DOI: 10.22092/vj.2019.124320.1529
شماره ۱۲۵ زمستان ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی آلودگی احتمالی سوبستراهای سلولی مورد استفاده در تولید فرآورده های بیولوژیک در موسسه رازی به نانوباکتری‌ها به روش مولکولی

• **ناهید اسدی**
گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
• **محسن لطفی (نویسنده مسئول)**
دانشیار مدیریت کنترل کیفی فرآورده های بیولوژیک موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **ناصر هرزندی**
استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۰۷-۰۹-۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۰۷-۱۱-۱۳۹۷
Email: M.Lotfi@rvsri.ac.ir

چکیده

تولید واکسن‌های ویروسی و فرآورده‌های دارویی بر پایه سلولی، یک فرایند پیچیده است که در آن از مواد بیولوژیک متفاوتی (انواع سوبسترای سلولی مثل: تخم مرغ جنین‌دار، سلول‌های پرایمری و لاین، مواد خام و افزودنی‌های محیط کشت با منشاء حیوانی و ویروس بذر) استفاده می‌گردد، که مراحل فوق را بالقوه نسبت به آلودگی با عوامل ناخواسته آسیب‌پذیر می‌کند. *Nanobacteria* همچون سایر عوامل ناخواسته می‌تواند از طریق مواد اولیه با منشاء دامی سبب آلودگی این قبیل فرآورده‌ها شود. در این تحقیق با راه‌اندازی آزمایش PCR جهت ردیابی اختصاصی *Nanobacteria* نسبت به ارزیابی میزان آلودگی احتمالی سلول‌های موجود بخصوص سلول‌های لاین و دیپلوئید مورد استفاده در تولید واکسن در موسسه رازی اقدام بعمل آمد. بدین منظور سلول‌های مورد مصرف در بخش‌های تحقیق، تولید و کنترل کیفی فراورده‌های بیولوژیک جمع‌آوری و پس از استخراج DNA، آزمایش PCR جهت تکثیر ناحیه 16S rRNA *Nanobacteria* احتمالی، بر روی آن‌ها انجام شد. از باکتری *Bartonella henselae* بعنوان کنترل مثبت استفاده شد. در بررسی محصول PCR پس از الکتروفورز همان‌طور که انتظار می‌رفت، نمونه کنترل مثبت در واکنش PCR قطعه ۵۵۸ جفت بازی را تکثیر کرد که این امر بیانگر صحت انجام واکنش‌ها بود. در ارزیابی آلودگی احتمالی سلول‌های فوق، کلیه سلول‌ها عاری از آلودگی به *Nanobacteria* بودند. بدلیل عدم اطلاعات از میزان شیوع *Nanobacteria* در جمعیت دامی، ارزیابی مقدار ریسک مقدور نیست. لذا توصیه می‌شود مطالعات جامعی در این خصوص صورت پذیرد.

کلمات کلیدی: *Nanobacterium sanguineum*، کشت سلول، واکسن، عوامل ناخواسته، PCR

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Researches & Biological Products No 125 pp: 29-37

Investigation of Nanobacteria contamination in cell substrate used in biological productions in Razi Institute by molecular method

By: Asadi, N., Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. Lotfi, M., (Corresponding Author) Quality Control Dep. Of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Harzandi, N., Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Received: 2018-11-28 Accepted: 2019-01-27

Email: M.Lotfi@rvsri.ac.ir

Production of viral vaccines and also drugs products which are derive from cells produced in various biological materials, like cell substrates eg: fertile eggs, primary cells, cell lines, raw materials and additives used in culture media which have animal origin and seed virus which is used for culture have a complicated process. The above processes are naturally vulnerable for contamination to adventitious agents. The *Nanobacteria* like other adventitious agents can cause contamination through primary materials with animal origin for such a product. The aim of this study was to design a program for PCR which is specific for detection of probable presence of *Nanobacteria* in cells, especially in cell lines and diploids which is used in vaccine production in Razi institute. For this purpose the cells which are used in following departments, research, production and Quality control for biological products were collected and DNA was extracted for PCR expression on 16S rRNA area from Nanobacteria. *Bartonella henselae* was used as a positive control. As it was expected the results of PCR products after electrophoresis were positive for above organism and at the area of 558 bp replicated which it confirms the correctness of our experiment. The cells from all departments were negative for *Nanobacteria*, however for not having enough information for spread and risk evaluation of *Nanobacteria* in cattle population there are a great need for further investigation.

Keywords: *Nanobacterium sanguineum*, Cell culture, Vaccine, Adventitious agents, PCR

مقدمه

Nanobacteria و به عبارت دقیق‌تر *Nanobacterium sanguineum* که اشاره به سایز کوچک و زیستگاه خونی آن‌ها دارد (۴)، کوچک‌ترین باکتری آزادزی است که تاکنون علم به وجود آن پی برده است. اولین بار این باکتری در سال ۱۹۸۸ توسط کاجاندر (kajander) و چیفچی اغلو (Çiftçiolu) شناسایی شد. اندازه این باکتری بین ۲۰ تا ۲۰۰ nm است (۱۲). فعالیت متابولیکی آن‌ها ۱۰۰۰۰ برابر کندتر از باکتری *Escherichia coli* بوده (۱۹) و یک باکتری کوکسی گرم منفی، مقاوم به اسید می‌باشد. ولی در شرایط مختلف رشد متحمل تغییر شکل می‌شود. کپسول ضخیمی از جنس هیدروکسی آپاتیت دارد که باعث عدم رنگ‌پذیری و مقاومت در برابر حرارت، اشعه گاما و آنتی بیوتیک‌ها می‌شود. زمان دوتائی شدن این باکتری‌ها در محیط کشت سلولی ۵-۱ روز بوده که می‌توانند بصورت مجزا و یا به شکل بیوفیلم دیده شوند. در ۴۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد در۱۰-۵٪ دی اکسید کربن قادر به رشد می باشند، این میکروارگانیسم را نمی‌توان بوسیله روش‌های مرسوم استریلیتی از بین برد (۱، ۳، ۴، ۷، ۱۱، ۱۹). همچنین این میکروارگانیسم‌ها را نمی‌توان با روش‌های کشت استاندارد رشد داده و یا با روش‌های استاندارد مورد شناسایی قرار داد (۵، ۱۱، ۱۴). این باکتری تنها پروکاریوتی است که از خود فسیل بجا می‌گذارد. از همان ابتدا بین زنده یا غیر زنده بودن *Nanobacteria* بحث‌های زیادی مطرح بوده و هست. عده‌ای اعتقاد دارند که این باکتری‌ها در حقیقت نانو ذرات (NPs) معدنی-آلی غیر زنده هستند که در مایعات بدن بصورت خود بخودی حضور دارند (۱۳). در مقابل تعداد زیادی از محققین آنرا موجود زنده می‌دانند و عده‌ای نیز *Nanobacteria* را مرز بین موجودات زنده و غیر زنده می‌دانند (۹). این باکتری قادر است در بسیاری از بافت‌ها تکثیر نموده و باعث ایجاد بیماری شود. کپسول آهکی که به عنوان لیپوپلی ساکارید (LPS) از *Nanobacteria* ترشح می‌شود، نوعی اندوتوکسین قوی بوده که می‌تواند عامل التهاب و تورم باشد و بدن انسان واکنش‌های شدید التهابی را در پاسخ به این بیوفیلم نشان می‌دهد، به طوری که سبب التهاب مزمن همراه با تورم و آهکی شدن بافت می‌شود. به همین علت احتمالاً اکثر آهکی شدن‌های پاتولوژیک بافت‌ها و اعضای گوناگون به دلیل عفونت با *Nanobacteria* بوجود می‌آید (۱). براساس آنالیزهای ۱۶S rRNA و تعیین توالی ژنومی این باکتری، آنرا در زیر گروه آلفا – دو proteobacteria قرار می‌دهند که این گروه شامل باکتری‌هایی می‌شود که توانائی نفوذ به سلول‌های یوکاریوتی را دارند، این باکتری‌ها نزدیک ترین ارتباط را با *Brucella sp.* و *Bartonella sp.* دارند (۱۱،۴). این باکتری از جهات

www.SID.ir

Archive of SID

مختلفی مورد توجه محققین قرار گرفته است مانند اهمیت اقتصادی بیماری، خطرات انتقال بیماری به انسان و جاذبه علمی آن در مطالعات بیولوژیک(چرا که *Nanobacteria* می‌توانند حتی در غیاب سلول‌های پستانداران نیز رشد کرده و به بقای خود ادامه دهند). *Nanobacteria* از انواع بیمارانی که دارای کلسیفیکاسیون‌های پاتولوژیک بودند جدا شده که می‌توان به مواردی از قبیل: پالپ دندانی، غدد بزاقی، عروق خونی، دریچه‌های قلبی، پلاک‌های دندانی کلسیفیه، سنگ‌های دندانی، بیماری‌های پریودنتال، سنگ‌های کلیوی، سنگ‌های صفراوی، کلسیفیکاسیون جفت، بافت مثانه، پلاک‌های آترواسکلروزیس، سلول‌های توموری بدخیم تخمدان، میکرولیتیازیس بیضه و بسیاری از بیماری‌های دیگر اشاره کرد. قابل توجه است که توسط یک تیم ناسا از شهاب سنگ آلن هیلز (ALH84001) که به مریخ نسبت داده می‌شود، نیز این باکتری جدا گردیده است. همچنین در ایران مواردی از تشخیص این باکتری گزارش شده، از جمله در چشمه‌های آبگرم اردبیل، سنگ‌های کلیوی و صفراوی (۱، ۴، ۷، ۸، ۱۱، ۱۲، ۱۴). باکتری از راه‌های متعددی می‌تواند به انسان و حیوانات منتقل گردد. در این میان واکسن‌ها و فراورده‌های بیولوژیکی که بر پایه کشت سلول تهیه می‌شوند، نیز می‌توانند در انتقال این عوامل موثر باشند. برای شناسایی عامل می‌توان از میکروسکوپ الکترونی (TEM)، کشت ویژه *Nanobacteria*، روش‌های ایمونولوژیکی با آنتی‌بادی‌های مونوکلنال اختصاصی *Nanobacteria* مانند الایزا، ایمونوهیستوشیمی، ایمونوفلورسانس و روش‌های مولکولی و تعیین توالی 16S rRNA، استفاده نمود. بهترین روش برای تشخیص، استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) می‌باشد (۴، ۱۴). از آنجایی که با روش‌های معمول بررسی استریلیتی فرآورده‌ها فقط شناسایی باکتری‌های معمول و قارچها امکان پذیر می‌باشند و عواملی مانند *Nanobacteria* بدلیل کوچکی اندازه و تفاوت ساختاری در روش‌های مذکور تشخیص داده نمی‌شوند، باید از روش‌های اختصاصی دیگری استفاده نمود. لذا لازم است برای شناسایی *Nanobacteria* که یک باکتری غیر معمول می‌باشد نیز تحقیقات و بررسی‌هایی جهت ابداع روش‌های تشخیص و راه‌های آلودگی موجودات زنده به این باکتری صورت گیرد (۴). این مطالعه با فرض عاری بودن سلول‌های مورد مصرف در تولید فرآورده‌های بیولوژیک در موسسه رازی از آلودگی به *Nanobacteria*، با آزمایش مولکولی آلودگی احتمالی سلول‌های مورد استفاده در تولید واکسن‌ها به این باکتری بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

سلول‌های دریافت شده از بخش‌های تولیدی: از بخش تولید واکسن‌های ویروسی انسان: CEF, Hela, Vero, RK13، از بخش تولید واکسن‌های ویروسی دام: LK, RBK, Vero-C, Vero-A، از بخش تولید واکسن تب برفکی: BA(IBRS2)، BHK21 از بخش تولید واکسن تک یاخته: TA.W, TA.M

سلول‌های دریافت شده از مدیریت کنترل کیفی

FLK, LK, RBK, F9, BA(IBRS2), BHK-21, Vero-c, RK13, MRC5, CHO, MDCK, MDBK, MA104, Vero-B, H1H9, HmLu, MARC145, Vero-WHO, Vero-H, Hela, BT, Vero-siat 7e

روش کار

سلول‌ها یا بصورت فریز (در تانک ازت و ۷۰- درجه سلسیوس) و یا بصورت سلول‌های کاری کشت شده در فلاسک (Working cells) تهیه شدند، برای کار با سلول‌های فریز، کرایوتیوب‌های حاوی سلول‌ها به بشر محتوی آب ۳۷ درجه سلسیوس منتقل شده و ذوب می‌شدند و بمدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ rpm سانتریفیوژ (Eppendorf, Germany) میگردیدند. بعد از تخلیه مایع رویی رسوب سلولی با PBS شستشو داده شده و مثل قبل سانتریفیوژ شده پس از تخلیه PBS سلول‌ها آماده کار شدند. در سلول‌های کشت داده شده در فلاسک، چنانچه بصورت چسبیده بودند، ابتدا مایع‌رویی تخلیه و سلول‌ها تریپسینه (BD, USA) شده و با PBS به یک سوم حجم اولیه رسانده و مانند سلول‌های سوسپانسیون سانتریفوژ می‌گردیدند. بعد از تخلیه مایع‌رویی رسوب سلولی با PBS شستشو داده شده و مثل قبل سانتریفیوژ شده پس از تخلیه PBS سلول‌ها آماده کار شدند. بطور متوسط حدود یک میلیون سلول در بررسی مورد استفاده قرار می‌گرفت. مرحله بعدی استخراج DNA بود که مطابق پروتکل کیت (Cinagen, Iran) انجام گردیده و پس از بررسی کیفیت و غلظت آن‌ها با دستگاه نانودراپ (Biotek, USA)، تا زمان انجام واکنش در ۲۰- درجه سلسیوس فریز شدند. از ویال لیوفیلیزه باکتری *Bartonella henselae* (تهیه شده از دانشکده دامپزشکی تهران) در محیط

جدول ۱- پرایمر های واکنش PCR

نام پرایمر	توالی سکانس ۵′ ---- ۳′	طول قطعه (bp)	قطعه تکثیر شونده	شماره ثبت ژن	رفرنس
Nanobac2 F	GGA CTT AAC CCA ACA TCT CAC GAC	558	16S rRNA	X98419	(۳)
Nanobac2 R	GGC TAG CGT TGT TCT TAT TTA CT				

www.SID.ir

Archive of SID

RPMI 1640 (Sigma, USA) محتوی مکمل‌ها کشت شده و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به همراه ۵٪ Co۲ و رطوبت به مدت دو هفته انکوبه شد. پس از سانتریفیوژ ۵ ml از محلول حاوی باکتری‌ها و دور ریختن مایع رویی، استخراج DNA از باکتری‌های فوق مطابق پروتکل کیت استخراج DNA انجام گردید. پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق از جفت پرایمری یونیورسال (Bairon, Germany) که در مطالعات معتبر قبلی کارآیی آن اثبات شده بود، انتخاب و سنتز شد، که می توانست علاوه بر *Nanobacteria* باکتری *Bartonella henselae* را نیز شناسایی نمایند (جدول ۱) (۳). در نهایت جهت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای هر نمونه ۱۲/۵ µl از مستر میکس PCR (TAKARA, Japan) که حاوی Taq DNA polymerase و PCR Mgcl۲ buffer, dNTPs, می‌باشد، ۰/۵ µl از پرایمر F و ۰/۵ µl از پرایمر R، ۵ µl از DNA برای هر کدام و تا حجم ۲۵ ml برای هر میکروتیوپ آب مقطر اضافه شد. میکروتیوب‌ها به دستگاه گرادینت ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) منتقل شده و با برنامه سیکل حرارتی توصیه شده (جدول ۲) (۳)، جهت تکثیر یک قطعه ۵۵۸ جفت بازی از ژن ۱۶S rRNA اقدام گردید. سپس محصولات PCR در کنار نشانگر ۱۰۰ جفت بازی (Ladder, Frementas) الکتروفورز (Bio Rad System, USA) گردیدند.

نتایج

در مجموع بر روی تعداد ۳۳ لاین سلول پرکاربرد که از بخش‌های تولید واکسن‌ها و کنترل کیفی جمع‌آوری شده بود (شکل‌های ۲- الف و ب)، آزمایش PCR انجام پذیرفت و از باکتری *Bartonella henselae* بعنوان کنترل مثبت استفاده شد. همان‌طور که انتظار می‌رفت، در نمونه کنترل مثبت در واکنش PCR قطعه ۵۵۸ جفت بازی تکثیر شد. محصولات حاصل از آزمایش‌های PCR پس از الکتروفورز با ژل داک (UVP, USA) مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۳). در نهایت با توجه به شیوه این مطالعه، کلیه سلول‌های مورد مطالعه از نظر آلودگی به *Nanobacteria* منفی بودند.

بحث

آلودگی‌های تصادفی فرآورده‌های بیولوژیکی که تهیه در آن‌ها از مواد بیولوژیک با منشاء حیوانی استفاده می‌شود، با عوامل ناخواسته همواره تهدید جدی محسوب می‌گردد (۶). برای اجتناب از حضور عوامل ناخواسته در تولید فرآورده‌های بیولوژیک، سازمان بهداشت جهانی (WHO) به همراه سازمان‌های نظارتی و تنظیم مقررات بین‌المللی (NCLs و NRAs) و سایر گروه‌ها، مقررات و الزاماتی را تدوین کرده‌اند که رعایت آن‌ها ضریب بی‌ضرری فرآورده‌های تولیدی را افزایش می‌دهد (۱۸). با توجه به اینکه آلودگی‌های باکتریایی و قارچی را می‌توان با آزمایش‌های توصیه شده مناسب به راحتی تشخیص داد ولی تشخیص آلودگی به عواملی مانند *Nanobacteria* به دلیل نیاز به استفاده از روش‌های درون‌تنی (in vivo) و برون‌تنی (in vitro) متفاوت و بررسی‌های مولکولی بسیار سخت است (۶، ۱۵). *Nanobacteria* می‌تواند از طریق سلول‌های اولیه بدست آمده از حیوانات آلوده، مواد خام مشتق از انسان و حیوانات مانند سرم و تریپسین و یا آلودگی در حین پاساژهای متوالی سلول‌های لاین و دیپلوئید به دلیل خطاهای انسانی وارد محیط کشت سلول‌ها شده و فرآورده‌های تولیدی را آلوده کند. رعایت مقررات مربوطه تا حدود زیادی ضریب بی‌ضرری فرآورده‌های تولیدی را افزایش می‌دهد. علت اینکه این ضریب اطمینان به ۱۰۰٪ نمی‌رسد، پیچیدگی‌های موجود در تشخیص عوامل ناخواسته و حذف و غیر فعال کردن آن‌هاست. آلودگی با *Nanobacteria* می‌تواند سبب خسارت‌های فراوانی گردد و از آنجا که اغلب راه مؤثری برای حذف آن‌ها وجود ندارد و کشت‌های سلولی آلوده قابلیت تیمار شدن ندارند، بنابراین تنها راه مبارزه با آن‌ها جلوگیری از حضورشان در فرایندهای تولید است. بهترین رویکرد برای اطمینان از عدم وجود عامل ناخواسته‌ای مانند *Nanobacteria* در محصولات، آزمایش‌های اختصاصی است. این آزمایش‌ها شامل روش‌های ایمونولوژیکی برای ردیابی آنتی‌ژن‌های باکتری و روش مولکولی PCR برای ردیابی توالی‌های اختصاصی *Nanobacteria* است (۱۱). در سال های اخیر *Nanobacteria* مرکز بحث‌های مهم علمی بوده، به خاطر این ادعا که آنها نه تنها کوچک‌ترین میکروارگانیسم‌های زنده بر روی زمین هستند بلکه عوامل نوظهور پاتوژن در ارتباط با بیماری‌های متعدد انسان

جدول ۲- سیکل دمایی واکنش PCR

مرحله	واکنش	دما درجه سانتی‌گراد	زمان	تعداد سیکل
۱	دناتوره شدن	۹۴	۴ دقیقه	۱
۲	دناتوره شدن	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
	اتصال پرایمر	۵۰	۶۰ ثانیه	
	طویل شدن	۷۲	۹۰ ثانیه	
۳	طویل شدن	۷۲	۱۰ دقیقه	۱
۴	نگهداری	۴	-	-

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشند. این باکتری‌ها نمی‌توانند با روش‌های کشت استاندارد رشد کرده و یا با روش‌های استاندارد شناسایی شوند (۵، ۱۴). *Nanobacteria* علاوه بر سرم جنین گوساله (FBS) از خون و فرآورده‌های خونی تعدادی اسب و محصولات تجاری از فرآورده‌های خونی انسان (از اهداکنندگان خون فنلاندی) جدا شدند. بسیاری از کشت‌های سلولی با مشکل واکوئولیزه شدن سلول‌ها و فقر غذایی شدید مواجه شده‌اند، اما محققان قادر به تشخیص هیچ آلوده کننده شناخته شده‌ای با روش‌های استاندارد نبوده اند. *Nanobacteria* می‌توانند باعث واکوئله شدن و لیز سلولی گردند. در مطالعات انجام شده بر روی لاین‌های سلولی فیبروبلاست توسط چیفچی اغلو و کاجاندر (۴) سلول‌ها با دستجات *Nanobacteria* پوشیده شده و واکوئله می شوند (شکل ۴). *Nanobacteria* می‌توانند با آلوده کردن کشت بداخل تمام سلول‌های فیبروبلاست‌های پستانداران وارد شوند (شکل ۵). سیتوتوکسیسیتی در میان آلاینده‌های کشت سلول معمولا شدید نیست و سلول‌ها حتی در حضور مقادیر بالای آلوده‌کننده می‌توانند مورفولوژی خوبی داشته باشند. کشت‌ها غالبا با رقابت برای مواد غذایی ضروری تحت تاثیر قرار می‌گیرند. متابولیسم *Nanobacteria* نسبتا کند بوده و تغییرات ایجاد شده در ترکیب محیط کشت می‌تواند به میزان حداقل باشد. بنابراین مصرف ترکیبات محیط کشت مسئول سیتوتوکسیسیتی نبوده و احتمالا می‌تواند ناشی از محصولات تخریبی سمی *Nanobacteria* در لیزوزم باشد. برای ایجاد سیتوتوکسیسیتی وارد شدن باکتری به سلول‌ها ضروری می‌باشد. سلول‌های در حال مرگ همیشه حاوی *Nanobacteria* فراوان بلعیده شده بوده و شبیه به سلول‌های آپوپتوتیک (Apoptotic) می‌گردند. توانایی حمله به سلول‌های پستانداران یک عامل اساسی تعیین کننده حدت بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا و انگل‌های درون سلولیست. فرآیند ورود و همچنین بقای داخل سلولی وابسته به ویرولانس است. این ویژگی‌های مربوط به *Nanobacteria* نشان می‌دهد که این ارگانیسم‌های مشتق شده از خون احتمالا در شرایط درون تنی نیز می‌توانند بیماری‌زا باشند (۴). یکی از راه‌های آلودگی انسان وحیوانات به *Nanobacteria* استفاده از فرآورده‌های بیولوژیک بخصوص واکسن‌های آلوده‌ای است که در تهیه آن‌ها از سلول استفاده می‌گردد. در ارزیابی خطر آلودگی احتمالی فرآورده‌های فوق، سلول می‌تواند به طرق مختلف آلوده شده و نهایتا فرآورده را آلوده نماید. زیرا این باکتری‌ها می‌توانند از طریق مواد اولیه با منشاء دامی مانند سرم‌های گاوی، سلول‌های تهیه شده از حیوانات آلوده و بذرهای ویروسی آلوده، سبب آلودگی واکسن‌ها و سایر فرآورده‌های بیولوژیکی که بر پایه کشت سلول تهیه می‌گردند، شوند (شکل ۱). البته نباید آلودگی از طریق کاربر یا محیط اطرافی را نادیده گرفت که شانس آن‌ها برای آلودگی بسیار کمتر است. در ایران مطالعات کمی در خصوص میزان آلودگی جمعیت انسانی با *Nanobacteria* وجود دارد. کلاهی و همکاران فرضیه‌ای را مطرح کردند که بر اساس آن *Nanobacteria* توسط ابرها می‌توانند به تمام نقاط دنیا منتقل شوند و ایجاد ضایعات پاتولوژیک کلسیفیه‌ای دهانی شوند (۱۰). انصاری و همکاران راه‌های مختلف شناسایی *Nanobacteria* در سنگ‌های کلیوی را مورد بررسی قرار داده و بر نقش کلیدی آن‌ها در تشکیل سنگ‌های کلیوی تاکید نمودند (۲). حبیبی پور و همکاران *Nanobacteria* گرمادوست را از چشمه های آبگرم اردبیل جداسازی و تعیین ویژگی نمودند (۷). شجائیان و همکاران به شناسایی ترکیبات شیمیایی و باکتریایی سنگ‌های کلیوی جدا شده از بیماران ایرانی پرداختند (۱۷). امیر ایزدی و الهام مسلمی به بررسی نانوذرات کلسیفیه در سنگ کلیه، سنگ صفرا و پلاک‌های آترو اسکلروزیس پرداختند و از اکثر نمونه‌های مورد مطالعه *Nanobacteria* جدا نمودند (۸). سردار آبادی و همکاران مقاومت آنتی بیوتیکی *Nanobacteria* را بررسی کردند (۱۶). در دام هیچ گزارش مکتوبی مبنی بر فراوانی بیماری‌های ناشی از *Nanobacteria* در جمعیت دامی کشور بخصوص گاوها بدست نیامد. این موضوع ارزیابی خطر آلودگی سرم‌های مصرفی تولید داخل را غیر ممکن می‌کند. در آزمایشگاه‌های کشت سلول موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی گزارش‌هایی از مشاهده گاه به گاه اشکال غیر معمول در فلاسک‌های کشت‌های سلول دیده می‌شد. حضور این اشکال گاه با تخریب سلولی همراه بود. در این تحقیق سلول‌های پرکاربرد مورد استفاده در بخش‌های تولیدی و تحقیقاتی در موسسه رازی جمع‌آوری و از نظر آلودگی احتمالی به *Nanobacteria* به روش مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش PCR با موفقیت راه‌اندازی و بهینه‌سازی شد. اما هیچ مورد مثبتی از *Nanobacteria* در آزمایش فوق مشاهده نگردید.

موسسه رازی در ساخت فرآورده‌های بیولوژیک خود از سرم مصرفی تهیه شده از منابع داخلی و خارجی معتبر استفاده می‌نماید. البته منابع داخلی سهم بیشتری را به خود اختصاص می‌دهد. به این منظور سرم بعد از استحصال از خون فیلتر شده و به سازمان انرژی اتمی ارسال می‌گردد و در معرض ۲۵ کیلو گری (KGy) اشعه گاما قرار می‌گیرد. گزارش‌هایی مبنی بر اینکه اشعه گاما با دوز مذکور می‌تواند بسیاری از عوامل ناخواسته از جمله *Nanobacteria* را غیرفعال نماید، وجود دارد (۱). علیرغم انجام موارد فوق در هر بچ از سرم تولیدی، فرآورده‌های نهایی باز مطابق پروتکل‌ها از نظر بسیاری از عوامل ناخواسته مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. با توجه به اینکه این باکتری‌ها با آزمایش‌های استریلیتی معمول در فرآورده‌های بیولوژیک، قابل تشخیص نیستند ولی هنوز در دستورالعمل‌ها و لیست عوامل ناخواسته‌ای که فرآورده‌های بیولوژیک باید از آن عاری باشند وارد نگردیده است (۴، ۵، ۱۴).

از آنجایی که *Nanobacteria* نقش بالایی در بسیاری از بیماری‌های انسان و دام از جمله بیماری‌های کلیوی و قلبی عروقی دارند، جا دارد در لیست عوامل ناخواسته‌ای که توسط ارگان‌های بین‌المللی مثل سازمان بهداشت جهانی انسان و دام و سایر دستگاه‌های نظارتی تدوین می‌گردد، تجدید نظری صورت پذیرد. لازم به ذکر است که در رابطه با این باکتری جدید نیاز به مطالعات زیادی در ایران ضروری به نظر می‌رسد، مطالعه وسیع در فراوانی آلودگی دام‌ها، ارزیابی ریسک آلودگی کشت‌های سلولی، ارزیابی میزان فراوانی آلودگی مواد خام با منشاء حیوانی (عمدتا سرم) مورد مصرف در تولید فرآورده‌های بیولوژیک از جمله مواردی هستند که می‌توان به آنها اشاره کرد. همچنین توصیه می‌شود که روی محصول نهایی فرآورده‌های تولیدی نیز بررسی کاملی صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از جناب دکتر تقی زهرایی صالحی استاد محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران برای در اختیار قرار دادن باکتری *Bartonella henselae*، روسای بخش‌های تولید واکسن‌های ویروسی، جناب

www.SID.ir

Archive of SID

دکتر فرهاد اسماعیلی و همکاران در مدیریت کنترل کیفی فراورده‌های بیولوژیک موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی بویژه آقایان علی اسحقی و مرتضی کمال‌زاده نهایت تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1. Aho, K and E. O. Kajander. 2003. Pitfalls in Detection of Novel Nanoorganisms. *Journal of clinical microbology* 41(7): 0095-1137.

2. Ansari H., A. Akhavan Sepahi and M. Akhavan Sepahi. 2017. Different Approaches to Detect "*Nanobacteria*" in Patients with Kidney Stones: an Infectious Cause or a Subset of Life. *Endourology and stone disease journal* 14 (5):5001-5007.

3. Barr S. C., R. A. Linke, D. Janssen, C. L. Guard, M.C. Smith, C. S. Daugherty and J. M. Scarlett. 2003. Detection of biofilm formation and *Nanobacteria* under long-term cell culture conditions in serum samples of cattle, goats, cats, and dogs. *American journal of veterinary research* 64(2): 176-182.

4. Ciftcioglu, N and E. O. Kajander. 1998. Interaction of *Nanobacteria* with cultured mammalian cells. *Pathophysiology journal* 4(4):259-270.

5. Drancourt, M., V. Jacomo, H. Lepidi, E. Lechevallier, V. Grisoni, C. Coulange and E. Ragni. 2003. Attempted isolation of Nanobacterium sp. Microorganisms from upper urinary tract stones. *Journal of clinical microbiology* 41:368–372.

6. Furtak, V. A., A. Dabrazhynetskaya, D. V. Volokhov and V. Chizhikov. 2015. Use of tangential flow filtration for improving detection of viral adventitious agents in cell substrates. *Biologicals journal* 43(1):23-30.

7. Habibipour, R., G. R. Zarrini and S.H. Yarizadeh. 2017. Isolation and Characterization of Hyperthermophilic *Nanobacteria* from a Hot Spring in Ardabil, Iran. *Medical laboratory journal* 11(3):20-24.

8. Izadi, A and E. Moslemi. 2014. A Survey on the Presence of Calcifying Nanoparticles in Renal Stones, Gallbladder Stones and Atherosclerosis Plaque. *Journal of kerman university of medical sciences* 21(4): 302-312. (In Farsi).

9. Jerman, I. 2017. What *Nanobacteria* and Nanovesicles May Tell Us about the Origin of Life. Open access library journal 4: e3348.

10. Kolahi, J., M. Shahmoradi and M. Sadreshkevary. 2018. *Nanobacteria* in clouds can spread oral pathologic calcifications around the world. *Dental hypotheses journal* 3(4):138-141.

11. Lu, H., Y. N. Guo, S. N. Liu, H. Zhu and D. C. Zhang. 2012. Isolation, cultivation and identification of *Nanobacteria* from placental calcification. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 25(11): 2182–2185.

12. Lwin, K. M. 2012. Nanobacterium sanguineum In Pathological Calcifications. first printing. FAME Publishing House, Hlaing Tharyar city of Industry Yangon Myanmar.

13. Martel, J., H. H. Peng, D. Young, C. Y. Wu and J. D. Young. 2014. Of *Nanobacteria*, nanoparticles, biofilms and their role in health and disease: facts, fancy and future. *Future Medicine Ltd* 9(4), 483–499.

14. Miller, V. M., G. Rodgers and J. A. Charlesworth. 2004. Evidence of *Nanobacteria*l-like structures in calcified human arteries and cardiac valves. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 287(3): 1115–1124.

15. Petricciani, J., R. Sheets, E. Griffiths and I. Knezevic. 2014. Adventitious agents in viral vaccines: Lessons learned from 4 case studies. *Biologicals journal* 42(5):223-36.

16. Sardarabadi, H., M. Mashreghi, K. h. Jamialahmadi and T. Dianat. 2014. Resistance of *Nanobacteria* isolated from urinary and kidney stones to broad-spectrum antibiotics. *Iranian journal of microbiology* 6(4):230-233.

17. Shojaeian, A., M. Rostamian, J. Noroozi and P. Pakzad. 2016. The Identification of Chemical and Bacterial Composition and Determination of FimH Gene Frequency of Kidney Stones of Iranian Patients. *Zahedan journal of research in medical sciences* 18(6):e7363.

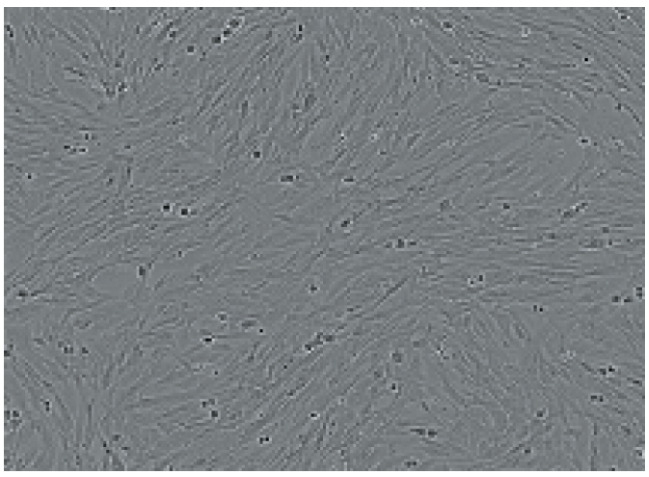
18. WHO. 2013. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. Technical Report Series, No. 978. available online at: http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf

19. Yaghobee, S., M. Bayani, N. Samiei and N. Jahedmanesh. 2015. Review; What are the *Nanobacteria*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 29 (5): 826–833.

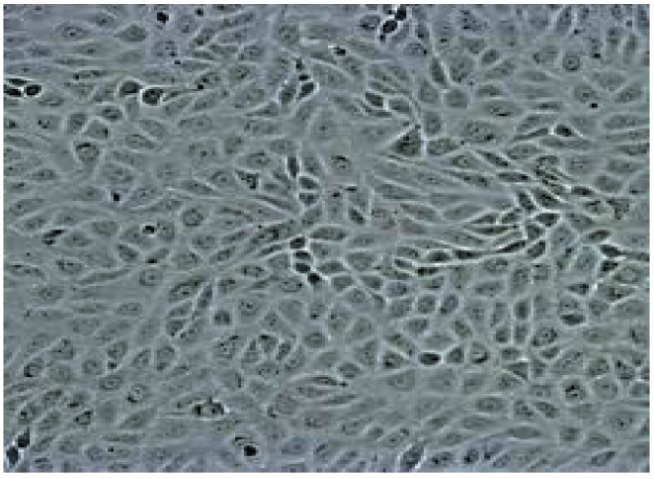
www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱- تشکیل کریستال توسط *Nanobacteria* در محیط کشت (با بزرگنمایی ۲۰۰) توسط میکروسکوپ نوری معکوس (۱۶)



شکل۲-الف: کشت ۴۸ ساعته سلول لاین BHK با بزرگنمایی ۱۰۰

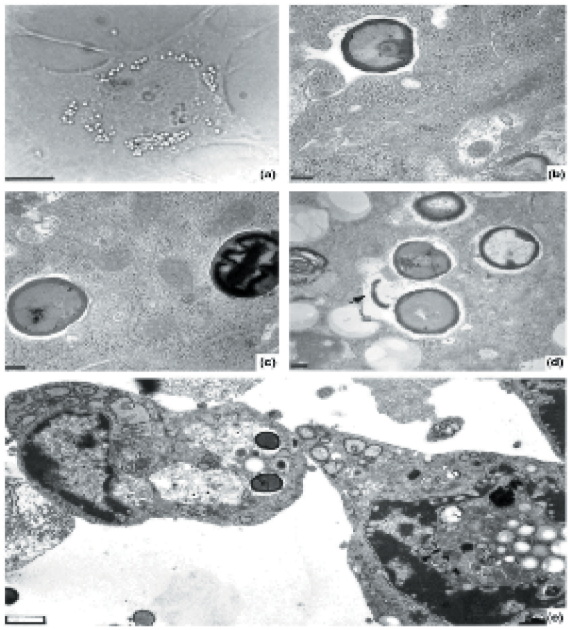


شکل۲-ب: کشت ۴۸ ساعته سلول MDBK با بزرگنمایی ۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

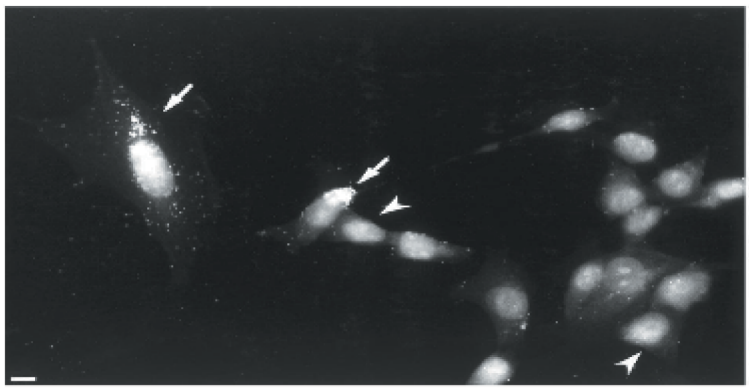
شکل ۳- الکتروفورز محصولات مرحله PCR جهت تکثیر قطعه ۵۵۸ جفت بازی ناحیه ۱۶S rRNA، با جفت پرایمر یونیورسال،R F Nanobac۲ Nanobac۲ ، چاهک های شماره ۵ و ۱۹ نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، ۱- کنترل مثبت، ۲- نمونه سلول ها در بقیه چاهک ها



شکل ۴- (a) تصویر سلول واکوئلیزه شده ۳T۶ آلوده، و میکروگراف های میکروسکوپ الکترونی سلول های BHK تلقیح شده با (b) . *Nanobacteria* واکوئلیزاسیون پیرامون هسته یک سلول ۳T۶ آلوده زیر میکروسکوپ فازکنتراست. (c–d) یک Nanobacterium که توسط یک سلول BHK بلعیده می شود. Nanobacteria در داخل ویزیکول های سلول های BHK می باشند، که فلش در تصویر (d) بقایای یک Nanobacterium را در یک ویزیکول بزرگ با دو Nanobacteria نشان می دهد. (e) یک ظاهر معمول آپوپتوز سلول های BHK آلوده را نشان می دهد. نوار، (a) ۱۰ (b–d) ۲۰۰ nm، (e) ۱ mm (۴).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- اتصال انتخابی نانوباکتری ها به سلولهای 3T6. فلش ها نشان دهنده سلول هایی هستند که بشدت آلوده به نانو باکتری ها می باشند. نوار، ۱۰ mm(۴).

www.SID.ir