

مطالعه شرایط 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 شرایط 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 لbfورس (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، نشان دهنده 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 "Lab-fors" 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, Bioreactor, Schizont of *Theileria annulata*

مقدمه

حیوانات تحت آزمایش صورت گرفت که منجر به تلقیح وسیع واکسن در سطح گسترده ای گردید (۴). امروزه تولید واکسن تیلریوز گاوی در ایران با استفاده از سویه S15 تیره سلولی آلوده به شیزونت تیلریا آنولاتا صورت می گیرد (۶). روش تولید براساس کشت در فلاسک های شیشه ای قابل استریل و به تعداد زیاد انجام می شود که انجام این فرآیند مستلزم مهارت پرسنل و خطر دستکاری های فراوان است که بطور تقریبی بیش از ۶۰۰ بار در هر نوبت تولید درب فلاسک های کشت باز و بسته می شود که هر چند این روند در شرایط استریل و در اتاق تمیز انجام می گیرد لیکن خطر آلودگی همیشه از تهدیدهای این روش است، از طرفی نیاز به امکانات لازم جهت شستشو و استریل نمودن فلاسک های کشت سلول از دیگر مشکلات این روش می باشد. با اینحال از آنجائی که بهترین روش مبارزه و کنترل بیماری براساس یافته های محققین در این زمینه و همچنین توصیه سازمان OIE استفاده از واکسن زنده کشت نسجی در مناطق اندمیک می باشد (۲ و ۱۰)، بنابر این لازم است ضمن تداوم تولید واکسن به روش فعلی، شرایط تولید بهینه و تکنولوژی ساخت از سیستم فلاسک به روش بیوراکتور تغییر پیدا کند. در این ارتباط تنها بررسی علمی منتشر شده مربوط به یک گزارش مختصر است که در حجم دو و نیم لیتر کشت تیلریا انجام شده ولی جزئیاتی اشاره نشده است (۷). طراحی

تیلریوز گرمسیری از بیماری های انگلی بومی حاد و گاه کشنده ای در ایران است که حاصل عفونت سلول های منوسیت ماکروفاژی و لمفوسیت های B به تک یاخته تیلریا آنولاتا می باشد (۵ و ۹). تیلریوز گرمسیری در نواحی وسیعی از مناطق حاره و نیمه حاره ای نیمکره شمالی شامل مناطقی از جنوب اروپا، شمال آفریقا، خاورمیانه، هند 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 میسر می باشد. با گذشت بیش از یک قرن از کشف تک یاخته تیلریا، تحقیقات گسترده ای در استفاده از روش های مختلف ایمن سازی بر علیه تیلریوز گاوی بمنظور کنترل و پیشگیری انجام شده است. روش های قدیمی شامل تلقیح خون آلوده به تیلریا بود ولی سپس به روش آلوده سازی و درمان داروئی همزمان تغییر یافت و نهایتاً به تولید واکسن های کشت سلولی منجر شد. تاریخچه تولید واکسن تیلریوز گاوی در ایران به سال ۱۳۵۳ بر می گردد بطوریکه تحقیقات اولیه بر روی جدایه های بدست آمده از حیوانات بیمار و تهیه رده های سلولی و بررسی های بیولوژی، پاتولوژی و همچنین ایمونولوژی

سیستم فلاسک و بیوراکتور مورد استفاده قرار گرفت (۴ و ۱۲).
ظروف مورد استفاده جهت کشت: در روش کشت ثابت در ظروف شیشه‌ای پیرکس بنام بطری های "رو" (Roux Bottle) و در سیستم بیوراکتور از مخازن شیشه‌ای ۲ تا ۵ لیتری بنام "Wolf" با امکان هوادهی و نمونه برداری از کشت سلول انجام گرفت (شکل ۱). در مراحل بعد از بیوراکتورهای هوازی مجهز 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).

کشت سلول: سلولهای حاوی شیزونت تیلریا آنولاتا در محیط کشت Stoker حاوی ۱۰ درصد سرم گاو غیرفعال شده به همراه آنتی بیوتیک (پنی سیلین ۱۰۰ IU/ml و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین) در فلاسک های مخصوص کشت سلول (بیست و پنج سانتیمتر مربع) در شرایط هوازی به همراه ۵٪ CO₂ در کشت داده شدند. بررسی رشد بطور روزانه و با مشاهده فلاسک ها بر روی میکروسکپ با لنز وارونه (Inverted) انجام گرفت. رشد توده ای سلول ها و کاهش pH که با تغییر رنگ محیط مشخص می شد تعیین کننده زمان انجام پاساژ سلولی بود که با افزودن محیط کشت استوکر حاوی ۱۰ درصد سرم به سلول های رشد کرده و تقسیم در فلاسک های کشت سلولی و در شرایط استریل انجام می گرفت (۱۲).

پاساژ سلولی: منظور از پاساژ سلول یک دوره رشد کامل سلول ها در محیط کشت بوده تا جایی که سلول ها نهایت رشد در محیط را انجام داده و با تغییر در رنگ محیط و نمونه برداری و شمارش سلول مشخص می گردد معمولاً در این زمان حدود ۴ تقسیم سلولی انجام گرفته است که در نوبت بعد سلول های رشد کرده با اضافه کردن محیط کشت تازه در شرایط استریل رقیق شده و به درون فلاسک های تازه تقسیم می شوند (۱۲).

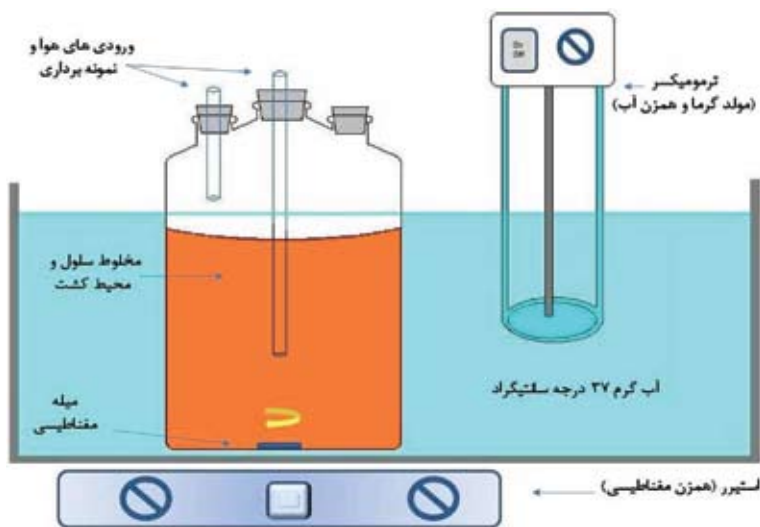
Bioreactor اصولاً فرآیندی پیچیده و مهندسی است که با در نظر گرفتن اصول مهندسی بیوشیمیایی انجام می شود. عوامل موثر در طراحی bi-reactor به فاکتورهائی مانند گاز (اکسیژن، نیتروژن، دی اکسید کربن) همچنین میزان جریان مایع (محیط کشت) و حرکت آن داخل راکتور بستگی دارد ضمناً دما، pH و درصد اکسیژن محلول و سرعت هم زدن نیز لازم است بدقت کنترل و نظارت شود. اکثر بیوراکتورهای صنعتی دارای مخزن، حسگرها و سیستم های کنترلی هستند که با هم متصل و مرتبط هستند. امروزه اکثر تولید کنندگان فرآورده های دارویی، دستورالعمل های خود را بر اساس روش fed-batch تنظیم می 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 بیوراکتور هوازی بجای بهره گیری از روش متداول کشت در بطری های Roux بود. برای این منظور شرایط 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 ثابت و متحرک انجام گردید. محصول بدست آمده در سیستم بیوراکتور بشکل فرآورده نهایی واکسن تیلریوز گاوی تهیه و برای ارزیابی های بعدی درون تنی نگهداری شد. نظر به نتایج بدست آمده در روش کشت بیوراکتور و ارزیابی های کیفی برون تنی و درون تنی روش پیشنهادی حاضر می تواند بعنوان شیوه ای مناسب در تولید واکسن در شرایط GMP مطرح گردد.

مواد و روش کار

رده سلولی حاوی شیزونت تخفیف حدت یافته تیلریا آنولاتا:

رده سلولی سویه واکسن تیلریوز گاوی ایران (S15) جهت کشت در دو



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.

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 کشت و پاساژ در بیوراکتور ۱۳ لیتری Labfors (ساخت سوئیس): شرایط کشت مشابه سیستم ولف بود ولی بدلیل هوادهی، اختلاط و جهت جلوگیری از تولید کف از مواد ضد کف در ابتدای هر پاساژ استفاده شد. کلیه انتقالات محیط کشت بدرون بیوراکتور شامل محیط کشت و سلول از طریق پمپ پریستالتیک انجام گرفت (شکل ۲-الف). کنترل مقادیر اکسیژن محلول، دور همزن، دما و pH در بیوراکتور، بوسیله حسگرهای تعبیه شده در دستگاه انجام پذیرفت.

کشت انبوه سلول های حاوی شیزونت تیلریا آنولاتا: کشت انبوه در حجم ۲۰ لیتر در ظروف ساده پیرکس "بن بن" و همچنین ظرف مخصوص کشت با سیستم مخلوط کننده دیجیتال بنام Biomixer انجام شد این ظرف بمنظور کشت میکروارگانیسم های هوازی توسط شرکت Thomas Scientific ارائه شده است (شکل ۲-ب).

مراحل کنسانتره سازی، فرمولاسیون و بسته بندی: این مراحل در هر 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 شده: 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 بیضری مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۲).

روش محاسبه و مقایسه داده ها: اندازه گیری ها به تعداد سه بار و تعیین میانگین یافته های مربوط به هر کدام از روش های تولید در

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

اختلاط سوسپانسیون سلولی (Agitation): این مرحله از کشت با استفاده از میله های مغناطیسی یا پره های تعبیه شده در بیوراکتور صورت گرفت.

استفاده از مواد ضد کف (Antifoam) و بافرهای تنظیم کننده pH: در مراحل مختلف رشد، ضرورت استفاده از Antifoam نظیر سیلیکون ها، مواد محافظ سلولی مانند Carboxy methyl cellulose (CMC) و استفاده از تنظیم کننده های pH (تغییر در شدت اسیدیته و قلیائی) نظیر بیکربنات سدیم در طول رشد سلول مورد توجه قرار گرفت.

بررسی میزان رشد و مطالعه متغیرهای موثر در رشد سلول ها: تغییر عوامل موثر در رشد جهت بهینه سازی رشد و اخذ بهترین نتیجه مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت. این متغیرها شامل میزان بذر اولیه سلولی، میزان سرم موجود در محیط کشت، نسبت محیط کشت به حجم بیوراکتور، میزان pH اولیه و pH مناسب در طول رشد سلول ها، میزان هوادهی، شدت اختلاط (Agitation) مورد نظر بودند.

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

کشت در ظروف ساده ولف: در ابتدا بذر مناسب از سلول های رشد یافته، جهت کشت در بطری های ساده کشت سلولی بنام ولف با محیط استوکر و با هوادهی و عمل همزدن بکار برده شد. گرمای لازم جهت انکوباسیون سلول ها توسط منبع مولد گرما با نام "ترمومیکسر" فراهم



شکل ۲- 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.

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 بیومیکسر با موفقیت انجام شد. براساس نتایج حاصله، جمعیت سلولی بیش از دو برابر آنچه در روش معمول حاصل می گردید، در این شیوه تولید شد، مشروط بر آنکه میزان کافی بذر سلولی وجود داشته باشد تا جمعیت اولیه به ۳۰۰ تا ۳۵۰ هزار سلول در هر میلی لیتر برسد.

نتایج محاسبات آماری: نمونه برداری های انجام شده از کشت سلول های رده واکسن در سیستم های ساده فلاسک و بیوراکتور در نوبت های متعدد بروش استریل انجام گرفت. میانگین شمارش سلولی در روزهای مختلف و با توجه به انحراف معیار موجود محاسبه و در شکل سه ترسیم شده است. ضمن اینکه محاسبات آماری انجام شده با استفاده از آزمون T-test نشان داد که اختلاف معنی دار میان دو روش کشت فلاسک و بیوراکتور وجود دارد ($p < 0/05$).

بحث

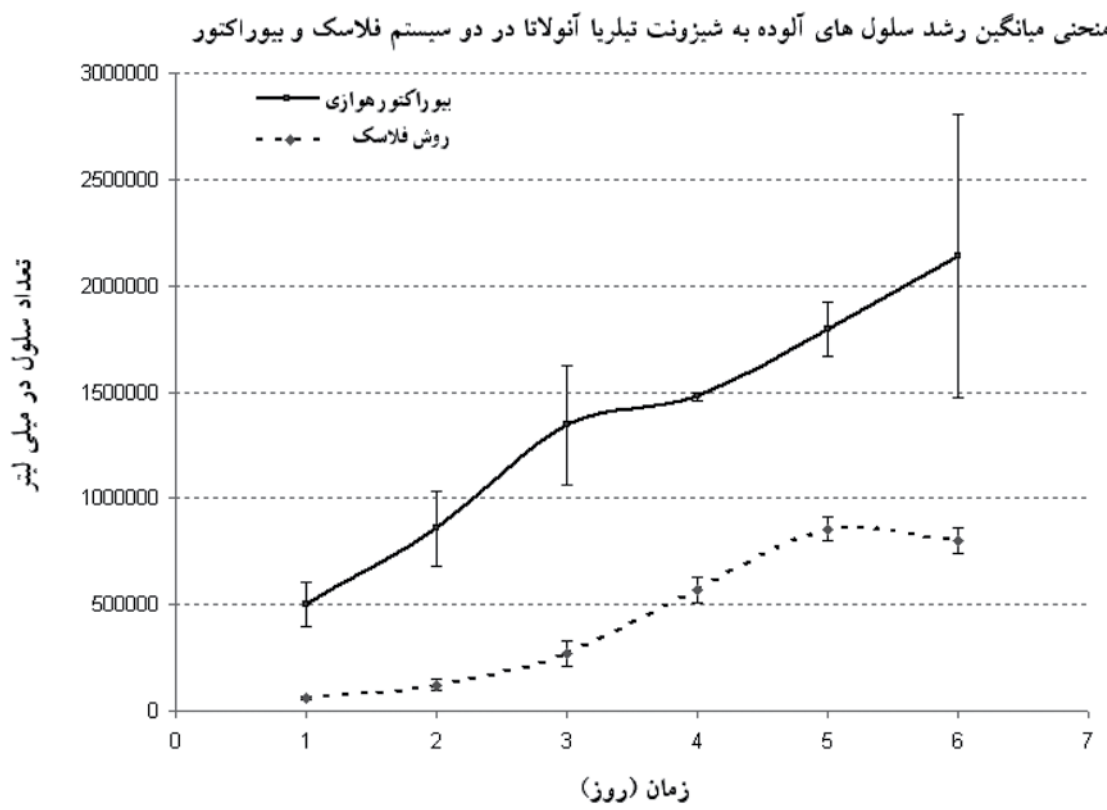
واکسن زنده تخفیف حدت یافته تیلریوز گاوی، فرآورده ای است که با ایجاد ایمنی متقاطع بین اکثر سویه های تیلریا آنولاتا، ایمنی مطلوبی در منطقه تحت پوشش واکسیناسیون ایجاد می کند و از این رو

ظروف مختلف انجام گرفت. نمودار تغییرات مربوط به هر روش براساس مقادیر 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 انجام شد و وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد تعیین گردید ($p < 0/05$).

نتایج

نتایج کشت در ظروف ساده ولف و بیوراکتور ۱۳ لیتری: در این روش کشت، متوسط حداکثر رشد به بیش از ۲/۴۹ میلیون در میلی لیتر رسید که با توجه به میانگین معمول رشد در سیستم ثابت فلاسک که حدود ۰/۸ میلیون در هر میلی لیتر است رشدی بیش از ۲۵۰ درصد مشاهده شد (شکل ۳).

کشت در بیوراکتورهای مجهز به کنترل کننده های الکترونیکی با حجم ۱۳ لیتر تحت کنترل و با ورودی و خروجی های مختلف نمونه برداری، اندازه گیری حرارت، pH، اکسیژن محلول و همزن پره ای انجام شد. متوسط حداکثر رشد در این روش به بیش از ۱/۷۹ میلیون در میلی لیتر رسید که رشدی تقریباً ۲۰۰ درصد را نسبت به روش معمول کشت در سیستم فلاسک نشان داد.



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.

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 بعلاوه قابلیت استریل شدن مجموعه بیومیکسر و سبک بودن وزن مخزن کار با آن راحت تر از بن می باشد.

در مجموع، استفاده از سیستم آئروبییک 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 می باشد. 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 هوای کنترل آلودگی است بطوریکه با محدود کردن شرایط 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 هوای 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 بیضری را دارا می باشد. واکسن تیلریوز گاوی در سیستم بیوراکتور هوای پس از بهینه سازی شرایط تولید برای ارزیابی های اثربخشی روی حیوان حساس مورد آزمایش قرار گرفت و آزمایشات لازم در شرایط برون تنی و درون تنی نشان از کارایی مثبت فرآورده ساخته شده در شرایط 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 شرایط برون تنی (*in vitro*) و درون تنی (*in vivo*) می توان تولید در سیستم بیوراکتور را جایگزینی مناسب و مطلوب در تولید واکسن تیلریوز گاوی پیشنهاد نمود.

تشکر و قدرردانی

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 مودنی و همچنین کارشناسان محترم

فرآورده ای بسیار موثر محسوب می شود. امروزه تنها واکسن موجود در بازار که مورد تأیید 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 شرایط تولید بهینه و تکنولوژی ساخت از روش فلاسک به بیوراکتور تغییر و ارتقاء پیدا کند.

هر چند استفاده از فرماتورهای 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 عبارتی 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 شرایط استریل انجام شد.

در مرحله نخست بهره گیری از ظروف ولف امکان کشت در شرایط 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 دوره های 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

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/CJFDTO-TAL-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.

آقایان اصغر افشاری و فاسمی 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., EsmailNia, 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

