DOI: 10.22092/VJ.2020.351820.1763
شماره ۱۳۳ زمستان ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی سوبستراهای سلولی مورد استفاده در تحقیق و تولید فرآورده‌های بیولوژیک از نظر آلودگی به ویروس های BVD 1&2

• **پوران هیبتی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **محسن لطفی (نویسنده مسئول)**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **علی اسحقی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۰۶-۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹-۰۶-۲۰
Email: M.Lotfi@rvsri.ac.ir

چکیده

همزمان با گسترش تولید واکسن بر روی محیط‌های کشت سلولی، شناسایی و از بین بردن ویروس‌های ناخواسته آلوده‌کننده محیط‌های کشت با منشاء حیوانی، و همچنین پیشگیری از آلودگی فرآورده بیولوژیک ناشی ازمحیط‌های کشت سلولی به یکی از دغدغه‌های اصلی تولیدکنندگان واکسن تبدیل شده است. این مطالعه با هدف بررسی آلودگی احتمالی سوبستراهای سلولی مورد مصرف در تحقیق و تولید فراورده‌های بیولوژیک موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به ویروس‌های BVD1 و BVD2 انجام شد. در این پژوهش از تعداد ۴۴ لاین سلولی با شماره‌های پاساژ و تاریخ های ذخیره‌سازی مختلف در مجموع ۱۰۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج RNA از سلول‌های فوق، ابتدا با استفاده از روش Real Time PCR و بکارگیری یک جفت پرایمر برای شناسایی تمامی Pestivirus، آزمایش غربالگری انجام شد. در این آزمایش از بیوتایپ سایتوپاتیک NADL BVDV1a بعنوان کنترل مثبت استفاده شد. سپس به روش RT- PCR گونه و زیرگونه آن‌ها تعیین شد. آلودگی در پنج سلول Hek293, IBRS2(BA F/9), RBK, FLK, RK13 دیده شد که همه سلول‌ها بجز IBRS2 در تایپینگ از نوع BVDV1b بودند. تمام سلول‌های مذکور در تحقیق و کنترل کیفی فراورده‌های بیولوژیک کاربرد دارند.

کلمات کلیدی: ویروس،BVDV1 و BVDV2، سوبستراهای کشت سلولی، عوامل ناخواسته، فرآورده‌های بیولوژیک

Veterinary Researches & Biological Products No 133 pp: 8-16

Evaluation of cellular substrates used in research and production of biological products for infection with BVDV 1 & 2

By: Heybati, P., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Lotfi, M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Eshaghi, A., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran,

Email: M.Lotfi@rvsri.ac.ir

Received: 2020-08-22 Accepted: 2020-09-10

Simultaneously with the expansion of vaccine production on cell culture media, identification and elimination of adventitious viruses infecting culture media of animal origin, as well as prevention of contamination of biological products from cell culture media to one of the main concerns of production Vaccine suppliers. The aim of this study was to investigate the possible contamination of cellular substrates used in research and production of biological products of Razi Vaccine and Serum Research Institute with BVD1 and BVD2 viruses. The address of this investigate was 44 samples from 44 cell lines with different passage numbers and storage dates in a total of 100 samples. After extracting RNA from the above cells, a screening test was performed using Real Time PCR and a pair of primers to identify all Pestivirus. In this experiment, the cytopathic biotype BVDV1a NADL was used as a positive control. Then the species and their subspecies were determined by RT-PCR method. Infection was observed in five cells Hek293, IBRS2, RBK, FLK, RK13, all cells except IBRS2 in BVDV1b typing. All of these cells are used in research and quality control of biological products.

Key words: Virus, BVDV, Cell culture substrates, adventitious agents, Biological products

مقدمه

بکارگیری فرایندهای مختلف در پروسه تولید فرآورده‌های بیولوژیک و استفاده از مواد متفاوت از قبیل سوبسترای سلولی مثل تخم‌مرغ جنین‌دار، سلول‌های پرایمری و لاین، مواد خام و افزودنی‌های محیط کشت با منشاء حیوانات مختلف و ویروس بذر، بطور بالقوه‌ای تولید چنین واکسن‌ها و دیگر فراورده‌های دارویی مشتق از سلول را نسبت به آلودگی‌های تصادفی یا عوامل ناخواسته آسیب‌پذیر نموده است [۱-۳]. آلودگی‌های باکتریایی را می‌توان با آزمایش‌های توصیه شده مناسب به راحتی تشخیص داد ولی تعیین آلودگی‌های ناخواسته ویروسی بدلیل نیاز به استفاده از روش‌های تشخیصی برون‌تنی و درون‌تنی متفاوت و بررسی‌های مولکولی بسیار سخت و پر هزینه است. برخلاف آلودگی‌های باکتریایی و قارچی، آلودگی ویروسی به راحتی تشخیص داده نمی‌شود زیرا ویروس‌ها توسط میکروسکوپ نوری معمولی دیده نمی‌شوند و فقط زمانی که آلودگی ویروسی منجر به تغییرات مورفولوژیک در سلول شود (مثل اثر سایتوپاتیک) می‌توان به حضور ویروس مشکوک شد. عفونت خاموش توسط ویروس‌ها که در آن سلول‌های آلوده هیچ تغییر مورفولوژیکی نمی‌کنند نگرانی عظیمی را ایجاد کرده است چون همیشه نتایج منفی به معنی عدم آلودگی نیست.

به نظر می‌رسد که اقدامات بعمل آمده در صنعت تولید فرآورده‌های بیولوژیک برای جلوگیری از آلودگی‌های فوق، باعث گردیده که آلودگی‌های ویروسی در سوبسترای سلولی و به طبع آن در محصول نهایی کمتر اتفاق بیافتد [۴]. با توجه به اینکه شمار زیادی از فرآورده‌های بیولوژیک بر پایه کشت سلولی تهیه می‌شوند، لذا یکی از دغدغه‌های تمام تولیدکنندگان علاوه برکیفیت و اثربخشی، بی‌ضرری و عدم آلودگی این واکسن‌ها می‌باشد.

ویروس‌های ناخواسته در فراورده‌های بیولوژیک یک تهدید بالقوه برای تولید بوده و اغلب بر بی‌ضرری آنها مخصوصا واکسن‌های ویروسی تولید شده در محیط کشت سلول تاثیرگذار است [۱, ۵-۷]. با توجه به اینکه ویروس‌های ناخواسته نیز برای تکثیرخود به سوبسترای سلولی نیاز دارند، هنگامی عوامل ناخواسته ویروسی فراورده بیولوژیک را آلوده می‌سازد که سوبسترای سلولی آلوده باشد. با افزایش پاساژ سلولی، شانس آلودگی

نیز افزایش می‌یابد که اغلب دلیل آن استفاده از مواد اولیه آلوده با منشاء دامی در تهیه محیط کشت است [۷]. ویروس‌های جنس پستی ویروس از خانواده فلیوی ویریده بویژه گونه‌های مختلف ویروس BVD مهم‌ترین ویروس‌های مطرح به عنوان عوامل ناخواسته آلوده‌کننده فراورده‌های بیولوژیک و واکسن هستند.

از دیدگاه کنترل کیفی تئوری، سرم جنین گاوی باید از نظر احتمال آلودگی با تمام ویروس‌های ممکن آزمایش شود ولی این امر در عمل و از لحاظ اقتصادی امکان‌پذیر نیست. هر سری سرم باید از نظر وجود ویروس‌های در همه جا حاضر و شناخته شده مانند BVDV پایش شود. همچنین دانستن منشاء جغرافیایی سرم برای آزمایش عوامل ناخواسته ضروری است و سرم‌ها باید از نظر ویروس‌هایی آزمایش شوند که در آن ناحیه جغرافیایی منشاء سرم حضور دارند [۸].

با توجه به موارد بیان شده، این مطالعه با هدف بررسی آلودگی احتمالی سوبستراهای سلولی مورد مصرف در تحقیق، تولید و کنترل کیفی فراورده‌های بیولوژیک موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به گونه‌های ویروس BVD 1&2 انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

سلول

در مطالعه از تعداد ۴۴ لاین سلولی با شماره‌های پاساژ و تاریخ‌های ذخیره‌سازی مختلف در مجموع ۱۰۰ نمونه از بخش‌های مختلف تولیدی واکسن‌های ویروسی انسانی، دامی و مدیریت کنترل کیفی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج تهیه شد. سلول‌های کاری که از بخش‌های تولیدی تب برفکی، واکسن‌های ویروسی انسانی، واکسن‌های ویروسی دام و تک‌یاخته و بصورت کشت شده در فلاسک دریافت شدند، پس از ثبت مشخصات، فریز شده و تا زمان انجام مرحله استخراج RNA در فریزر ۷۰- نگهداری شدند. برای برداشت از ذخیره سلول‌ها در تانک ازت، جهت ذوب محتوای کرایوتیوب‌ها، آنها داخل یک بشر محتوی آب ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند و به مدت ۵ دقیقه با دور g ۲۵۰ (rpm1200) سانتریفیوژ و مایع رویی آنها تخلیه گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر PBS به پلت‌ها اضافه و چندین بار به آرامی پیپتینگ شدند و طبق پروتکل کیت استخراج اسید نوکلئیک ویروسی شرکت تکاپوزیست، استخراج RNA ویروسی احتمالی صورت پذیرفت.

آزمایش آلودگی احتمالی سلول ها به پستی ویروس ها به روش مولکولی

واکنش Real time PCR به منظور تشخیص pestivirus

برای این منظور از مستر میکس RealQ Plus 2X Master Mix for Probe, High ROX (Amplicon, Denmark) استفاده شد ۹ غلظت مختلف از cDNA حاصل از RNA تهیه شد (۱۰۶کپی در هر میلی‌لیتر) انتخاب شد. واکنش تکثیری در حجم ۲۰ میلی‌لیتر که مشتمل بر ۱۰ میلی‌لیتر از مستر میکس، ۵ میلی‌لیتر از cDNA از رقت‌های سریالی تهیه شده با نسبت‌های ۱ میکرولیتر از هر آغازگر و ۰/۶ میکرولیتر از پروب و ۲/۴ میکرولیتر آب مخصوص PCR با الگوی دمایی زیر با استفاده از دستگاه Real Time

جدول ۱- پرایمرها جهت تکثیر بخشی از ژن ۵' UTR پستی ویروس ها به روش Real- time PCR.

ردیف	نام ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر ۳'→ ۵'	طول قطعه (bp)	رفرنس
۱	5' UTR	BVDco-F	CAT GCC CAT AGT AGG AC	۲۸۳	
		BVDco-R	CCA TGT GCC ATG TAC AG		
۲	5' UTR	BVD1a-F	TCG ACG CCT TRR CAT GAA GGT	۱۶۹	
		BVD1a-R	CCA TGT GCC ATG TAC AG		
۳	5'UTR	BVD1b-F	TCG ACG CTT TGG AGG ACA AGC	۱۶۹	
		BVD1b-R	CCA TGT GCC ATG TAC AG		
۴	5' UTR	BVD2-F	CGA CAC TCC ATT AGT TGA GG	۱۰۵	
		BVD2-R	GTC CAT AAC GCC ACG AAT AG		
۵	5' UTR	BDV-F (PBD1)	TCG TGG TGA GAT CCC TGA G	۲۲۵	۲۰۰۰ Vilcek
		BDV-R (PBD2)	GCA GAG ATT TTT TAT ACT AGC CTA TRC		

F: Forward oligonucleotides.

R: Reverse oligonucleotides.

PCR مدل۶۰۰۰ Corbet انجام شد. ۹۵ درجه سلیسیوس بمدت ۱۵ دقیقه و سپس ۴۵ سیکل شامل: ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سلیسیوس به مدت ۶۰ ثانیه. توالی پرایمر و پروب در جدول ۱ آمده است.

انجام واکنش RT-PCR

پس از استخراج RNA از RT-PCR دو مرحله‌ای جهت تکثیر بخشی از ژن 5′ UTR ویروس BVD بهره‌گیری شد. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ آمده است.

تهیه cDNA

با توجه به مقادیر گفته شده در جدول ۳ مواد مورد نیاز در تیوب‌ها ریخته شدند و سپس میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. برنامه حرارتی ترموسایکلر، شامل دمای ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه و ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه بود.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

به منظور تکثیر cDNAهای حاصل شده در مرحله قبل، واکنش PCR با مواد و مقادیر ذکر شده در جدول ۴ در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و مطابق برنامه‌های حرارتی مجزا (جداول ۵ و ۶) اجرا شد. آنزیم استفاده شده برای تکثیر در این مرحله آنزیم DNA تک پلیمراز بود.

الکتروفورز محصول PCR

محصولات حاصل از آزمایش‌های RT-PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ و رنگ‌آمیزی با سایبرسیف استین و عکس برداری با دستگاه ژل داک مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

در این تحقیق لاین‌های سلول پرکاربرد از بخش‌های تولید واکسن‌های ویروسی انسانی، تولید واکسن‌های ویروسی دام، تب برفکی، تکیاخته و کنترل کیفی از نظر آلودگی ویروسی، در مجموع با احتساب نمونه‌گیری از یک لاین سلولی با سری ذخیره‌سازی متفاوت در تاریخ آن، بیش از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج RNA از سلول‌های فوق، ابتدا با استفاده از روش Real Time PCR و بکارگیری از یک جفت پرایمر که تمام Pestivirusها را شناسایی می‌کرد، آزمایش غربالگری انجام شد. در این آزمایش از بیوتایپ سایتوپاتیک NADL BVDV1a بعنوان کنترل مثبت استفاده شد. ۵ نتایج Real time PCR بر روی ویروس BVD کنترل مثبت نشان داد، واکنش در محدوده (۱-۱۰^{۶}) کپی در میلی‌لیتر خطی است. از آنجایی که هیچ کدام از نمونه‌های کنترل منفی پاسخ مثبت کاذب ایجاد نکرد ویژگی این روش در شناسایی ۱۰۰٪ است. آزمایش فوق قادر بود تا کمتر از ۱۰۰ کپی از ویروس را شناسایی و گزارش نماید.

در آزمایش‌های Real time PCR از مجموع ۴۴ نمونه سلول بررسی شده ۵ مورد آلودگی به Pestivirusها در سلول‌های IBRS2(BAF/9)، RBK، FLK و RK13 مشاهده گردید (شکل ۱). این آلودگی‌ها در آزمایش RT- PCR با استفاده از پرایمرهای یونیورسال تایید گردید (شکل ۲). جهت تایپینگ ویروس از پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید که سه نمونه سلولی RK13، FLK و Hek293 با پرایمرهای اختصاصی BVDV 1b مثبت شدند (شکل ۳). اما دو نمونه سلولی دیگر با هیچیک از جفت پرایمرهای اختصاصی مثبت نشدند. بررسی‌های برای تعیین تیپ ویروس دو نمونه سلولی IBRS2(BAF/9) و RBK ادامه دارد.

بحث

بحث و رویکرد کلی

منبع اصلی عفونت با ویروس BVD دام‌های دارای PI می‌باشند. که آنها حجم زیادی از ویروس را در طول زندگی از خود دفع می‌کنند [۹, ۱۰] و عمدتا با مصرف سرم‌های آلوده با منشاء این حیوانات، کشت‌های سلولی آلوده می‌گردند. بواسطه طبیعت تکرشته ای بودن ژنوم، میزان موتاسیون در این ویروس‌ها خیلی زیاد نشان داده می‌شود،که در خیلی از موارد ممکن هست منجر به ظهور یک دودمان ویروسی جدید شود. در حالی که ارتباط این میزان موتاسیون‌های بالا با ظهور دودمان‌های جدید اثبات نشده است، افزایش ایجاد گونه‌های پستی ویروس جدید توصیف شده است که بعضا با روش‌های متداول نمی‌توان آنها را تشخیص داد [۱۰-۱۲]. در یک بررسی اپیدمیولوژیک گسترده روی فراورده‌های بیولوژیک از نظر آلودگی به ویروس BVD با روش مولکولی، از مجموع ۴۲۴ نمونه ۱۰۴ مورد (۲۴٫۵۳٪) سرم‌های FBS، کشت‌های سلولی، واکسن‌های مصرف دامپزشکی و پزشکی و اینترفرون‌های مصرف پزشکی

جدول ۲- پرایمرهای تکثیر بخش‌هایی از ژن۵′ UTR ویروسBVD به روش RT-PCR.

ردیف	نام ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر ۳′→۵′	طول قطعه (bp)	رفرنس
۱	5′ UTR	BVD190-F	GRA GTC GTC ART GGT TCG AC	۲۰۸	۲۰۱۵ OIE
		V326-R	TCA ACT CCA TGT GCC ATG TAC		
		Prob: TQ-pesti	FAM-TGC YAY GTG GAC GAG GGC ATG C-TAMRA		

آلوده بودند. ۶۶ نمونهٔ فوق BVDV1 بودند. سویه‌های گزارش شده ناشی از تحقیقات انجام شده در اروپا (اتریش، بلژیک، دانمارک، فرانسه، آلمان، ایرلند، ایتالیا، اسلواکی، اسپانیا، سوئد، سوئیس، انگلیس)، از آمریکا (آرژانتین، برزیل، کانادا، کلمبیا، جمهوری دومینیکن، مکزیک و آمریکا)، آسیا (چین، هند و ژاپن)، آفریقای جنوبی، استرالیا و نیوزلند بود. بیست سویه BVDV-2 بودند که به طور عمده در گروه ژنومی BVDV-2A از آمریکای شمالی (ایالات متحده، کانادا)، اروپا (بلژیک، ایتالیا، هلند و انگلیس) و ژاپن بودند. تنها ۳ سویه آلاینده در گروه ژنومی BVDV-2B مربوط به آرژانتین، برزیل بود. علاوه بر BVDV-1 و BVDV-2 همچنین BVDV-3 (گروه Hobi) از سری‌هاي توليد شده سرم جنین گاو آلوده جدا شده‌اند [۱-۴] با در نظر گرفتن تمایز ژنتیکی و آنتی‌ژنی بین BVDV-3 و دو گونه BVDV، عملکرد ضعیف آزمایش‌های طراحی شده برای غربالگری BVDV-1 و BVDV-2 را نشان می‌دهد [۵, ۶] و در نتیجه مشکلات تشخیص آزمایشگاهی BVDV-3، به احتمال زیاد پاتوژن می‌توانسته در فرآورده‌های بیولوژیکی شناسایی نشود و در محصولاتی مانند FBS با وجود اقدامات کنترل دقیق منتشر شود. زمانی که پستی ویروس پتانسیل حضور در عفونت‌های زئونوتیک را داشته باشد، آلودگی محصولات بیولوژیکی به طور ویژه اهمیت پیدا می‌کند. نقش پستی ویروس‌ها در آسیب‌شناسی انسان ناشناخته و اطلاعات در مورد اپیدمیولوژی Pestivirus درانسان هنوز ناقص است. در طی یک بررسی سرواپیدمیولوژیک سندروم پرسنژ ترنر در شمال ایتالیا دیده شد [۱-۴].
علاوه بر این در یک مطالعه انجام شده در زامبیا و اروپا، حساسیت مثبت به BVDV در بیماران مبتلا به نقص ایمنی یافت شد [۱۵, ۱۶]. در بلژیک از یک نمونه بافی کوت انسانی بیمار مبتلا به ویرمی ۳۱ روزه، سویه غیر سیتوپاتیکی که بعنوان ژنوتیپ BVDV-1c طبقه‌بندی شده، جدا شد [۱۷]. در یک مطالعه انجام شده در آمریکا، در مادران دارای شیرخوارهای میکروسفالی، دو سرم مثبت از نظر آنتی‌بادی علیه سویه NADL BVDV پیدا شد [۱۸-۲۰]. آنتی‌ژن Pestivirus در ۲۳/۶٪ نمونه مدفوع از کودکان، زیر دو سال مشاهده شد. در آریزونا امریکا گاستروانتریت همراه با بیماری تنفسی گزارش شد، در حالی‌که هیچ عامل بیماری‌زایی شناسایی نشد [۲۰] مشابه مطالعات اولیه در کودکان از بالتیمور و هیوستون امریکا و داکا بنگلادش انجام شد و نشان داد که مشابه گاستروآنتریت همراه با پستی ویروس در آمریکا است. آنتی‌بادی‌های مشخص ضد BVDV در ۴۰٪ سرم‌های آزمایش شده از دوقلوهای غیرهمسان برای اسکیزوفرنی گزارش شده است [۲۰] این جنبه مهم قابل توجه است که پستی ویروس‌ها گرایش به سلول‌های عصبی در مطالعات آسیب‌شناسی حیوانات دارد. دیگر مطالعات ارتباط میان پستی ویروس‌ها و اختلالات عصبی در انسان نشان می‌دهد، عفونت در مدت بارداری و امکان احتمالی همراهی با برخی از انواع آسیب مغزی در نوزادان نارس بوده است. به رغم استانداردهای تولید و کنترل بالا خصوصا در کشورهای غربی استفاده شده است این مشکلات از روش‌های آزمایش بی‌ضرری واقعی فراورده‌های بیولوژیک تولیدی ناشی می‌شود. بنابراین، آزمون آزمایشگاهی یک عنصر اساسی است و نیاز به توجه خاصی دارد. آزمایشات باید با در نظر گرفتن ناهمگونی پستی ویروس‌ها، توانایی شناسایی بیشترین طیف از انواع ژنومی را داشته باشند. علاوه بر این، روش‌های غیرفعال‌سازی، مانند اشعه، ممکن است بی‌تاثیر باشد. کشورهایی که به طور کلی توانایی‌های آزمایشگاهی کمی دارند و FBS را از گله‌های بومی حامل بالقوه گونه‌های Pestivirus به دست می‌آورند، با در نظر گرفتن پتانسیل زئونوتیکی BVDV-1، برای جلوگیری از آلودگی، باید توجه ویژه‌ای برای فراورده‌های بیولوژیک

جدول ۳- مواد و مقادیر مورد استفاده در تهیه cDNA طی واکنشRT-PCR دو مرحله‌ای.

ماده واکنش‌دهنده	حجم (میکرولیتر)
آب مقطر	۲/۲۵
بافر ۵X (M-MuLV)	۲
dNTPs (۱۰ میلی¬مول)	۱
پرایمرها (۱۰پیکومول)	(Reverse) ۰/۵ (Forward) ۰/۵
بازدارنده RNAase	۰/۲۵
آنزیم رونویسی معکوس M-MuLV	۰/۵
RNA	۳
مجموع	۱۰

مورد استفاده انسانی داشته باشند.

هنگ یانگ و همکاران (۲۰۱۱) متعاقب گزارش‌هایی از جداسازی پستی ویروس‌های غیر نرمال از FBSهای با منشاء عمدتا آمریکای جنوبی، ۳۳ نمونه FBS از ۱۰ شرکت عمده توزیع‌کننده FBS در دنیا را بررسی نمودند. به روش Real-Time RT-PCR در همه نمونه‌ها RNA پستی ویروس‌ها را تشخیص دادند. BVDV1 از ۱۱ کشوری که FBS از آن تهیه شده بود، جدا شد. BVDV2 منحصرا از کشورهای قاره‌ی آمریکا جدا شد. پستی ویروس‌های غیر نرمال در ۱۳ نمونه از ۵ کشور تشخیص داده شد. این پنج کشور شامل: برزیل، استرالیا، کانادا، مکزیک و آمریکا بودند.

مونتیرو و همکاران (۲۰۱۸) در فاصله زمانی ۲۰۰۶ تا ۲۰۱۴ حدود ۷۳ سری تولید FBS برزیل را از نظر آلودگی به پستی ویروس‌ها مورد بررسی قرار دادند. ۵۳٫۴٪ از نمونه‌ها مثبت بودند و یک مورد حاوی ویروس عفونی بود. ۳۴ نمونه (۴۶٫۶٪) به BVDV1 آلوده بود که از این تعداد ۲۳ مورد BVDV1a، ۸ مورد BVDV1b و سه مورد BVDV1d بود. ۶ نمونه (۸٫۲٪) به BVDV2 آلوده بود که دو مورد 2a، سه مورد 2b و یک مورد شناسایی نشده بود. ۵ سری از تولید FBS (۶٫۸٪) به بیش از یک پستی ویروس آلوده بود. در پایان نتیجه گرفتند این میزان فراوانی آلودگی به پستی ویروس‌ها در سری‌های تولید FBS، تاکید بر لزوم بازنگری در دستورالعمل‌های پایش FBS است تا ریسک آلودگی فراورده‌های بیولوژیک و معرفی عوامل آلوده به نواحی پاک کاهش یابد

در این مطالعه ۱۰۰ نمونه از پاساژهای متفاوت ۴۴ نوع سلول موجود در بانک سلولی مدیریت کنترل کیفی و بخش‌های تولیدی موسسه دریافت گردیده و از نظر آلودگی به ویروس‌های BVDV مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند.

همان‌طور که قبلا نیز اشاره شد تولید فراورده‌های بیولوژیک بر پایه کشت سلولی، همواره با نگرانی از آلودگی آن‌ها با عوامل ناخواسته همراه است بنابراین علاوه برکیفیت و اثربخشی، بی‌ضرری این فراورده‌ها یکی از دغدغه‌های اصلی تولیدکنندگان می‌باشد. بدلیل استفاده از سرم گوساله و سرم جنین گاو (FBS) و بعضا سلول پرایمری در تولید فراورده‌های

جدول ۵ - برنامه حرارتی ترموسایکلر مرحله دوم از واکنشRT-PCR دو مرحله‌ای به‌منظور بخش‌هایی از ژن 5'UTR ویروس های BVD 1&2 و ژنوتیپ های آنها.

تعداد سیکل‌ها	دما (سلسیوس)	زمان
۳۰	۹۴	۱۰ ثانیه
	۵۰	۱۵ ثانیه
	۷۲	۳۰ ثانیه
۱	۷۲	۱۰ دقیقه

جدول۶ - برنامه حرارتی ترموسایکلر مرحله دوم از واکنشRT-PCR دو مرحله‌ای به‌منظور بخش‌هایی از ژن 5'UTR ویروسBDV.

تعداد سیکل‌ها	دما (سلسیوس)	زمان
۳۶	۹۴	۶۰ ثانیه
	۵۶	۶۰ ثانیه
	۷۲	۶۰ ثانیه
۱	۷۲	۷ دقیقه

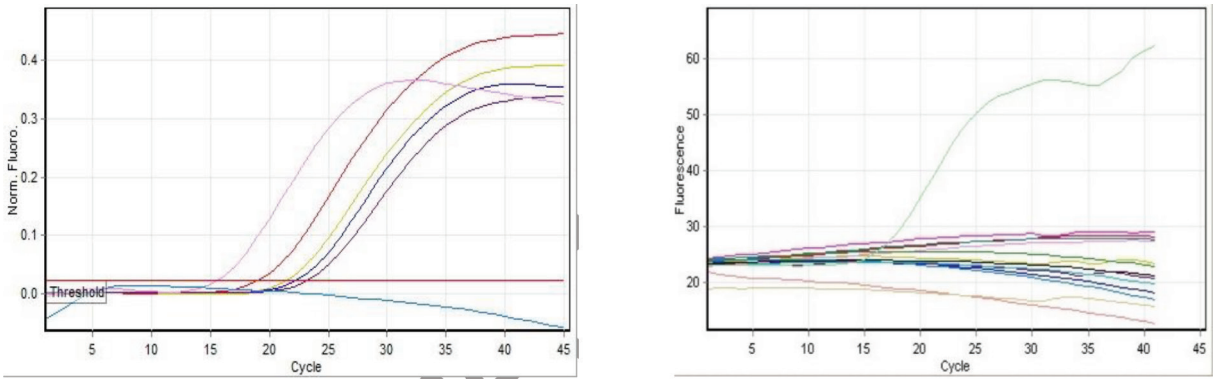
فوق و شرایط Pestivirusها و تمایل آنها به عفونت‌های پایدار با یا بدون هیچگونه علائم بالینی در داها، این ویروس‌ها از مهم‌ترین ویروس‌هایی هستند که می‌توانند ناخواسته فراورده‌های بیولوژیک را آلوده نمایند.

در این آزمایش، در ابتدا غربالگری با روش Real-time PCR با استفاده از پرایمرهای یونیورسال توصیه شده توسط سازمان جهانی بهداشت دام (OIE) برای تشخیص Pestivirusها انجام پذیرفت. در مجموع ۵

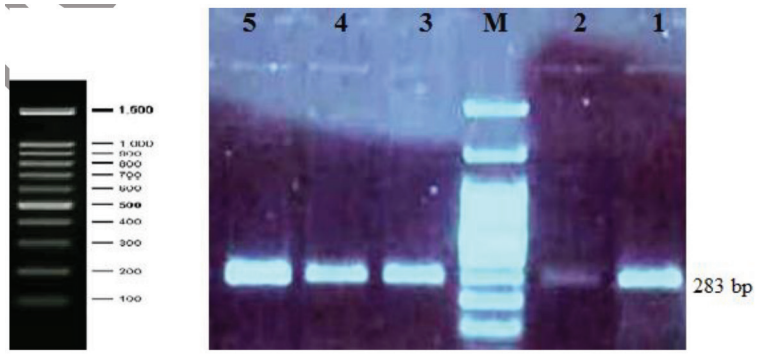
جدول ۴- مواد و مقادیر مورد استفاده در مرحله دوم از واکنشRT-PCR دو مرحله‌ای.

ماده واکنش‌دهنده	حجم (میکرولیتر)
آب مقطر	۸/۴
Master mix	۸/۴
پرایمرها (۱۰ پیکو مول)	(Reverse) ۰/۶ (Forward) ۰/۶
cDNA	۲
مجموع	۲۰

سلول آلوده بودند که شامل سلول‌های IBRS2 (BA F/9)، RK13، FLK و RBK و Hek293 می‌شدند. خوشبختانه از هیچکدام از سلول‌های فوق در تولید فراورده‌های بیولوژیک موسسه رازی استفاده نمی‌شود. در خصوص کاربرد سلول‌های فوق و عملکردی اصلاحی ممکن در ادامه خواهد آمد.
جهت تعیین تیپ ویروس‌های آلوده‌کننده سلول‌های فوق با روش RT-PCR و استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه و ژنوتیپ اقدام گردید که سه سلول Hek293، RK13، FLK به ویروس BVDV 1b آلوده بودند. اما علیرغم استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای تشخیص BVDV2، BDV و BVDV1a & 1b نوع Pestivirus آلوده‌کننده دو سلول RBK و IBRS2 (BA F/9) مشخص نگردید.
سلول FLK یک سلول رفرانس شناخته شده است که بدلیل آلوده بودن به ویروس غیر سیتوپاتیک BLV در تحقیقات در زمینه ویروس مذکور به عنوان کنترل مثبت استفاده می‌شود. با بررسی متون مشخص گردید که این سلول همزمان علاوه بر آلوده بودن به ویروس فوق به ویروس BVDV 1b نیز آلوده است که تاییدکننده یافته‌های این مطالعه است.
مزایای واکسیناسیون به عنوان یکی از مؤثرترین راه‌های جلوگیری از بیماری‌های عفونی حیوانات و انسان‌ها انکارناپذیر است. با این حال علی‌رغم انجام تمامی اقدامات احتیاطی و نظارتی در تولید، همواره احتمال آلوده بودن واکسن‌ها و سایر فرآورده‌های بیولوژیک با عوامل ناخواسته وجود داشته است. جلب اعتماد عمومی پزشکان، دامپزشکان و مقامات بهداشتی در استفاده از واکسن‌ها، نیازمند رعایت توصیه‌های سازمان‌های نظارتی و تنظیم مقررات بین‌المللی مانند NRAs (EMA،FDA) و گروه‌های دیگر (ICH) در تولید واکسن و گرفتن تأییدیه لازم است. علی رغم رعایت تمام استانداردهای بالای تولید و GMP مواردی از حضور



شکل ۱- سمت چپ جذب نوری بدست آمده توسط دستگاه Real time PCR، نمونه کنترل مثبت ویروس BVD با تیتر 10^6 PFU/ml بقیه شامل نمونه های سلولی بود که همگی منفی بودند. سمت راست جذب نوری بدست آمده توسط دستگاه Real time PCR، پنج نمونه سلولی که به Pestivirus آلوده بودند. رنگ صورتی سلول RK13، رنگ قرمز سلول FLK، رنگ لیمویی سلول(BA F/9) IBRS2 ، رنگ آبی پررنگ RBK x/22 و رنگ بنفش Hek293 بود. رنگ آبی کنترل منفی بود.



شکل ۲- ژل الکتروفورز محصول RT-PCR روی نمونه های سلول جهت تشخیص آلودگی به Pestivirus ها، با استفاده از جفت پرایمر BVDV Co ، M نشانگر bp ۱۰۰، شماره های ۱ الی ۵ به ترتیب نمونه سلول Hek293، IBRS2، (BA F/9)، RBK، FLK و RK13 هستند.

عوامل ناخواسته ویروسی در واکسن‌های دارای مجوزهای WHO و FDA با استفاده از روش‌های نوین گزارش شده است. بنابراین پیشنهاد می‌شود برای بالا بردن ضریب بی‌ضرری ویروسی فرآورده‌های تولیدی، ترکیبی از آزمایش‌های معمول و اختصاصی، قدیمی و نوین طرح‌ریزی شوند تا شانس کشف عوامل ویروسی ناخواسته و ناشناخته در مراحل تولید فرآورده‌های بیولوژیک شامل بانک‌های سلولی و بذرهای ویروسی اصلی و کاری، مواد اولیه مشتق از حیوانات و انسان، حیوانات مورد استفاده بعنوان منبع کشت بافتی، پاساژ سلول‌ها و سرانجام بالک‌ها و تولیدات نهایی افزایش یابدو خطر آلودگی آن‌ها کاهش یابد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از همه رئسای بخش‌های تولید واکسن‌های ویروسی و همکاران مدیریت کنترل کیفی موسسه رازی بخصوص آقایان مرتضی کمال‌زاده، سجاد فیروزیار و معصومه بحریاری که در انجام این تحقیق ما را یاری دادند کمال تشکر و قدردانی را دارد.

پاورقی‌ها

1- Pestiviruses.
2-Flaviviridae.
3-Batch.
4-Ubiquitous.
5-Working cells.
6- Pellet.
7- Nucleic Acid High Pure Extraction Kit.
8- Thermocycler.
9- Moloney Murine Leukemia Virus.
10- Taq DNA Polymerase.
11- Gel Doc.
12- lineage.
13- Bovine Leukemia virus.

منابع مورد استفاده

1. Marcus-Sekura, C., et al., Evaluation of the Human Host Range of Bovine and Porcine Viruses that may Contaminate Bovine Serum and Porcine Trypsin Used in the Manufacture of Biological Products. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 2011. 39(6): p. 359-369.

2. Rebecca Sheets , J.L., Gopa Raychaudhuri , John Petricciani, Adventitious agents, new technology, and risk assessment, 19e20 May 2011, Baltimore, MD. *Biologicals*, 2012. 40: p. 162-167.

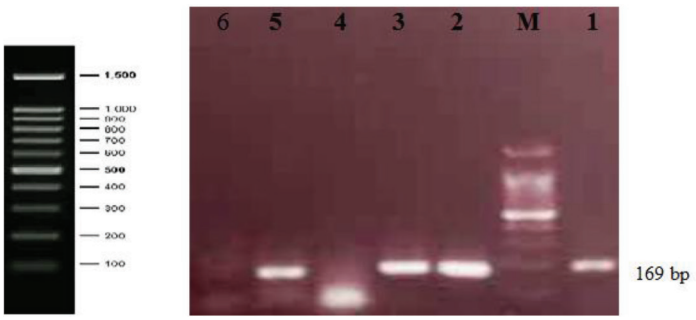
3. Ranjbar, M. M., M. M. Ebrahimi, S. Shahsavandi, T. Farhadi, A. Mirjalili, M. Tebianian and M. H. Motedayen. 2019. Novel Applications of Immuno-bioinformatics in Vaccine and Bioproduct Developments at Research Institutes. *Archives of Razi Institute*. 74: 219-233.

4. Sheets, R., et al., Adventitious agents, new technology, and risk assessment, 19–20 May 2011, Baltimore, MD. *Biologicals*, 2012. 40(2): p. 162-167.

5. Farsang, A. and G. Kulcsar, Extraneous agent detection in vaccines--a review of technical aspects. *Biologicals*, 2012. 40(4): p. 225-30.

6. Dodet, B., et al., Viral safety and extraneous agents testing for veterinary vaccines. *Biologicals*, 2010. 38(3): p. 326-331.

7. Bruckner, L., Viral safety and extraneous agents testing for veterinary vaccines: Rationale for requirements, the European approach. *Biologicals*, 2010. 38(3): p. 338-339.



شکل ۳- ژل الکتروفورز محصول RT-PCR روی نمونه های سلول جهت تشخیص آلودگی به BVDV ۱b ها، با استفاده از جفت پرایمر BVDV ، ۱b M نشانگر ۱۰۰ bp، شماره ۱ کنترل بعنوان کنترل مثبت (BVDV 1b) شماره های ۲ الی ۶ به ترتیب نمونه سلول IBRS2، (BA F/9) RK13، FLK و RBK هستند. Hek293

8. Nicklas, W., V. Kraft, and B. Meyer, Contamination of transplantable tumors, cell lines, and monoclonal antibodies with rodent viruses. *Lab Anim Sci*, 1993. 43(4): p. 296-300.
9. Bauermann, F.V., et al., HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. Journal of Veterinary Diagnostic *Investigation*, 2013. 25(1): p. 6-15.
10. Kirkland, P., et al., Identification of a novel virus in pigs—Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus research*, 2007. 129(1): p. 26-34.
11. Schirrmeier, H., et al., Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *Journal of General Virology*, 2004. 85(12): p. 3647-3652.
12. Vilcek, S., et al., Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus research*, 2005. 108(1-2): p. 187-193.
13. Hayflick, L., History of the development of human diploid cell strains (Opatija) in Proceedings, symposium on the characterization and uses of human diploid cell strains. 37- 54, 1963.
14. WHO, Requirements for Poliomyelitis Vaccine (Inactivated). In Requirements for Biological Substances: 1. General Requirements for Manufacturing Establishments and Control Laboratories; 2. Requirements for Poliomyelitis Vaccine (Inactivated). Report of a Study Group. In WHO Technical Report Series No. 178, World Health Organization, Geneva. 1959.
15. Hayflick, L., A brief history of cell substrates used for the preparation of human biologicals. *Dev Biol*, 2001. 106: p. 5-23.
16. WHO, Requirements for Poliomyelitis Vaccine (Oral). In Requirements for Biological Substances . In WHO Technical Report Series No. 486, World Health Organization,Geneva. No.7.
17. Symp, Proc Symp on Human Diploid Cell. Suggested methods for the management and testing of diploid cell culture used for virus vaccine production. Yugoslav *Academy of Sciences and Art, Zagreb*. P 213-216. 1970.
18. Tarmakova, S. S., S. Y. Sanzhieva and E. S. Nikolaeva. 2019. Impact of Phytobacterial Agent on the Toxic Damage to the Liver and Ileum of White Rats. *Archives of Razi Institute*. 74: 287-294.
19. Yolken, R., et al., Infantile gastroenteritis associated with excretion of pestivirus antigens. *The Lancet,* 1989. 333(8637): p. 517-520.
20. Yolken, R. Pestivirus infection in identicai twins discordant for schizophrenia. in Proceedings of the IXth Congress of Virology, Glasgow. 1993.
21. Potts, B., et al., Possible role of pestiviruses in microcephaly. *The Lancet*, 1987. 329(8539): p. 972-973.