مقایسه کشت ویروس سرخک به طریق یک لایه و همزمان در سلول دیپلوئید انسان از نظر عیار ویروس

صابر نصیری، خضراله کمالی‌دهقان، سیدابوالقاسم حسینی و علی ساسانی

مقدمه:

معمولاً ویروس سرخک در سلول دیپلوئید انسان به طریقه یک لایه (Monolayer) کشت می‌شود. این روش کشت، سالهاست که در قسمت تولید واکسنهای ویروسی مورد مصرف پزشکی انجام می‌شود (میرشمسی و همکاران ۱۹۷۶).

به منظور بالابردن عیار ویروس اوریون، به جای استفاده از کشت یک لایه از کشت هم زمان ویروسی و سلول Co-cultivation با موفقیت استفاده شده است (ساسانی و همکاران ۱۹۹۱). تجربیات اولیه در مورد ویروس سرخک نشان می‌دهد که با استفاده از این روش می‌توان هم در وقت صرفه جویی نمود و هم عیار ویروس به دست آمده را بالاتر برد. با توجه به این تجربیات کشت ویروس واکسن سرخک به طریقه Co-cultivation انجام و نتایج حاصله با نتایج کشت به طریقه یک لایه مقایسه شده است.

مواد و روش تحقیق:

الف- کشت سلول:

۱- *کشت به طریقه یک لایه:* در این روش سلول دیپلوئید انسان (MRC-5) در بواتهای یک لیتری با استفاده از محیط کشت BME حاوی ۱۰ درصد سرم گوساله کشت داده شده و پس از آنکه سلولها رشد کردند و تمام سطح بوات را پوشاندند، ویروس مورد نظر در روی آنها پاساژ داده می‌شوند. مقدار ویروس تزریق شده در هر بوات بین ۰/۰۱ تا ۰/۱ TCID 50 می‌باشد.

۲- *کشت به طریقه هم زمان:* در این روش پس از آنکه سلول، تحت تأثیر تریپسین از سطح بوات کنده شد و با محیط کشت BME حاوی ۱۰ درصد سرم گوساله مخلوط شد، با ویروس مورد نظر به همان نسبتی که در بالا اشاره شد مخلوط و سپس در بواتهای یک لیتری تقسیم و در گرمخانه قرار می‌گیرند. به این ترتیب کشت و تزاید سلول و ویروس هم زمان با هم شروع می‌گردند و چون ویروس سرخک بر خلاف اکثر انتروویروسها کند رشد می‌باشد قبل از آنکه آسیبی به سلولها برساند، سلولها رشد کافی کرده و پس از چند روز سطح بواتهایی که به این ترتیب کشت شده‌اند از سنگفرشی از سلول پوشیده می‌شود. در این هنگام سطح سلولها با محلول PBS شسته شده تا بقایای سرم و سایر مواد پروتئینی حذف گردند. سپس به آنها محیط برداشت ویروس که فاقد مواد پروتئینی و آنتی بیوتیک می‌باشد اضافه و به گرمخانه ۳۳ درجه منتقل می‌گردند. به محض آنکه میزان CPE یک یا دو روز زودتر از روش قبلی در روی سلولها ظاهر می‌گردند معمولاً در این روش کشت علائم CPE یك یا دو روز زودتر از روش قبلی در روی سلولها ظاهر می‌گردند . به محض آنکه میزان CPE به ۵۰-۴۰ درصد رسید، برداشت‌ها شروع می‌شوند. معمولاً از هر کشت ۵-۳ برداشت می‌توانیم داشته باشیم.

ب-کشت ویروس

۱- *بذر ویروس مصرف شده:* در این بررسی از سوش واکسن AIK-C که توسط انستیتورازی با همکاری انستیتوکیتازاتوی ژاپن تهیه شده بود (Makino, 1970) استفاده شده است. سوش مزبور در ژاپن در روی فیبروپلاست جوجه کشت داده می‌شود و از آن واکسن تهیه می‌گردد و حال آنکه در انستیتورازی سوش مزبور به سلول دیپلوئید انسان (MRC-5) عادت داده شده و واکسن در روی سلول دیپلوئید تهیه می‌گردد (میر شمسی و همکاران ۱۹۷۷).

۲- *مقدار تزریق ویروس (بذر) برای هر سلول:* همانطور که قبلاً اشاره شد، به ازاء هر ۱۰ تا ۱۰۰ سلول زنده یک ذره ویروس به کشت تزریق می‌گردد و مقدار تزریق ویروس در هر دو روش به یک میزان می‌باشد. درجه حرارت مناسب جهت رشد سلولها تا مرحله یک لایه‌ای، ۳۷ درجه و درجه حرارت مناسب برای تکثیر ویروس واکسن سرخک (سوش AIK) ۳۳ درجه سانتی گراد می‌باشد.

ج- برداشت ویروس:

برداشت ویروس هنگامی شروع می‌شود که حداقل بین ۴۰ تا ۵۰ درصد سلولها علائم سیتوپاتوژنی را نشان دهند. از هر کشت معمولاً ۴-۳ برداشت و فاصله بین برداشتها ۲۴ ساعت می‌باشد. ویروسها پس از برداشت با ماده محافظ مخلوط و پس از آزمایش سترونی به فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد منتقل می‌گردند. نمونه برداری جهت سنجش عیار و سایر آزمایشات قبل از فریز شدن انجام می‌پذیرد.

د- سنجش عیار ویروسهای برداشت شده:

رقتهای مختلفی از ویروسهای برداشت شده تهیه و هر رقت به چهار لوله کشت سلول vero تزریق می‌گردد. فاصله هر رقت با رقتهای ما قبل و ما بعد آن نیم Log^{10} می‌باشد. آخرین قرائت لوله‌های سنجش عیار روز دهم بوده و نتایج طبق روش kaerber محاسبه و ثبت می‌گردد (Kaerber 1931).

نتیجه:

همانطور که قبلاً اشاره شد، ظهور CPE در کشت به طریقه کشت همزمان ۲۴ تا ۴۸ ساعت زودتر از کشت به طریقه یک لایه ظاهر می‌گردد و اگر زمان لازم برای کامل شدن کشت سلول به طریقه

یک لایه را که بین ۶ تا ۷ روز می‌باشد به آن اضافه نماییم، جمعاً ۷ تا ۸ روز زودتر از حد معمول می‌توانیم به برداشت ویروس اقدام نماییم که این خود از نظر صرفه جویی در وقت و سرعت در برداشت ویروس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. چنانچه در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، در یک بررسی، در اولین برداشت ویروس در کشت به طریقه کشت همزمان، حداقل ویروس برداشت شده $10^{-4/5}$ و حداکثر آن $10^{-5/5}$ که بطور متوسط $10^{-5/0}$ در هر سانتی متر مکعب می‌باشد و در برداشت دوم حداقل عیار بدست آمده $10^{-3/75}$ و حداکثر آن $10^{-5/5}$، که بطور متوسط $10^{-4/71}$ در هر سانتی متر مکعب و بالاخره در برداشت نهائی حداقل عیار $10^{-4/25}$ می‌باشد. چنانچه ملاحظه می‌گردد، حد متوسط عیار ویروس برداشت شده در برداشت اول، حداکثر $10^{-5/0}$ و در برداشتهای بعدی به تدریج کاهش می‌یابد. علت این امر را می‌توان این طور توجیه نمود که در برداشت اول تعداد سلول موجود در بوات بیشتر بوده و باطبع ویروس بیشتری سنتز می‌گردد و حال آنکه در برداشتهای بعدی که تعداد سلول به تدریج کاهش می‌یابد، سنتز ویروس نیز به همان نسبت کاهش پیدا می‌نماید.

در بررسی دیگری که به عمل آمده (جدول شماره ۲) فقط به یک برداشت قناعت نموده و این برداشت هنگامی عملی می‌گردد که حداقل در ۶۰ تا ۷۰ درصد سلولها علائم سیتوپاتوژنی ظاهر شده باشد. حداقل عیار ویروس به دست آمده در این بررسی $10^{4/5}$ و حداکثر آن $10^{5/5}$ و متوسط عیار به دست آمده $10^{4/95}$ بوده است، یعنی حدوداً مساوی یا کمی کمتر از اولین برداشت، در سری قبل (جدول شماره ۱) می‌باشد. در ابتدا این طور تصور می‌شود که بایستی عیاری بالاتر از آن داشته باشیم ولی با توجه به اینکه برداشت نهایی را معمولاً هنگامی انجام می‌دهیم که حداقل ۶۰ تا ۷۰ در صد سلولها علائم سیتوپاتوژنی از خود نشان دهند و با توجه به اینکه سنتز و آزاد شدن ویروس سرخک کند و تدریجی است. بنابراین، ویروسهائی که به تدریج سنتز و از سلول آزاد می‌گردند، در محیط خارج سلول تحت تاثیر گرمای گرمخانه غیر فعال شده و به تدریج از بین می‌روند.

همانطور که در مقدمه اشاره شد در این کار تحقیقی - کاربردی، یک سری بوات نیز به طریقه یک لایه کشت و برداشت شده است (گروه شاهد). شرایط محیط کشت و میزان سلول و ویروس در این بررسی عیناً شبیه کشت به طریقه کشت همزمان انتخاب شده است. نتایج به دست آمده به طریقه کشت یک لایه در جدول شماره ۳ ارائه شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود در برداشت اول حداقل عیار ویروس بدست آمده $10^{3/5}$ و حداکثر آن $10^{4/5}$ و متوسط آن $10^{3/86}$ می‌باشد که در مقایسه با برداشت اول کشت همزمان، تفاوتی رابه میزان $10^{1/14}$ نشان می‌دهد. یعنی میزان عیار ویروس در برداشت اول به طریقه کشت همزمان متجاوز از ده برابرعیار ویروس برداشت شده به کشت یک لایه بوده و در دومین برداشت، این تفاوت به $10^{-/35}$ می‌رسد (تقریباً دو برابر). در برداشت نهایی تفاوت مختصری بین دو روش مشاهده می‌گردد. در جدول شماره ۴ حد متوسط عیار ویروسهای برداشت شده به طریقه کشت همزمان کشت یک لایه ارائه داده شده است. به طور متوسط در برداشت پایه به دو روش فوق تفاوتی به میزان $10^{/76}$ مشاهده می‌شود و این بدان معنی است که در روش کشت همزمان، عیار به دست آمده حداقل ۵ برابر بیشتر از عیار به دست آمده به طریقه کشت یک لایه می‌باشد.

منابع مورد استفاده:

1- Mirchamsy, Shafyi, Bahrami and kamali 1977. Use of human diploid all, MRC-5 for production of measles and rubella virus vaccine, Biological standardization, Vol. 37, 297.

2- Kaerber, G., 1931. Arch, J. Exp. path. U. pharmakol, 162,480.

3- Makino, S. Keiko, S. NAZARI, F.,et al.,1970 ,cultivation of measles virus in sheep Kidney cell Japan. J. Microbiol. 14, 501, 504.

جدول شماره ۱- میزان برداشت واکسن ویروس سرخجه به‌طریق کشت همزمان (برداشتهای متعدد).

برداشتها	تعدادبطریها	تیتر	میانگین تیتر
	۲۸۱	۵/۵	
	۲۸۸	۴/۵	
1.St.H.	۲۸۹	۵/۰	۵/۰
	۲۹۱	۴/۷۵	
	۲۹۶	۵/۲۵	
	۲۹۷	۴/۲۵	
	۲۹۸	۳/۷۵	
	۲۹۹	۴/۷۵	۴/۷۱
2nd.H.	۳۰۰	۵/۵	
	۳۰۱	۴/۵	
	۳۰۶	۵/۲۵	
	۳۰۸	۵/۰	
	۳۱۹	۴/۲۵	
	۳۲۳	۴/۲۵	
F.4.	۳۲۵	۵/۰	۴/۴۰
	۳۲۶	۴/۵	
	۳۲۷	۴/۰	
تیتر میانگین کل			۴/۷۰

جدول شماره ۲- میزان برداشت واکسن ویروس سرخجه به‌طریق کشت همزمان (کشت انفرادی)

برداشت‌ها	تعداد بطریها	تیتر	میانگین تیتر
	۳۵۳	۵/۵	
	۳۵۴	۵/۰	
	۳۵۵	۴/۷۵	
	۳۵۶	۴/۷۵	
	۳۵۷	۴/۷۵	۴/۹۵
برداشتهای انفرادی	۳۵۸	۵/۰	
	۳۵۹	۵/۲۵	
	۳۶۰	۴/۷۵	
	۳۶۱	۵/۵	
	۳۶۲	۴/۵	
	۳۶۳	۴/۷۵	

جدول شماره ۴- اختلاف بین دو نوع تولید

نوع کشت	میانگین تیتر
کشت همزمان	۴/۸۳
کشت یک لایه	۴/۱۷
اختلاف میانگین	۰/۷۶

جدول شماره ۳- میزان برداشت واکسن ویروس به‌طریق کشت یک لایه‌ای

برداشتها	تعداد بطریها	تیتر	میانگین تیتر
	۲۱۴	۳/۸۳	
	۲۲۱	۳/۵	
برداشت‌های اول	۲۲۷	۴/۰	۳/۸۶
	۲۶۷	۴/۵	
	۲۶۰	۳/۵	
	۴۱۰	۴/۷۵	
	۴۱۲	۴/۰	
	۴۱۳	۴/۰	
برداشت‌های دوم	۴۲۰	۴/۲۵	۴/۳۶
	۴۲۲	۴/۵	
	۴۲۶	۴/۲۵	
	۴۲۷	۴/۷۶	
	۴۳۵	۴/۵	
	۴۳۸	۴/۰	
برداشت‌های سوم	۴۴۱	۳/۷۵	۴/۳۰
	۴۴۴	۴/۵	
	۴۷۷	۴/۷۵	
تیتر میانگین کل			۴/۱۷