتر مهیا شده حامل تعداد کمتری از سلول نیز بوده است بود). شمارش سلول‌ها سه روز پس از آلوده شدن با ویروس نشان داد (جدول ۲) که بیشترین نرخ مرگ و میر سلول‌های آلوده به ویروس مربوط به فلاسک حاوی ریز حامل‌ها و کمترین مقدار کاهش مربوط به فلاسک حاوی فیبراسل دیسک بود.

اندازه‌گیری توان ایمنی‌زایی واکسن (Potency test): محیط کشت VP-SFM حاوی ویروس در روز سوم پس از آلودگی از فلاسک حاوی فیبراسل دیسک به روش NIH مورد ارزیابی قرار گرفت و ایمنی‌زایی ۲/۷۵IU برای آن تعیین شد.

تولید ویروس: مشاهده‌ی میکروسکوپی سلول‌ها دو روز پس از تلقیح ویروس نشان داد که بیش از ۷۰ درصد سلول‌ها آلوده هستند. در تمام آزمون‌ها مقدار ویروس طی روز سوم به حداکثر غلظت رسید و بیشترین غلظت ویروس معادل  $55/18 \times 10^6$  FFU/ml و  $0/186$  FFU/cell/hr در آزمایش ۲ (جدول ۲) با استفاده از فیبراسل دیسک در محیط کشت VP-SFM حاصل شد در حالی که در آزمایش ۱ با استفاده از  $M199+0/2/BSA$  غلظت ویروس کاهش داشته، برابر  $25/73 \times 10^6$  FFU/ml و  $0/08$  FFU/cell/hr بود. در مجموع آزمایش‌ها غلظت ویروس به دست آمده در محیط VP-SFM بیشتر از محیط M199 بود (نمودار ۲). با توجه به جدول ۲، در شرایط مشابه، کمترین نرخ تولید ویروس مربوط به

جدول ۲: نوع حامل و محیط کشت استفاده شده در آزمایش‌ها و تاثیر آن بر رشد سلول و تولید ویروس هاری

آزمون	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
نوع حامل	Fibra cel disk	Fibra cel disk	Sigma Solohill	Sigma Solohill	Cytodex-1	Cytodex-1	Cytodex-1	Cytodex-1
محیط کشت سلول	DMEM VP-SFM	DMEM VP-SFM	DMEM VP-SFM	DMEM VP-SFM	DMEM VP-SFM	DMEM VP-SFM	DMEM VP-SFM	DMEM VP-SFM
محیط تولید ویروس	VP-SFM	VP-SFM	VP-SFM	VP-SFM	VP-SFM	VP-SFM	VP-SFM	VP-SFM
تعداد سلول در میلی متر	$6/91 \times 10^6$	$7/1 \times 10^6$	$2/03 \times 10^6$	$2/35 \times 10^6$	$3/72 \times 10^6$	$4/82 \times 10^6$	$2/91 \times 10^6$	$3/15 \times 10^6$
تعداد سلول در سانتی متر مربع	$281 \times 10^3$	$296 \times 10^3$	$162 \times 10^3$	$219 \times 10^3$	$155 \times 10^3$	$201 \times 10^3$	$121 \times 10^3$	$131 \times 10^3$
نرخ اختصاصی رشد ( $h^{-1}$ )	۰/۰۱۳	۰/۰۱۵	۰/۰۲۳	۰/۰۲۹	۰/۰۱۵	۰/۰۱۷	۰/۰۱۶	۰/۰۱۶
گلوکز مصرف شده	۷۸/۵۵	۷۵/۲۳	۳۸/۱۵	۳۴/۲۶	۴۸/۵۴	۴۱/۱۸	۲۴/۱۳	۲۱/۱۷
لاکتات	۱۶/۱	۱۲/۲۸	۸/۱۲	۷/۸۳	۱۴/۷۶	۱۱/۲	۴/۰۸	۳/۷۸
آمونیم	۰/۲۹	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۴۳	۰/۲۹	۰/۵۱	۰/۱۶	۰/۱۹
ویروس در میلی لیتر (FFU/ml)	۵۵/۱۸	۲۵/۷۳	۱۲/۶۵	۲/۸۷	۱۴/۸۳	۵/۳۶	۹/۱۵	۳/۶۶
نرخ تولید ویروس	۰/۱۸	۰/۷۹	۰/۱۰۱	۰/۰۲۱	۰/۰۸۹	۰/۰۳۶	۰/۰۵۱	۰/۰۲۱



نمودار ۲: منحنی رشد سلول Vero در محیط (A) DMEM و (B) VP-SFM و تولید ویروس هاری در محیط کشت (C) VP-SFM و (D)

MI199 در فلاسک همزن دار ۵۰۰ میلی لیتری حاوی فیبراسل دیسک (A)، سیگما سولو هیل (B)، سیتودکس-۳ (C)، سیتودکس-۱ (D).



## بحث

روش‌های دیگر نظیر گردش مجدد محیط کشت (Recirculation) که در آن محیط کشت مصرف شده با محیط کشت تازه مخلوط می‌گردد، نیز مورد توجه قرار دارد (۳۰). مقدار سیتودکس-۱، سیتودکس-۳ و فیبراسل دیسک استفاده شده در این آزمایش‌ها مساحتی برابر ۱۲۰۰۰ سانتی‌متر مربع در ۵۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت فراهم کردند و سیگما سولوویل به دلیل نسبت کمتر وزن به سطح (۳۸۰ گرم بر سانتی‌متر) و با توجه به توصیه‌ی شرکت سازنده به مصرف آن در مقدار ۲۰ تا ۳۰ گرم در لیتر، در این آزمایش‌ها با مساحت معادل ۵۴۰۰ سانتی‌متر مربع استفاده شده است. مقایسه‌ی نتایج مربوط به رشد سلول‌ها در آزمایش‌های مختلف نشان می‌دهد که رشد سلول‌ها در محیط سرم‌دار DMEM نسبت به VP-SFM کمی بیشتر، اما قابل مقایسه هستند که نشان دهنده‌ی توان VP-SFM در تأمین نیازهای سلول Vero در فقدان سرم می‌باشد (۲۹). همچنین رشد سلول‌ها روی سیتودکس-۳ ضعیف‌تر از سیتودکس-۱ بوده است که می‌تواند ناشی از سرعت کمتر اتصال سلول‌ها به سیتودکس-۳ باشد. رورو نیز در گزارش خود به این مطلب اشاره کرده است که اتصال Vero روی سیتودکس-۱ و سیتودکس-۳ به ترتیب در مدت زمان ۶ و ۱۳ ساعت رخ می‌دهد (۳۶). در مقایسه‌ی سیتودکس-۱ با سیگما سولوویل، دانسیته‌ی سلول در واحد سطح سیگما سولوویل کمی بیشتر می‌باشد؛ اما با توجه به عدم امکان استفاده از مقدار بیشتر از این ریز حامل، دانسیته‌ی سلول در واحد حجم محیط کشت کاهش نشان می‌دهد و بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که سیتودکس-۱ بهتر از دو ریز حامل دیگر موجبات رشد سلول‌ها را فراهم کرده است. نتایج مربوط به فیبراسل دیسک نشان دهنده‌ی افزایش رشد سلول‌ها به طور قابل توجه نسبت به ریز حامل‌ها است به نحوی که نسبت به سیتودکس-۱، دانسیته‌ی سلول در واحد حجم  $\log$  ۰/۲ تا ۰/۲۷ و در واحد

در تولید واکسن‌های ویروسی با استفاده از کشت سلول دو فاز اصلی وجود دارد. فاز رشد سلول که می‌بایست در آن سلول‌ها با حفظ ویژگی‌های بیولوژیک طبیعی خویش به حداکثر تعداد ممکن برسند و برای آلوده شدن با ویروس آماده شوند و فاز تکثیر ویروس که در آن سلول‌ها ضمن حمایت برای زنده ماندن با ویروس آلوده می‌شوند تا ویروس تکثیر یابد. بنابراین تکثیر بیشتر سلول‌ها در فاز رشد و حفظ بهتر سلول‌ها در فاز آلودگی موجب افزایش غلظت ویروس هاری در فاز تولید خواهد شد (۳۳ و ۳۲). در سامانه Batch و یا Fed Batch به واسطه‌ی رشد سلول‌ها به تدریج مواد مغذی کاهش یافته، متابولیت‌ها نظیر لاکتات و آمونیم انباشته می‌شوند که موجب توقف سریع‌تر رشد سلول‌ها می‌گردد در حالی که در این مطالعه از سامانه‌ی کشت تعویض گامی محیط کشت (Stepwise Perfusion) استفاده شد و در تمام آزمایش‌ها غلظت گلوکز در حد ۲ تا ۳ گرم در لیتر و غلظت لاکتات و آمونیم در سطح پایین‌تر از حد سمی برای سلول نگه داشته شد. طبق گزارش ونت و شیگر لاکتات در غلظت بیشتر از ۲۰ تا ۳۰ میلی‌مول برای سلول سمی است و این سمیت عموماً ناشی از کاهش pH و افزایش اسمولاریته محیط کشت است (۸). مقدار آمونیم نیز در غلظت کمتر از ۲ تا ۳ میلی‌مول برای حفظ سلول‌ها در شرایط مطلوب توصیه می‌گردد (۳۴). از طرف دیگر طبق مطالعات کوئسنی، سلول Vero نسبت به سایر سلول‌ها مقاومت بیشتری به افزایش غلظت لاکتات و آمونیم دارد و مقدار این متابولیت‌ها در SFM حین کشت سلول Vero به حد سمی نمی‌رسد (۳۴). اگرچه سامانه‌ی تعویض گامی محیط کشت با نرخ ۷۰ درصد موجب نگه‌داشتن غلظت گلوکز و متابولیت‌ها در سطح مطلوب می‌گردد؛ ولی هزینه بیشتری را نیز به دلیل مصرف بیشتر محیط کشت در پی خواهد داشت و بنابراین استفاده از

به دست آمده است (۳۷ و ۲۹). در توضیح دانسیته‌ی سلولی افزایش یافته با استفاده از فیبراسل دیسک باید به این نکته اشاره کرد که این حامل به واسطه ساختمان رشته‌ای بی‌بافت یک درشت حامل دارای خلل و فرج محسوب می‌شود که باعث می‌گردد سلول‌ها به راحتی در بین رشته‌ها قرار بگیرند و به دور از تاثیر نیروهای برشی حاصل از همزن رشد نمایند. ثابت بودن دیسک‌ها در فلاسک باعث می‌گردد که صدمات فیزیکی سلولی ناشی از برخورد سلول‌ها نیز به حداقل برسد ضمن اینکه تعویض گامی محیط کشت کمک می‌کند تا متابولیت‌ها در حد نامطلوب تجمع نیابند. یوکومیزو گزارش کرده است که ریز حامل‌های دارای خلل و فرج (Macroporous) بهتر از انواع ریز حامل‌های با سطح صاف (نظیر سیتودکس و سیگما سولوهیل) سلول‌ها را در برابر صدمات ناشی از نیروهای برشی حفظ می‌کنند (۳۸). صدمات فیزیکی ناشی از نیروهای برشی در محیط کشت فاقد سرم نسبت به محیط دارای سرم بیشتر است و بنابراین مزیت دیگر فیبراسل دیسک می‌تواند امکان بهره‌گیری از آن در محیط فاقد سرم جهت دستیابی به دانسیته‌ی بالاتری از سلول باشد به همین جهت است که تفاوت دانسیته‌ی سلول به دست آمده روی فیبراسل دیسک در دو نوع محیط کشت حاوی سرم و فاقد سرم تفاوت کمتری را نسبت به انواع ریزحامل نشان داده است. غلظت ویروس به دست آمده در محیط VP-SFM ۲ تا ۳ برابر بیشتر از محیط M199 بوده است که با گزارش رورو و مرتن که به ترتیب از VP-SFM و MDSS2 برای تولید ویروس هاری استفاده کرده‌اند، مطابقت دارد (۲۵ و ۲۲). غلظت ویروس به دست آمده با استفاده از فیبراسل در VP-SFM معادل  $55/18 \times 10^6$  FFU/ml می‌باشد که نسبت به نتایج رورو و ترابلسی افزایش نشان می‌دهد (۳۰ و ۲۹). مهم‌ترین دلیل افزایش غلظت ویروس حاصل از فیبراسل دیسک نسبت به سایر ریز حامل‌ها را می‌توان ناشی از دانسیته‌ی بیشتر سلول‌های آلوده و امنیت بیشتر آن‌ها در بین الیاف درون

سطح  $\log 0/18$  تا  $0/25$  افزایش داشته است در حالی که به دلیل طولانی‌تر بودن زمان کشت نرخ اختصاصی رشد کمتری نسبت به سیتودکس-۱ داشته است (جدول ۲). مقایسه‌ی نتایج حاصل از این تحقیق با یافته‌های رورو که از سیتودکس-۱ (۲ گرم در لیتر) در فلاسک همزن‌دار حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر VP-SFM استفاده کرده است ( $215 \times 10^3$  سلول در میلی‌متر و  $1/89 \times 10^6$  سلول در میلی‌متر و همچنین در مقایسه با نتایج ترابلسی که از سیتودکس-۱ (۳ گرم در لیتر) در فلاسک حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر MEM +10% FCS برای کشت سلول استفاده کرده است ( $212 \times 10^3$  سلول در میلی‌متر مربع و  $2/8 \times 10^6$  سلول در میلی‌متر) نشان می‌دهد که استفاده از مقدار بیشتری از سیتودکس-۱ در واحد حجم اگرچه به کمک تعویض گامی محیط کشت موجب افزایش دانسیته‌ی سلول در واحد حجم شده است؛ اما از طرف دیگر موجب کاهش دانسیته‌ی سلول در واحد سطح گردیده است و بنابراین امکان افزایش غلظت ریز حامل علی‌رغم تأمین تمام شرایط مطلوب کشت تنها به صورت محدود ممکن خواهد بود که در این صورت یکی از دلایل کاهش سلول می‌تواند افزایش صدمات سلولی ناشی از برخورد ریز حامل‌های شناور به یکدیگر باشد که در غلظت بالاتر بیشتر رخ می‌دهد که البته در بیوراکتور با امکان کنترل بیشتر شرایط کشت نیز وجود خواهد داشت (۳۰ و ۲۹). دانسیته سلولی به دست آمده از فیبراسل دیسک در DMEM و VP-SFM به ترتیب برابر با ( $296 \times 10^3$  و  $288 \times 10^3$  سلول در میلی‌متر) قابل مقایسه است با دانسیته‌ی گزارش شده توسط ترابلسی برابر با  $325 \times 10^3$  سلول در سانتی‌متر مربع با استفاده از سیتودکس-۱ (۳ گرم در لیتر) در بیوراکتور ۲ لیتری حاوی MEM در سامانه‌ی کشت گردش مجدد (Recirculation) و بیشتر است از دانسیته‌ی گزارش شده توسط مندونکا و پریرا برابر  $113 \times 10^3$  و  $136 \times 10^3$  سلول در سانتی‌متر که به ترتیب با استفاده از ۲ و ۱۰ گرم در لیتر سیتودکس-۱ در سامانه‌ی کشت perfusion

ویروس هاری مطلوب‌تر از انواع ریز حامل دانست (۴۱).

### نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های این تحقیق و سادگی استفاده از فیبراسل دیسک و نیز امکان تولید بسیار ساده‌تر آن نسبت به ریز حامل‌ها تحقیق جهت استفاده از آن‌ها در حجم نیمه صنعتی برای تکثیر سلول Vero برای تولید واکسن هاری توصیه می‌گردد. این تحقیق در بخش رفانس هاری انستیتو پاستور ایران انجام شده است.

### تقدیر و تشکر

از ریاست محترم انستیتو پاستور ایران برای تأمین تمام هزینه‌ها، از همکاران بخش هاری انستیتو پاستور ایران برای همراهی صمیمانه در اجرای این طرح و از خانم دکتر هلاکال (Hela Kallel) و همکاران از انستیتو پاستور تونس برای امکانات آزمایشگاهی و آموزش‌های تکنیکی تشکر به‌عمل می‌آید.

### References

- 1- Simani S. Rabies. *Pasteur Institute of Iran*. (ISBN 964 06 51575). 1383.
- 2- Meslin FX, Fishbein DB, Matter HC. Rationale and prospects for rabies elimination in developing countries. *Curr Trop Microbiol Immunol*. 1994; 187: 1-26.
- 3- FU ZF, Dietzschold B, Plotkin SA, Rupprecht CE. Improved vaccines against rabies. In: *New generation vaccines*. New York: Marcel Dekker; 1997.
- 4- Martinez L. Global infectious disease surveillance. *Int J Infet Dis*. 2000; 4: 22210-28.

دیسک‌ها دانست چرا که سلول‌های آلوده (که حساس‌تر نیز می‌باشند) متصل بر سطح ریز حامل‌ها بیشتر در خطر مرگ و میر ناشی از برخورد ریز حامل‌ها به یکدیگر می‌باشند و بنابراین نرخ تولید ویروس در آزمایش با فیبراسل دیسک و M199 بالاتر از سایر آزمایش‌ها است که ناشی از ثبات بیشتر سلول‌ها در پناه دیسک‌ها می‌باشد. تحقیق جهت استفاده از فیبراسل دیسک برای کشت سلول Vero و به منظور تولید ویروس هاری برای اولین بار در این مطالعه مورد بحث قرار گرفته است؛ اما استفاده از این حامل قبلاً برای کشت سلول CHO برای تولید ویروس هاری استفاده شده و نتایج رضایتبخش‌تر از استفاده از دیگر انواع ریز حامل در بر داشته است (۳۹ و ۴۰). همچنین گوموشدیرلیوگلو از صفحات رشته‌ای بی‌بافت (NWPFF) به مقدار ۵ گرم در لیتر در بیوراکتور حاوی MEM+۱۰% FBS برای کشت سلول BHK به منظور تولید ویروس هاری استفاده کرد و دانسیته‌ی سلولی برابر با  $2 \times 10^7$  سلول در میلی‌لیتر و ویروس با غلظت  $2 \times 10^5$  را به‌دست آورد و استفاده از این حامل را برای تولید

- 5- Yusibov V, Hooper DC, Rupprecht CE, et al. Expression in plants and immunogenicity of plant virus based experimental rabies vaccine. *Vaccine*. 2002; 20: 3155-64.
- 6- Meslin FX, Kaplan MM. General considerations in the production of brain –tissue and purified chicken embryo vaccines for human use. In *Laboratory techniques in rabies*. Geneva, Switzerland: WHO; 1996; 360-8.
- 7- Bagchi S. Preventable rabies deaths because of wrong vaccine. *Lancet Neurol*. 2004; 3: 639.
- 8- Glaser V. Bioreactor and fermentor market trends. vaccine and biopharmaceutical product

- developments boost technological innovation. *Genet Eng Biotechnol News*. 2009; 29: 1-4.
- 9- Jagannathan S, Chaansha S, Rajesh K, Santhiya T, Charles C, Venkataramana KN. Standardization and assessment of cell culture media quantities in roller poly ethylene terephthalate bottles employed in the industrial rabies viral vaccine production. *Pakistanian J Biolog Sci*. 2009; 12: 1246-52.
- 10- Chen T, Chen K. Investigation and application progress of vero cell serum-free culture. *International J Biol*. 2009; 1: 41-7.
- 11- Vincent-Flaquet JC, Peyron L, Souvras M, Moulin JC, Tektoff J, Patet J. Qualification of working cell banks for the Vero cell line to produce licensed human vaccines. *Dev Biol. Stand*. 1989; 70: 153-6.
- 12- Horaud F, Absence of viral sequences in the WHO-Vero cell bank. A collaborative study. *Dev Biol Stand*. 1992; 76: 43-6.
- 13- Montagnon BJ, Vincent-Falquet JC, Saluzzo JF. Experience with Vero cells at Pasteur Merieux Connaught. *Dev Biol Stand*. 1999; 98: 137-40.
- 14- Prem Kumar A, Bhaskara R, Joseph A, Mani, K, Swaminathan K. Process Standardization for optimal virus recovery and removal of substrate DNA and bovine serum proteins in Vero cell derived rabies vaccine. *J Biosci Bioeng*. 2002; 94: 375-383.
- 15- Duchene M, Peetermans J, DHondt E, Harford N, Fabry L, Stephenne J. Production of polio vaccines: past, present and future. *Viral Immunol*. 1990; 3: 243-72.
- 16- Montagnon BJ, Fanjet B, Nicolas AJ. The large-scale cultivation of Vero cells in microcarrier culture for virus vaccine production: preliminary studies for killed poliovirus vaccine. *Dev Biol Stand*. 1981; 47: 55-64.
- 17- Paillet C, Forno G, Kratje R, Etcheverrigaray M. Suspension-Vero cell cultures as a platform for viral vaccine production. *Vaccine*. 2009; 27: 6464-7.
- 18- Van Wezel A. Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. *Nature Lond*. 1967; 216: 64-5.
- 19- New Brunswick Scientific. Inoculation growth and harvesting in a new easy-to-use disposable cell culture system. *Bio Techniques*. 2006; 4: 1-5.
- 20- Vyas R, Cino J. High-yield single-use cell culture systems. *Gent eng news*. 2005; 25: 1-4.
- 21- Merten OW. Safety for vaccines. *Cytotechnol*. 2000; 34: 181-3.
- 22- Merten OW, Kierulff JV, Castignolles N, Perrin P. Evaluation of the new serum-free medium (MDSS2) for the production of different biological: use of various cell lines. *Cytotechnol*. 1994; 14: 47-59.
- 23- Merten OW, Kallel H, Manuguerra JC, et al. The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses. *Cytotechnol*. 1999; 30: 191-201.
- 24- Frazzati G, Neuza M. Higher production of rabies virus in serum-free medium cell cultures on microcarriers. *J Biotechnol*. 2001; 92: 67-72.
- 25- Frazati-Gallina NM, Mourao-fuches RM, Paoli RL, et al. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine*. 2004; 23: 511-7.
- 26- Trabelsi K, Rourou S, Loukil H, Majoul S, Kallel H. Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor. *J Biotechnol*. 2006; 121:261-71.

- 27- World Health Organization. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biological. In: *WHO Technical Report Series*, Geneva: 1998; vol. 878: 20-53.
- 28- Invitrogen. Adaptation of cell cultures to a serum-free medium. Available from: [http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf.Par.2474.File.dat/Adaptation\\_CC\\_SFM\\_Y062810\\_AdatptionOfCell.pdf](http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf.Par.2474.File.dat/Adaptation_CC_SFM_Y062810_AdatptionOfCell.pdf)
- 29- Rourou S, Ark A, Velden T, Kallel H. A microcarrier cell culture process for propagating rabies virus in Vero cells grown in a stirred bioreactor under fully animal component free conditions. *Vaccine*. 2007; 25: 3879-89.
- 30- Trabelsi K, Rourou S, Loukil H, Majoul S, Kallel H. Comparison of virus culture modes for the production of rabies virus by Vero cells grown on microcarriers in a 2-1 bioreactor. *Enzyme Microb Biotechnol*. 2005; 36: 514-9.
- 31- Wilbur LA, Aubert MFA. The NIH test for potency. In: WHO Laboratory techniques in rabies. Geneva, Switzerland: 1996; 360-8.
- 32- Swiech K, Silva G, Zangirolami T, Lemma M, Araujo H, Suazo C. Evaluation kinetic and physiological features of rCHO-K1 cells cultured on microcarriers for production of a recombinant metalloprotease/ disintegrin. *Biotechnol*. 2007; 10: 200-10.
- 33- Wentz D, Schiiger K. Influence of lactate, ammonia and osmotic stress on adherent and suspension BHK cells. *Enzyme Microb Technol*. 1992; 14: 68-75.
- 34- Genari C.S, Gomes L, Wada M. Alterations in the growth and adhesion pattern of Vero cells induced by nutritional stress conditions. *Cell biology international*. 1998; 22: 285-94.
- 35- Quesney S, Marvel J, Marc A, Gerdil C, Meignier B. Characterization of Vero cell growth and death in bioreactor with serum-containing and serum-free media. *Cytotechnol*. 2001; 35: 115-25.
- 36- Rourou S, Ark A, Majoul S, Trabelsi K, Velden T, Kallel H. A novel animal-component-free medium for rabies virus production in Vero cells grown on Cytodex 1 microcarriers in a stirred bioreactor. *Applied Microbiol Biotechnol*. 2009; 85: 53-63.
- 37- Mendonca RZ, Periera CA. High density Vero cell culture on microcarriers in a cell bioreactor. *Bioprocess Eng*. 1995; 12: 279-82.
- 38- Yokomizo AY, Antoniazzi MM, Galdino PL, Azambuja N, Jorge SA, Pereira CA. Rabies virus production in high Vero cell density cultures on macroporous microcarriers. *Biotechnol Bioeng*. 2004; 85: 506-15.
- 39- Namdev PK, Lio P. Assessing a disposable bioreactor for attachment-dependent cell cultures. *Bio Pharm*. 2000; 13: 44-51.
- 40- Gorfien SF, Paul W, Judd D, Tescione L, Jayme DW. Optimized nutrient additives for fed-batch cultures. *Bio Pharm International*. 2003; 16: 34-8.
- 41- Gumusderelioglu M, Aslankaraoglu E, Gurhan S. Rabies virus production in non-woven polyester fabric (NWPF) packed-bed reactors. *Biotechnol Applied Biochemistry*. 2001; 33: 167-72.
- 42- Smith J, Yager P, Baer G. A rapid tissue culture test for determining rabies virus neutralizing antibody. *Monogr Ser World Heath Organ*. 1973; 23: 354-7.

## ***Comparison of Four Different Types of Carriers for the Growth of Vero Cells and Propagating Rabies Virus for Production of Human Rabies Vaccine***

Hassanzadeh SM<sup>1</sup>, Fayaz A<sup>2</sup>, Zavareh A<sup>3</sup>, Khanahmad H<sup>4</sup>, Ramezani A<sup>5</sup>

<sup>1</sup>QC Dept. of Production of Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

<sup>2</sup>WHO-Collaborating Centre for Reference and Research on Rabies, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Viral Vaccines Unit, Production & Research Complex of Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

<sup>4</sup>R&D Unit, Production & Research Complex of Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

<sup>5</sup>Dept. of Biotechnology, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

***Corresponding Author:*** Fayaz A, WHO-Collaborating Centre for Reference and Research on Rabies, Pasteur

Institute of Iran, Tehran, Iran

*E-mail:* Fayaz@pasteur.ac.ir

**Received:** 28 Feb 2011      **Accepted:** 13 Oct 2011

***Background and Objectives:*** In this study, capability of Vero cells for growth on FibraCel disks were compared on 3 kinds of microcarriers including Cytodex-1, Cutodex-3, and Sigma Solohill in 500 ml Spinner flasks in both serum contained medium (DMEM+10% Fetal Calf Serum, FCS) and serum-free medium (VP-SFM). The propagation of fixed PV (Pasteur Virus) strain of rabies in Vero cells, for production of rabies vaccine, grown under the above conditions were studied and compared.

***Materials and Methods:*** Stepwise perfusion mode in growth phase and batch mode were applied in the virus production step by the use of M199 +0.2% Bovine Serum Albumin (BSA) and VP-SFM as serum containing and serum-free media, respectively. The available surface area provided by the carriers, and primary cell density in the experiments were assumed the same (about 12,000 cm<sup>2</sup> and 12,500 cells/cm<sup>2</sup>, respectively).

***Results:*** The highest cell density was achieved on FibraCel disks in DMEM equal to  $7.1 \pm 0.7 \times 10^6$  cells/ml on day 9, while the lowest cell density was obtained on Cytodex-3 in VP-SFM equal to  $2.91 \pm 0.2 \times 10^6$  cells/ml. The highest virus titer ( $55.18 \pm 4.4 \times 10^6$  Fluorescent Focus Unit, FFU/ml) was gained in VP-SFM containing FibraCel disks, and the lowest titer ( $3.66 \pm 0.4 \times 10^6$  FFU/ml) was resulted on Cytodex-3 in M199.

***Conclusion:*** In these experiments, FibraCel disks supported the growth of Vero cells better than the microcarriers, and the use of DMEM for propagation of Vero cells and VP-SFM for proliferation of rabies virus showed better results. The experimental vaccine prepared by collected virus from VP-SFM has an acceptable potency of 2.75 IU. Based on these results and to the relative ease for making FibraCel disks, we recommend the use of this carrier for propagation of Vero cells and production of rabies virus.

***Keywords:*** Microcarrier, Cytodex, FibraCel disk, Vero, Rabies