



Review Article

## A review of modern methods of isolation and purification of viruses

### • Nejadkian, Alieh

PhD student, Department of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

### • Samianifard, Maedeh

Research and Development Department of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Promotion and Education Organization, Karaj, Iran.

### • Nazari, Ali\*

Assistant Professor, Research and Development Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2024-01-14

Accepted: 2024-03-21

Revised: 2024-03-21

Published: 2024-10-02

\*Email: anshirvan@gmail.com

### Abstract

The isolation and purification of viruses is a process contingent upon the host cell or the environment in which the virus has multiplied. In numerous studies and applications, it is imperative that be introduced in downstream operations in a manner that preserves their biological properties and structure. The identification of viral agents from different samples is crucial for the diagnosis of various infections and the isolation and classification of the associated viruses. Classification of viruses reveals unique characteristics, including size, shape and biochemical level, as well as structural features such as enveloped or capsid. These attributes influence the selection of downstream techniques. Several studies and reports have addressed the industrial needs for targeted vaccine preparation to improve the current viral downstream operation. The results of these studies have been instrumental in the development of numerous viral vaccines for use in both medical and veterinary fields. The methodologies employed for the isolation, concentration, and purification of viruses have the potential to be used in both research and industry settings, provided that the requisite facilities are in place. Currently, these facilities encompass techniques such as sedimentation, centrifugation, filtration and chromatography. The advancement of viral vaccine production systems is regarded as a fundamental necessity at the national level. This article presents a review of the methods and technologies used in the last two decades in the field of downstream processing of viral vaccines, along with an analysis of the results achieved.

**Key words:** virus purification; sedimentation; centrifugation; filtration; chromatography.



مقاله مروری

## مروری بر روش‌های نوین جداسازی و تخلیص ویروس‌ها

علیه نژادکیان

دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

مائده سمیعانی فرد\*

دانشجوی دکتری، بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

علی نظری\*

استادیار، بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.



تاریخ دریافت: ۱۴۰۲-۱۰-۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳-۰۱-۰۲

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳-۰۱-۰۲ تاریخ انتشار: ۱۴۰۳-۰۷-۱۱

Email: anshirvan@gmail.com\*

### چکیده

جداسازی و تخلیص ویروس‌ها به شکل متمرکز یک فرآیند وابسته به سلول میزبان و یا محیطی است که ویروس‌ها در آن تکثیر یافته‌اند. در بسیاری از مطالعات و کاربردهای مختلف نیاز است که ویروس‌ها به گونه‌ای در عملیات پایین دستی وارد شوند که خواص بیولوژیک و ساختار آنها دچار تغییر نشود. شناسایی عوامل ویروسی از نمونه‌های مربوطه در تشخیص عفونت‌های ویروسی و همچنین جداسازی و تعیین نوع ویروس در حوزه‌های مختلف مهم می‌باشد. ویروس‌ها بر اساس طبقه‌بندی دارای اندازه، شکل و سطح بیوشیمیایی منحصر به فردی می‌باشند و به لحاظ ساختاری دارای غشاء و یا بصورت کپسیدی هستند، که در انتخاب تکنیک‌های مورد استفاده در عملیات پایین دستی نقش کلیدی دارند. مطالعات و گزارشات متعددی در مسیر نیازهای صنعتی تهیه واکسن‌های ویروسی بصورت هدفمند به منظور بهبود فن‌آوری‌های فعلی عملیات پایین دستی ویروس‌ها منتشر شده است. نتایج این مطالعات در تهیه واکسن‌های چند گانه ویروسی در حوزه‌های پزشکی و دامپزشکی اهمیت تولیدی و اقتصادی داشته‌اند. در همین خصوص روش‌های مورد استفاده به منظور جداسازی، تخلیص و تغلیظ ویروس‌ها با ایجاد تاسیسات مورد نیاز در هر دو حوزه تحقیق و صنعت قابلیت استفاده دارند که در حال حاضر شامل ته‌نشینی، سانتریفیوژ، انواع فیلتراسیون و کروماتوگرافی می‌باشند. ارتقای توسعه سیستم‌های تولید واکسن‌های ویروسی از ضروریات اساسی کشور به حساب می‌آید. لذا در این مقاله روش‌ها و تکنولوژی‌های مورد استفاده در دو دهه اخیر در حوزه عملیات پایین دستی واکسن‌های ویروسی و نتایج آنها بررسی شده است.

کلمات کلیدی: تخلیص ویروس؛ ته‌نشینی؛ سانتریفیوژ؛ فیلتراسیون؛ کروماتوگرافی

## مقدمه

شناسایی عوامل بیماری‌زای ویروسی و همچنین عاری بودن واکسن‌ها و دیگر محصولات بیولوژیک از عوامل خارجی آلوده‌کننده یک ضرورت مهم است. تخم‌مرغ‌های عاری از پاتوژن‌های خاص (SPF: Specified pathogen free)، به‌عنوان یکی از پرمصرف‌ترین مواد اولیه جهت تهیه واکسن‌های انسانی، دامی و طیور است (۱). واکسن‌های ویروسی عمدتاً توسط کشت ویروس‌های فعال در سلول‌های بافت زنده با منشأ حیوانی (کشت سلولی، تخم‌مرغ جنین‌دار) به عنوان سوبسترا تهیه می‌شوند. علاوه بر این محیط کشت غالباً با ترکیبات اختصاصی با منشأ حیوانی، مشخصاً سرم، همراه می‌شوند تا رشد رضایت بخش میکروارگانیسم‌ها تضمین گردد. ضمناً در خود پروسه تولید موادی با منشأ حیوانی، مانند تریپسین نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. در نتیجه همواره یک خطر بالقوه برای آلودگی واکسن‌ها با عوامل خارجی وجود دارد (۲). معمولاً بیش از یک مرحله تخلیص برای رسیدن محصول به سطح خلوص مطلوب مورد نیاز است. در مرحله اول ذرات ویروسی از فراوان‌ترین آلاینده‌های موجود در استوک ناقل جدا می‌شوند. قبل از تصمیم‌گیری درباره به کار گرفتن تکنیک‌های مورد نیاز، تعریف نیازهای تخلیص ضروری است. اول، مهم است که بدانیم ویروس تا چه اندازه باید خالص شود، که این مسأله عمدتاً با در نظر گرفتن استفاده نهایی از محصول مشخص می‌شود (۳).

دومین مسأله مهم، تعیین میزان ویروس مورد نیاز است. پاسخ به این سوال مقیاس کار را تعیین می‌کند، به عبارت دیگر پاسخ به اینکه کدام یک از روش‌های تخلیص در هر مورد خاص مناسب هستند، در این زمینه تعیین‌کننده است. لازم به ذکر است که انتخاب تکنیک‌های مناسب تخلیص ویروس به شدت به ماهیت خود ویروس نیز بستگی دارد. بنابراین، مهم است که قبل از طراحی یک طرح تخلیص مناسب، تا حد امکان اطلاعات بیشتری در مورد خواص ویروس جمع‌آوری شود (۴). اندازه ناقل‌های ویروسی Nanometer (nm) ۲۰-۴۰۰ است، و به میزان قابل توجهی بزرگتر از پروتئین‌هایی هستند که اندازه کمتر از ۵ nm دارند (۵). بار خالص در pH خنثی به ترکیب سطح ویریون (Virion) بستگی دارد و برای هر نوع ناقل ویروسی و سروتایپ، بار خالص متفاوت است. بسته به بار خالص ویروسی، تکنیک‌های کروماتوگرافی تبادل آنیونی یا تبادل کاتیونی برای خالص‌سازی متفاوت خواهند بود. بار کلی ویریون تحت تأثیر pH بافر به کار رفته می‌تواند تعدیل شود. با این حال، ویروس‌ها اغلب تحت تأثیر تغییرات اسیدی هستند و تغییرات ناگهانی در pH می‌تواند منجر به غیرفعال شدن ویروس شود. اولین راهکار برای ویروس‌های داخل سلولی، لیز سلولی است. در مقیاس آزمایشگاهی، انجام چرخه‌های مکرر انجماد و ذوب رسوبات سلولی برای شکستن سلول‌ها کافی است. همراه با ذرات ناقل، مقادیر زیادی DNA سلولی، RNA و پروتئین از سلول‌ها آزاد می‌شود. به منظور کاهش ویسکوزیته لیز سلولی، که ممکن است در مراحل بعدی تخلیص مشکلاتی ایجاد کند، اسیدهای نوکلئیک اغلب به دنبال هضم توسط نوکلئازها حذف می‌شوند (۶).

در تولید واکسن، کشت سلولی معمولاً با بقایای سلولی، پروتئین‌های ناخواسته، عوامل خارجی، DNA باقیمانده، اسید نوکلئیک و بسیاری

از آلوده‌کننده‌های قابل شستشو مرتبط با فرآیند همراه است (۷). طبق تاییدیه FDA واکسن مستلزم رهایی از مواد خارجی حتی در صورت زیان می‌باشد (۸). یکی از نکات مهم در به دست آوردن عیار بالا آنتی‌بادی، استفاده از ویروس خالص شده‌ایی است که دارای حداقل میزان ذرات ناقص ویروسی باشد، زیرا ذرات ناقص با اتصال به ذرات ویروسی و بلوک کردن آنها، مانع ورود ذرات عفونی شده و پاسخ میزبان به ویروس مورد نظر و در نهایت میزان تولید آنتی‌بادی کاهش می‌یابد (۹). بنابراین استفاده از روش‌هایی که منجر به حذف ذرات ناقص ویروسی شده، باعث افزایش میزان آنتی‌بادی تولیدی خواهد شد (۱۰). انتخاب روش‌های خالص‌سازی به موارد مصرف آنتی‌بادی، حیوانی که آنتی‌بادی از آن حاصل شده، کلاس و زیر کلاس آنتی‌بادی بستگی دارد (۱۱). استراتژی‌های تخلیص می‌توانند گران باشند و ۷۰٪ از هزینه‌های کلی تولید را تشکیل دهند همچنین فشار اقتصادی و فرآیندهای تخلیص می‌تواند چالش برانگیز باشد. به طور کلی، برنامه‌ریزی یک طرح تخلیص که دارای حداقل مراحل ممکن و حداقل تغییرات در ترکیب بافر باشد، مهم است. محصول نهایی، ذخایر ویروسی خام حاوی آلاینده‌هایی هستند که از سلول‌های تولیدکننده، محیط کشت سلولی و سایر مواد اضافه شده در طول فرایند تولید ناقل به دست می‌آیند. ترکیب و فراوانی این آلاینده‌ها به انتخاب و ترتیب روش‌های مورد استفاده برای تخلیص کمک می‌کند (۱۲). روش‌های مورد استفاده شامل ته‌نشینی، سانتریفیوژ، فیلتراسیون و کروماتوگرافی می‌باشد که در این مطالعه به بررسی اجمالی و اشاره به نکاتی در اینباره پرداخته شده است.

## ۱- رسوب گذاری ویروسی

تخلیص ذرات ویروسی از طریق رسوب‌گذاری با مواد افزودنی یک روش متداول برای ساخت واکسن‌های ویروسی است (۱۳). مزیت استفاده از افزودنی‌ها این است که پس از تخلیص، رسوبات ویروسی را می‌توان به راحتی با سرعت سانتریفیوژ پایین در مدت زمان کوتاهی به دست آورد. با استفاده از روتورهای سرعت پایین، می‌توان حجم بیشتری از مایع رویی را در هر اجرا پردازش کرد (۱۴). نمک‌زدایی ویروس‌ها معمولاً با افزودن نمک‌هایی مانند سولفات آمونیوم یا فسفات کلسیم با غلظت بالا انجام می‌شود (۱۵). به طور کلی رسوب ویروس با استفاده از پلی اتیلن گلیکول، سولفات آمونیوم یا فسفات کلسیم حاصل می‌شود. J. Colombet و همکاران در یک مطالعه نشان دادند که رسوب ذرات ویروسی را می‌توان با استفاده از پلیمرهای غیریونی مانند پلی اتیلن گلیکول (PEG: polyethylene glycol) (نیز افزایش داد و نتیجه گرفت که Pegylation یک روش جایگزین معتبر، ساده و ارزان‌تر برای اولتراسانتریفیوژ برای تخلیص و خالص‌سازی ویروس‌ها ارائه دهد (۱۶).

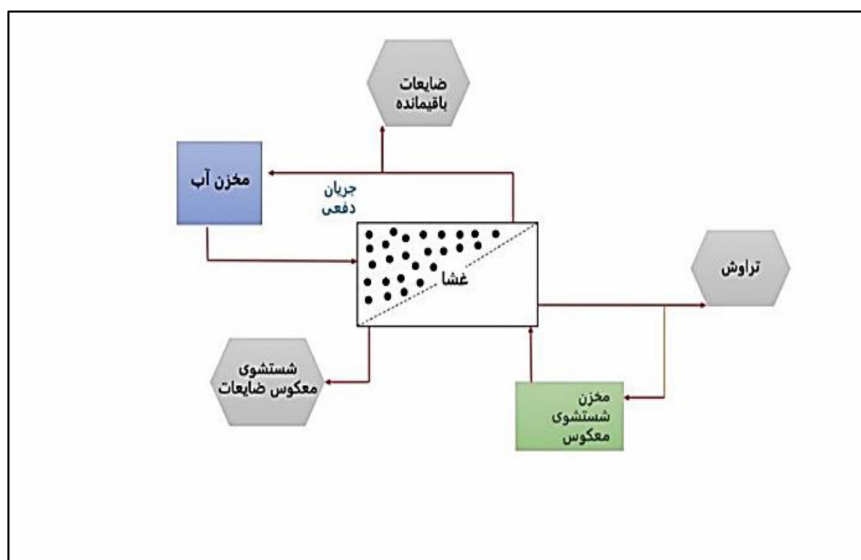
در تحقیقات بعدی اثبات گردید که پلیمرهای غیر یونی حجم زیادی را در محلول اشغال می‌کنند و حجم موجود برای ذرات ویروسی را کاهش می‌دهند و باعث تعامل بیشتر ذرات ویروسی می‌شوند (۱۷، ۱۸). پلی اتیلن گلیکول و نمک‌ها می‌توانند با تغییر شرایط فیزیکی شیمیایی سوسپانسیون منجر به تخلیص ویروس می‌گردند زیرا حلالیت نمک باعث ته نشینی می‌شود. اخیراً Torrii و همکاران با مقایسه روش‌های مختلف رسوب‌دهی ویروس‌ها با استفاده از پلی اتیلن گلیکول برای بازیابی

موثر داشته است که می‌توان برای مثال به ویروس تب برفکی و تخلیص آن با استفاده دوفازی نمک- پلی اتیلن گلیکول اشاره نمود که کارایی بالای ۷۰ درصد گزارش شده است (۱۴).

## ۲- فیلتراسیون

فیلتراسیون غشایی یک فرآیند جداسازی با استفاده از غشای نیمه تراوا است و اساس آن فشار هیدرولیک دیفرانسیل و عبور آب از یک سمت غشا به سمت دیگر می‌باشد (شکل ۱). روش‌های مورد استفاده برای فیلتراسیون غشایی شامل میکروفیلتراسیون (MF: Microfiltration)، اولترافیلتراسیون (UF: Ultrafiltration)، نانوفیلتراسیون (NF: Nanofiltration) و اسمز معکوس (RO: Reverse osmosis) می‌باشد.

ویروس‌های پاتوژن انسانی و گیاهی دریافتند که بهره‌وری روش‌ها بسته به شرایط انکوباسیون، غلظت ویروس و نوع ویروس متغیر است (۱۹). Staggemeier و همکاران مشخص نمودند که جداسازی آدنوویروس انسانی در رسوب‌دهی با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول یکی از موثرترین روش‌ها در تخلیص ویروس‌ها است (۲۱). از مزایای این روش می‌توان به سادگی و هزینه کم و کارایی آن اشاره نمود اما شایان ذکر است که این روش نیاز به دانش مکانیسم میانکنش پلیمرها و نمک‌ها با پروتئین‌های مورد مطالعه دارد و روشی زمان‌بر است. همچنین در این روش ممکن است مقداری از ویروس‌ها به دلیل اتصال به دیواره لوله یا رسوب غیرقابل برگشت از بین بروند (۱۶). این روش در صنعت واکسن‌سازی یکی از روش‌های موثر جهت جداسازی ویروس از مابقی اجزاء کارایی



شکل ۱- تصویر شماتیک عملکرد فیلتر غشایی. فیلتر غشایی به عنوان یک فاز عمل می‌کند که اجزای جداسازی نمونه با سرعت‌های متفاوت از آن عبور می‌کنند. در این فرآیند، جزئی از نمونه که به عنوان تراوش شناخته می‌شود، از غشا عبور می‌کند، در حالی که بخش دیگر که قادر به عبور از غشا نیست، در قسمت ضایعات باقی می‌ماند که براساس هدف جداسازی، هرکدام از آن‌ها می‌توانند به منزله‌ی محصول در نظر گرفته شوند.

جدول ۱ - اندازه منافذ غشا و میزان فشارهای حداکثری قابل اعمال (۲۰).

نوع فیلتر	فشار	سایز (μm)
میکروفیلتراسیون	۳۰-۵۰	۰/۱-۱
اولترافیلتراسیون*	۳۰-۵۰	۰/۱-۰/۰۱
نانوفیلتراسیون	۵۰۰-۱۰۰۰	۰/۰۰۱-۰/۰۰۱
اسمز معکوس	۱۰۰۰-۵۰۰۰	۰/۰۰۱-۰/۰۰۱

\*در اولترافیلتراسیون ویروس‌ها معمولاً بجای واحد اندازه (میکرومتر) از کیلو دالتون استفاده می‌شود.

گرفتگی کاست به‌مراه کاهش راندمان تغلیظ-جداسازی از معایب این روش است (۳۰). در تحقیقات توسط Arunkumar نشان داده شد که اولترافیلتراسیون به تغلیظ مطلوبی از ویروس دست می‌یابد (۲۹). Ikner و همکارانش در مطالعه‌ای جامع به مقایسه کارایی روش‌های اولترا فیلتراسیون در تغلیظ و بازیابی ویروس‌های بیماری‌زای انسانی همچون آنفولانزا و HIV پرداختند و دریافتند درحالی‌که اکثر فیلترهای موجود کارایی بالایی در حفظ ویروس نشان داده‌اند، روش‌های شستشو و تغلیظ مجدد ویروس به دلیل تنوع بیولوژیکی ویروس‌های موجود در محلول‌ها با درجات متفاوتی از موفقیت مواجه شده‌اند (۳۱). Liu و همکاران با استفاده از سیستمی از ترکیب فیبرهای توخالی و اولترافیلتراسیون نتایج موفق‌تری را در زمینه جداسازی همزمان ویروس‌ها به دست آوردند و نشان دادند که این روش دارای کارایی بیشتر نسبت به سایر روش‌های فیلتراسیون است (۳۲). تغلیظ ویروس‌ها توسط اولترافیلتراسیون عملاً مستقل از خواص شیمیایی و ساختار ذرات ویروس است. از آنجایی که اندازه ویروس‌ها از ده‌ها تا چند صد نانومتر متغیر است، معمولاً چندین مرتبه بزرگ‌تر از بزرگ‌ترین مجتمع‌های پروتئینی هستند (۳۳). بنابراین، بیشتر ویروس‌ها به‌طور بی‌نظیری در پشت غشاهای ۱۰۰ کیلو دالتونی باقی می‌مانند. مشخصات دقیق غشاهای اولترافیلتراسیون ایده‌آل به هدف از اولترافیلتراسیون و کاربرد(های) بعدی بستگی دارد. کروماتوگرافی جهت تبادل بافر می‌تواند از کاست‌هایی با سایزهای کیلو دالتونی مختلف استفاده کرد (۳۴،۳۵،۳۶).

اولترافیلتراسیون در مورد جداسازی و تغلیظ ویروس‌های متعددی که کاربرد در تهیه واکسن دارند در عملیات پایین دستی مورد استفاده قرار گرفته است. برای مثال ویروس آنفولانزا یکی مطرح‌ترین واکسن‌ها می‌باشد که در تهیه انبوه ویروس تغلیظ شده از اولترافیلتراسیون در هر دو حوزه انسانی و طیور استفاده شده است (۳۷،۳۸). تکنولوژی فوق در مورد ویروس‌های دیگری نظیر ویروس هپاتیت (۳۹)، در تهیه واکسن غیرفعال کووید (۴۰)، واکسن پولیو (۴۱) و واکسن نوترکیب سرخچه (۴۲) مورد استفاده قرار گرفته است.

### ۳-۲ نانوفیلتراسیون در اسمز معکوس

نانوفیلتراسیون یک فرآیند تحت فشار است. غشای نانوفیلتراسیون به شدت مستعد رسوب لایه‌ها از یون‌های چند ظرفیتی و مواد آلی است که باعث کاهش شار نفوذ می‌شود (۴۳). اسمز معکوس بر خلاف میکروفیلتراسیون، اولترافیلتراسیون و نانوفیلتراسیون که بر اساس غربال‌گری عمل کرده، بر مبنای اصل انتشار عمل می‌کنند (۴۴). Arola و همکاران در مطالعه‌ای جامع به بررسی روش‌های ویروس‌زدایی بر اساس نانوفیلتراسیون پرداختند و مشخص گردید که فرآیندهای الکترودیالیز یا نانوفیلتراسیون اسمز معکوس برای جداسازی ویروس‌ها موثر می‌باشند. با ترکیب مناسب این فرآیندها می‌تواند یک استراتژی کارآمد برای مدیریت کنسانتره غشایی را اجرا کرد و حتی حضور ویروس‌ها در فاضلاب را به صفر رساند (۴۵). از مزایای این روش می‌توان به عدم نیاز به مواد شیمیایی و کاهش مصرف انرژی، و حفظ کیفیت آب با حذف ناخالصی‌ها اشاره نمود. همچنین کاهش راندمان جداسازی، احتمال

مکانیسم حذف ویروس با استفاده از لگاریتم میزان احیا (LRV: log reduction value) تجزیه و تحلیل و کمی‌سازی می‌شود. LRV یک اصطلاح ریاضی است که برای نشان دادن تعداد نسبی ذرات ویروس حذف شده پس از تیمار استفاده می‌شود (۱۸). در جدول ۱ اندازه منافذ غشاء و تحمل فشار در سیستم‌های مختلف فیلتراسیون بیان شده است.

### ۱-۲ میکروفیلتراسیون

میکروفیلتراسیون به طور گسترده برای خلوص ذخایر ناقل ویروسی به تنهایی یا پس از یک مرحله سانتریفیوژ استفاده می‌شود. ذخایر ویروسی از غشایی عبور می‌کنند که بقایای سلولی را حفظ می‌کند و در عین حال امکان بازیابی ذرات ویروس در بخش نفوذی سیستم را فراهم می‌کند (۲۱، ۲۲). در مطالعه‌ای توسط Herath و همکاران بر روی حذف کولیفاژهای MS۲، DNA Qβ، DNA T۴ و DNA کولیفاژ T۴ با استفاده از غشاهای میکروفیلتراسیون در محلول‌های مختلف نشان داده شد که میزان دفع همه ویروس‌ها در pH پایین‌تر از pH بالاتر بیشتر بود که به بار الکترواستاتیکی و نقاط ایزوالکتریک آن‌ها نسبت داده شد (۲۳). Zho و همکاران نشان دادند که روش ترکیبی میکروفیلتراسیون و انعقاد آهن (Iron coagulation) در تصفیه آب با استفاده از باکتریوفاژ MS۲ (قطر ۲۵ نانومتر) به عنوان یک ویروس ردیاب بسیار موثر بوده است (۲۴). در پژوهشی دیگر نشان داده شد که حذف ویروس‌ها از طریق غشاهای میکروفیلتراسیون در ترکیب با یک پلیمر کاتیونی می‌تواند در ضد عفونی سازی آب آشامیدنی موثر باشد (۲۵). یافته‌های آنها در تایید نتایج مطالعه Matsushita و همکاران در اثرگذاری این روش نسبتاً ارزان در ویروس‌زدایی آب بود (۲۸). از مزایای این روش می‌توان به کارایی آن، قابلیت تطبیق آن برای ویروس‌های مختلف، و سرعت آن اشاره نمود. همچنین کاهش حجم نمونه، احتمال انسداد غشا و احتمال آلودگی با میکروارگانیسم‌های دیگر از معایب این روش است (۲۴).

### ۲-۲ اولترافیلتراسیون

اولترافیلتراسیون روشی انتخابی برای تغلیظ ذرات ویروسی در مقیاس‌های بزرگ است، زیرا امکان کاهش حجم ذخایر ویروسی را در زمان نسبتاً کوتاهی فراهم می‌کند که تا حدودی در این فرایند خالص‌سازی کمی به همراه دارد (۲۶، ۲۷). اندازه منافذ در اولترافیلتراسیون ویروس‌ها در تغلیظ ویروس‌ها بر اساس کیلودالتون بیان می‌شود و کاست‌های مورد استفاده نیز بر همین مقیاس در انواع آزمایشگاهی و صنعتی تولید و عرضه می‌گردند (۲۸). پنج عامل در فیلتراسیون ویروس، شامل جذب، غربالگری، بار، غلظت مواد آلی کوچک و غلظت مواد آلی بزرگ مؤثر می‌باشند. همچنین عامل دیگری که می‌تواند بر غلظت ویروس در اولترافیلتراسیون تأثیرگذار باشد، فشار غشایی (TMP: Trans-membrane pressure) است (۲۹). Wu و همکاران در تحقیقی نشان دادند که افزایش فشار غشایی باعث کاهش احتباس ویروس به دلیل بزرگ شدن غیر طبیعی منافذ تحت فشار می‌شود (۳۰). از مزایای این روش می‌توان به سرعت و سادگی آن، قابلیت تطبیق آن برای ویروس‌های مختلف، عدم نیاز به مواد شیمیایی خاص و بازیافت بالای ویروس در آن اشاره نمود. همچنین کاهش حجم نمونه، همانند دیگر سیستم‌های غشایی احتمال



دریابی ارزیابی کردند و دریافتند که غشاهای سلولزی و پلی اتر سولفون (Polyethersulfone) انتخاب بهتری برای جمع‌آوری ویروس‌ها به شمار می‌روند (۴۹). Lasareishvili در پژوهشی دیگر TFF را در مدلی برای تخلیص ویروس‌ها مورد استفاده قرار دادند، مدل پیشنهادی آنها توانست طراحی فرآیند تغلیظ نمونه را هدایت کند و به عنوان چارچوبی برای کمی‌سازی و مقایسه بین آزمایشگاهی داده‌های تجربی در مورد بازیابی ویروس عمل نماید (۵۰). از مزایای این روش می‌توان به قابلیت جداسازی ذرات ریز و حفظ ویروس و قابلیت شستشو و استفاده مجدد غشاهای TFF اشاره نمود در حالی که هزینه‌ها، نیاز به تخصص، کاهش حجم نمونه و کاهش راندمان جداسازی از جمله عوامل قابل تامل هستند.

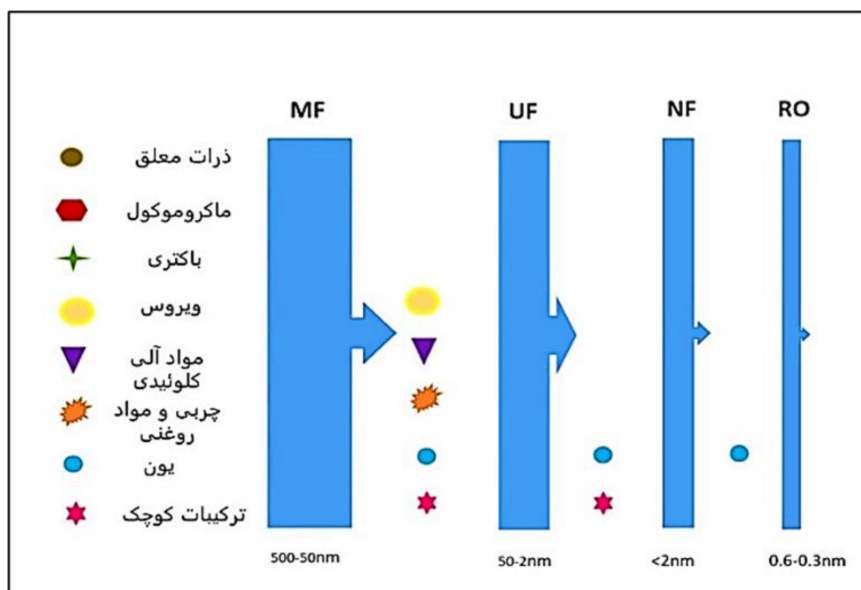
### ۳- کروماتوگرافی

کروماتوگرافی تکنیک عمده‌ای است که برای استخراج و تخلیص ماکرومولکول‌های حیاتی کاربرد زیادی دارد (۵۱). روماتوگرافی روشی متکی بر حرکت نسبی دو فاز است، یک فاز ساکن نامیده می‌شود و دیگری را فاز متحرک می‌نامند (۵۲). کروماتوگرافی براساس تعامل بین ویروس هدف و ماتریکس ستون کروماتوگرافی انجام می‌شود. عملکرد

گرفتنی غشا و نیاز به تخصص از معایب این روش است (۳۷).

### ۴-۲ فیلتراسیون جریان مماسی

فیلتراسیون با جریان متقاطع / مماسی (TFF: Tangential flow filtration) نوعی از فرآیند فیلتراسیون است که در آن جریان مایع از روی غشاء یک فیلتر عبور کرده و جداسازی در آن صورت می‌گیرد. اساس این روش جداسازی اجزا از هم برپایه وزن مولکولی و تغلیظ مداوم و حذف ذرات اضافی می‌باشد (شکل ۲). اما امروزه با معرفی فیلتراسیون با جریان مماسی که روش جایگزین مناسبی در تولید واکسن‌های ویروسی همچون آنفولانزا و آبله است می‌توان کارایی واکسن تهیه شده را افزایش داد (۴۶). Hein و همکاران نشان دادند که این روش زمان جداسازی سریع و جریان مماسی مداوم را در سراسر فیلتر غشایی فراهم می‌کند (۴۷). Grzenia و همکاران نشان دادند که به دلیل متقاطع بودن جریان نسبت به غشاء، مواد به دام افتاده در پشت غشاء دائماً شسته شده و در فیلتر لایه ضخیمی ایجاد نمی‌شود، همچنین با توجه به تنظیم سرعت و نوع فیلتر امکان جداسازی انتخابی اجزای نمونه وجود دارد (۴۸، ۴۹). Cai و همکاران در تحقیقی دو مقیاس مختلف از سیستم‌های TFF را برای تخلیص و جداسازی ویروس‌ها از آب‌های



شکل ۲ - تصویر شماتیک عملکرد انواع فیلتراسیون غشایی. فیلتراسیون غشایی از انواع فیلتراسیون‌های مکانیکی است که فرآیند غالب حذف در آن، بر پایه تفاوت در اندازه قطر مواد می‌باشد. میکرو فیلتراسیون اجسام را در ابعاد بین ۰/۵-۵  $\mu\text{m}$  حذف می‌کند. این غشاها از عبور ذرات معلق و کلونیدی بزرگ، باکتری‌ها و انواع متنوعی از میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌کنند. اولترافیلتراسیون به منظور حذف ذرات در محدوده ۰/۱-۰/۵  $\mu\text{m}$  استفاده می‌شود در این فرآیند ذراتی چون کلونیده‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و ترکیبات آلی با وزن مولکولی بالا حذف می‌گردند. نانو فیلتراسیون نوع ویژه‌ای از فیلتراسیون می‌باشد که ذرات در حدود یک nm را فیلتر می‌کند؛ بنابراین عملکرد نانوفیلتراسیون بین دو سیستم اسمز معکوس و اولترافیلتراسیون قرار می‌گیرد. عملکرد نانوفیلتراسیون شامل کاهش نمک‌های محلول و کل املاح محلول در آب، جداسازی اجسام ارگانیک از غیر ارگانیک می‌باشد بنابراین احتمال رسوب میکروارگانیسم‌های زنده در این غشاها وجود دارد. در اسمز معکوس آب با فشار از میان غشایی عبور داده می‌شود که مولکول‌های بسیار کوچک، رنگ، سولفات‌ها، نیترات، سدیم و سایر یون‌ها را حذف می‌کند.

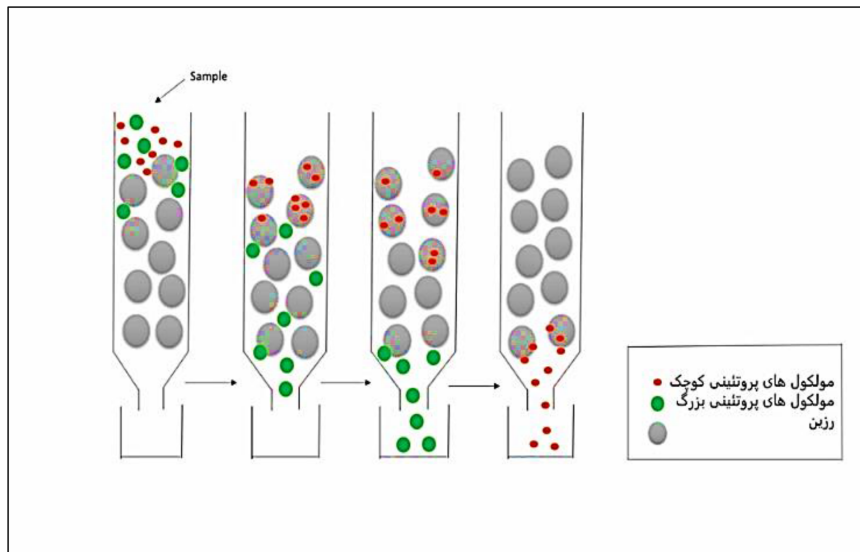
شکل ۳ نشان داده شده است فاز ثابت در این کروماتوگرافی از بستر ذرات کروی همانند سیلیس یا ژل آگارز است (۵۷). این ذرات ویژگی حذف اندازه‌ای دارند که باعث جداسازی اجزای وارد شده به ستون که قابلیت نفوذ به منافذ مفاظ ثابت را دارند می‌شود (۵۸). عامل عمده‌ای که در کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون مطرح است، ایجاد جریانی یکنواخت با سرعت مناسب در ستون است (۵۹). Al-Ghobashy و همکاران در پژوهشی به انتخاب دقیق محیط کروماتوگرافی در اثرگذاری آن تاکید نمودند زیرا رزین‌هایی با اندازه منافذی در محدوده اندازه ویروس‌هایی همچون Ebola، Hepatitis B و Zika ممکن است منجر به گیر افتادن ویروس در داخل منافذ و در نتیجه بازدهی کم این نوع کروماتوگرافی شود (۵۵). از مزایای این روش قابلیت بالای جداسازی ویروس‌ها، حفظ بالای ویروس و عملکرد ملایم بدون استفاده از مواد شیمیایی خاص و کاملاً سازگار با حوزه بیولوژیک می‌باشد این روش در حال حاضر در صنعت واکسن‌های انسانی مورد استفاده می‌باشد (۵۳).

در همین زمینه Farkas و همکارانش در یک روش مبتنی بر فیلتراسیون ژل برای تخلیص ذرات عفونی Rotavirus برای کاربردهای تحقیقات محیطی پرداختند و مشخص گردید کروماتوگرافی حذف اندازه، در خالص‌سازی Rotavirus‌ها در تعیین کمیت قوی‌تر و دقیق‌تر اندازه ویروس، بار سطحی و غلظت ذرات موثر بوده است (۶۰). در تحقیقی دیگر توسط Vajda و همکارانش قابلیت‌های کروماتوگرافی حذف اندازه در جداسازی ویروس‌های آنفلوآنزای سویه‌های مختلف همانند H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>v ۵۲۵۸، PR H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> ۳۴/۸، و H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> ۶۸/۲/Aichi Inffluenza بررسی شد و نتایج نشان داد که کروماتوگرافی حذف اندازه هم‌اگلوتیناسیون ویروس‌ها را به خصوص در تیمار با Triton X-۱۰۰ القا می‌کند (۵۷).

جداسازی کروماتوگرافی می‌تواند براساس بار، اندازه، آگریزی و افینیتی طبقه‌بندی شود. جداسازی‌های مبتنی بر این روش بسیار تکرارپذیر هستند و منجر به تولید یک محصول ویروسی ثابت در تکرارهای متوالی می‌شود و اثرات جانبی در تغییرات کلی فرآیند را به حداقل می‌رسانند (۵۳). بهترین نتایج خالص‌سازی با انتخاب و ترکیب مراحل تکمیلی مناسب حاصل می‌شود، به عنوان مثال یک مرحله بر اساس بار ویروس و مرحله دیگر بر اساس اندازه ویروس یا آگریزی میسر است. سطح خلوص به دست آمده توسط کروماتوگرافی به یک میزان و گاهی بالاتر از سطح خلوص حاصل توسط اولتراستریفیوژ است. از آنجایی که بسیاری از بافرهای شستشو در کروماتوگرافی برای آزمایش بر روی موجود زنده مناسب نیستند، ممکن است مراحل تخلیص اضافی مانند دیالیز یا اولترا/دیفیلتراسیون ضروری باشد (۵۴). تکنیک‌های متعددی از کروماتوگرافی برای خالص‌سازی ویروس‌ها معرفی شده است. این تکنیک‌ها را می‌توان به طور کلی به کروماتوگرافی تبادل یونی (Ion exchange chromatography)، کروماتوگرافی میل ترکیبی (Affinity chromatography)، کروماتوگرافی برهمکنش آگریز (Hydrophobic interaction chromatography) و کروماتوگرافی حذف اندازه (exclusion liquid chromatography) طبقه‌بندی کرد (۵۵).

### ۱-۳ کروماتوگرافی حذف اندازه

در ژل فیلتراسیون که به عنوان نوعی کروماتوگرافی حذف اندازه (exclusion chromatography) یاد می‌شود در تخلیص ویروس استفاده می‌گردد. ژل کروماتوگرافی یکی از چندین روش انتخابی برای خالص‌سازی ویروس‌ها و اجزاء آن‌ها استفاده می‌شود (۵۶). همانطور که در



شکل ۳ - تصویر عملکرد کروماتوگرافی حذف اندازه. مولکول‌های بزرگ نظیر ویروس‌ها در مقایسه با مولکول‌های کوچک نظیر پروتئین‌ها و دیگر موارد محلول هم‌زمان از بستر متخلخل فاز ثابت عبور می‌کنند و در این حرکت ذرات بر اساس وزن و شکل از بزرگ به کوچک در فرایند شستشو از هم جدا می‌شوند. با توجه به شکل مولکول‌های بزرگتر زودتر از بقیه اجزاء از ستون کروماتوگرافی خارج می‌شوند.

(۶۳). Grönberg نشان داد که در این روش خالص سازی در pH ۷/۴ بسیار متداول است زیرا ناقل‌های ویروسی در شرایط فیزیولوژیکی پایداری هستند (۶۴). Sviben و همکارانش در تحقیقی بر روی کارایی این روش نشان دادند که اولین ورودی ویروس می‌تواند اتصال کووالانسی بیش از حد را نشان دهد که این اتصال مانع اتصال سایر ذرات ویروس به غشاء و کاهش ذرات ویروس می‌شود (۶۵).

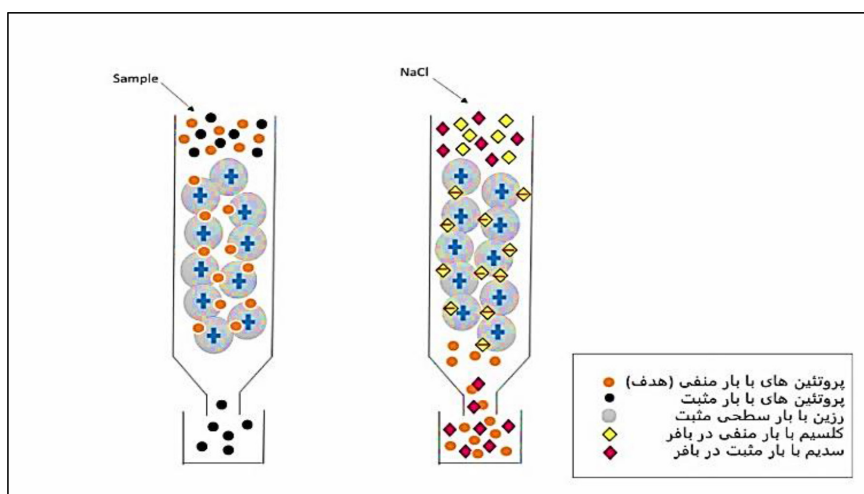
Zhou و همکاران در گزارشی استفاده از کروماتوگرافی تبادل یونی برای تخلیص آنتی‌ژن سطحی ویروس Hepatitis B از رده سلولی تخمدان همستر چینی را بیان نمودند که حضور PEG در جداسازی و بازیابی فرم گلیکوپروتئین دست نخورده CHO-HBsAg را تسهیل می‌کند و موتاژ آن‌ها را به ذرات ویروس مانند مناسب، که هم ویژگی‌های مهم و هم پیش‌نیاز ایمنی‌زایی آن‌ها هستند، افزایش می‌دهد (۶۶). در سال‌های اخیر Adriaenssens و همکارانش کروماتوگرافی تبادل آنیونی یکپارچه CIM (Cation-exchange chromatography with integrated microfluidic manipulation) به عنوان یک جایگزین مفید بجای تخلیص گرادیان CsCl ذرات باکتیوفاژ معرفی نمودند و نشان دادند که این روش دارای مزیت‌های بسیاری از جمله زمان و هزینه کمتر نسبت به روش تخلیص گرادینی است (۶۷). در همین زمینه Sheilds و همکاران به بررسی کارایی جداسازی و شناسایی ویروس‌های T1 و X147 با استفاده از DEAE-Sepharose نمودند. آنها نشان دادند که همه ویروس‌های مورد مطالعه در حضور ۴ مولار NaCl به اکتیل سفاروز جذب شدند. ویروس‌هایی که به دنبال کاهش غلظت NaCl با بیشترین سرعت شسته شدند، ضعیف‌ترین برهمکنش‌های آبریز را با ستون داشتند. این ویروس‌ها شامل pX174، CB4 و E1 بودند. ویروس‌هایی که پس از کاهش غلظت NaCl با حداقل سرعت از ستون‌ها شسته شدند،

سفاروز سی ال (Sepharose CL, Cytiva) بستری از آگارز گرانولی است که در این حوزه مطرح می‌باشد. بستری ژل فیلتراسیون سفاروز محدوده تفکیک گسترده‌ای داشته (۱۰,۰۰۰ - ۴۰,۰۰۰,۰۰۰ Mr(modulation) ratio و محدودیت بالایی برای جداسازی بیومولکول‌ها را ارائه می‌دهند. این نوع بستر در ژل فیلتراسیون می‌تواند در مراحل اولیه فرآیند تخلیص استفاده شود (۶۱). Yang و همکاران در تحقیقی بر روی ویروس FMDV نشان دادند که مزیت اصلی این روش این است که می‌توان حجم‌های نمونه تا ۳۰٪ حجم کل ستون را در هر بار تخلیص بارگذاری کرد (۶۲).

### ۲-۳ کروماتوگرافی تبادل یونی

کروماتوگرافی تبادل یونی یکی از روش‌های کروماتوگرافی مایع است که برای جداسازی و خالص‌سازی مولکول‌های باردار همانند ویروس‌ها بر اساس میانگینش یونی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ویروس‌های با بار مثبت به لیگندهای با بار منفی مانند گروه‌های کربوکسی متیل (CM) یا سولفات (S) بر روی فاز ثابت متصل می‌شوند. در مقابل، ویروس‌های با بار منفی با لیگندهایی دارای بار مثبت مانند دی‌اتیل آمینو اتیل (Diethylaminoethyl) یا گروه‌های آمونیوم چهارتایی (Q) متصل می‌شوند. ویروس‌ها نه تنها با افزایش قدرت یونی (غلظت نمک) بافر از لیگندهای مورد اشاره شسته شده، بلکه می‌توانند با تغییر pH نیز این جدا شدن اتفاق افتد (شکل ۴).

Fekete و همکاران در تحقیقی بر روی ویروس‌های مختلف از قبیل آنفولانزا نشان دادند که کروماتوگرافی هیدروکسی آپاتیت جزو تکنیک‌های تبادل یونی به صورت مخلوط است زیرا رزین‌ها دارای بار مثبت (یون‌های کلسیم) و گروه‌های فسفات دارای بار منفی هستند



شکل ۴ - تصویر شماتیک عملکرد کروماتوگرافی تبادل یونی. رزین بار دار (اینجا بار مثبت) به بیومولکول‌های با بار مخالف (منفی) اتصال یونی برقرار می‌کنند. بعد از اتمام شستشو ستون، فاز ثابت ستون در معرض نمک با قدرت بالای یونی قرار گرفته و یون موافق بومولکول جایگزین بومولکول زیستی می‌شود و ملکول مورد نظر از ستون خارج و جمع‌آوری می‌شود. شکل بالا نشان‌دهنده کروماتوگرافی تبادل آنیونی است.



تخلیص ویروس‌ها نیز کاربرد دارد (۷۱، ۷۲). Weigel و همکاران در تحقیقی در سال ۲۰۱۹ به بررسی امکان جداسازی ویروس‌های Influenza A و B به استفاده از روش کروماتوگرافی برهمکنش هیدروفوبیک پرداختند. در تحقیق آنها یک فرآیند کروماتوگرافی دو مرحله‌ای جدید برای خالص‌سازی ویروس Influenza A و B با استفاده از کروماتوگرافی برهمکنش آبرگیز ابداع گردید که به بازیابی بالای ویروس (۹۶٪)، آلودگی DNA کم (۱،۳٪) و مطابق با استانداردهای فارماکوپیه اروپا منجر شد (۶۹). در تحقیقی دیگر توسط Li و همکاران از این استراتژی برای جداسازی ویروس‌های غیرفعال شده انسانی استفاده شد. در روش آنها یک طرح خالص‌سازی جدید با استفاده از کروماتوگرافی برهمکنش آبرگیز به طور موثر ویروس تب برفکی غیرفعال شده (FMDV: foot-and-mouth disease virus) را از مایع رویی خام جدا می‌کرد. این فرآیند در عرض ۳،۵ ساعت به بازیابی بالا (۷۵٪) و خالص‌سازی قابل توجه (۲۴۷ برابر) می‌رسید. ویروس تب برفکی غیرفعال و خالص شده، خلوص بالای ۹۸٪ را با حداقل آلودگی DNA سلول میزبان نشان می‌داد و البته تجزیه و تحلیل ساختاری یکپارچگی ویروس خالص شده را با شکل کروی و اندازه ذرات ۲۸ نانومتر تایید کرد. نتیجه‌گیری آنها نشان داد که این روش یک رویکرد امیدوارکننده برای تخلیص ویروس مذکور ارائه می‌دهد (۷۰).

### ۴-۳ کروماتوگرافی تمایلی

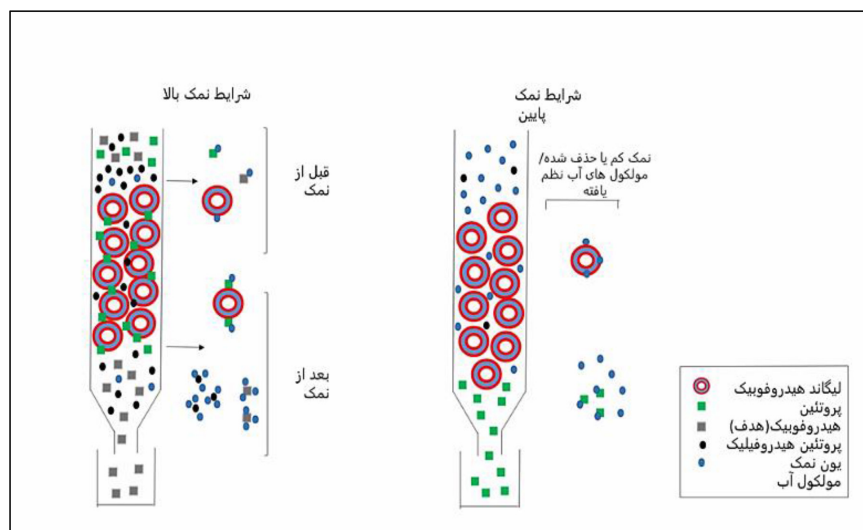
کروماتوگرافی میل ترکیبی (Affinity chromatography) یا تمایلی بر

قوی‌ترین برهمکنش‌های آبرگیز را با ستون داشتند و شامل MS۲، f۲ و E۵ بودند (۶۸). از مزایای این روش باید به قابلیت جداسازی ویروس‌ها بر اساس بار الکتریکی، عملکرد ملایم و قابلیت شستشو و استفاده مجدد از رزین‌های تبادل یونی اشاره نمود (۶۷).

### ۳-۳ کروماتوگرافی برهم کنش هیدروفوبیک

کروماتوگرافی برهمکنش هیدروفوبیک (Hydrophobic interaction chromatography) توسط برهمکنش نقاط آبرگیز روی مولکول هدف با لیگاند‌های آبرگیز بر روی فاز ثابت انجام و کنترل می‌شود. همانطور که در (شکل ۵) توضیح داده شده است. در شرایط نمک بالا، نمک در ساختار آب حلالیت پروتئین را کاهش می‌دهد و تعامل آبرگیز بین مولکول زیستی و لیگاند را تسهیل می‌کند و در نمک کم، برهمکنش آبرگیز مولکول و لیگاند با شستشوی مولکول‌ها با بازسازی ساختار آب و حلالیت پروتئین به حداقل می‌رسد (۶۹). این پدیده باعث تجمع نقاط آبرگیز در سطح لیگاند می‌شود. تخلیص مولکول هدف با کاهش شرایط نمکی و از بین بردن مکانیسم برهمکنش آبرگیز در سطح لیگاند حاصل می‌شود. از مزایای این روش قابلیت جداسازی ویروس‌ها بر اساس ویژگی‌های هیدروفوبیک، قابلیت شستشو و استفاده مجدد از رزین‌های HIC و نیز قابلیت حفظ ویروس است. همچنین معایب این روش شامل گران و زمان بر بودن و کاهش حجم نمونه است (۷۰).

کروماتوگرافی برهمکنش هیدروفوبیک اغلب در بیولوژی برای خالص‌سازی پروتئین‌ها و حذف ناخالصی‌ها استفاده می‌شود و برای



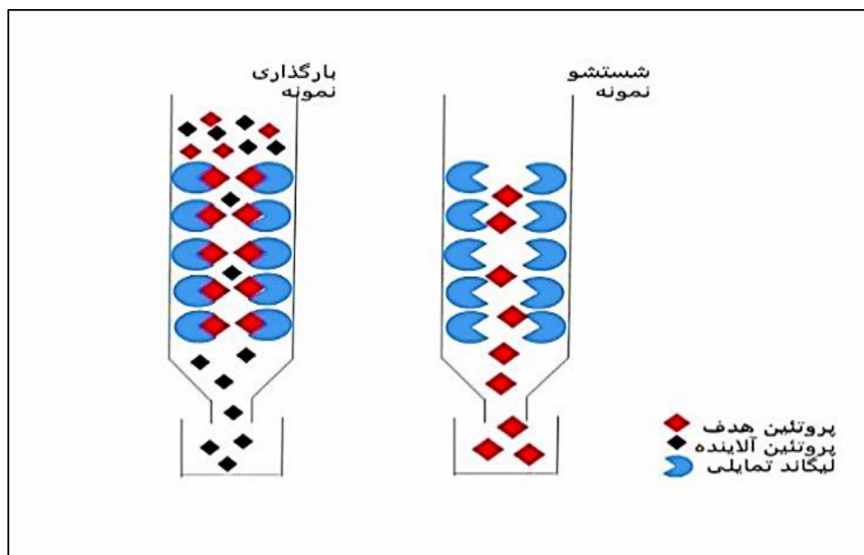
شکل ۵ - تصویر شماتیک عملکرد کروماتوگرافی برهمکنش هیدروفوبیک. پروتئین‌ها براساس تفاوت در میزان هیدروفوبیسته (آبرگیزی) سطحشان از یکدیگر جدا می‌شوند، بدین‌صورت که میانگشت پذیر بین نواحی غیرقطبی در سطح پروتئین و لیگاند‌های هیدروفوب تثبیت شده بر روی بستر ستون کروماتوگرافی شکل می‌گیرد. در شرایط نمک بالا، نمک در ساختار آب حلالیت پروتئین را کاهش می‌دهد و تعامل آبرگیز بین مولکول زیستی و لیگاند را تسهیل می‌کند. در شرایط نمک پایین برهمکنش هیدروفوبی لیگاند و حلالیت پروتئین‌ها به وسیله بازسازی ساختار آب و بازگشت حلالیت پروتئین به حداقل می‌رسد.

Optiz و همکاران در مطالعه‌ای به ایجاد یک مرحله "گیر انداختن" برای خالص‌سازی ویروس‌های Influenza مشتق از کشت سلولی با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی لکتین پرداختند. در این مطالعه از ویروس Influenza انسانی ۳۴/۸/A/Puerto Rico تولید شده در سلول‌های کلیه سگ به عنوان مدل استفاده شد. این مطالعه نشان داد که الیگوساکاریدهای گلیکوپروتئین‌های ویروسی هم‌گلوکوتینین و نورآمینیداز می‌توانند به عنوان لیگاندهای میل ترکیبی با استفاده از لکتین‌های خاص مورد هدف قرار گیرند. تجزیه و تحلیل SDS-PAGE نشان داد که اکثر پروتئین‌های شسته شده منشاء ویروسی دارند و همچنین تکرارپذیری و پایداری ستون در حداکثر ۲۵ اجرا با استفاده از شش دسته محصول ویروس مختلف تأیید شد (۷۵). کروماتوگرافی میل ترکیبی دارای قابلیت جداسازی ویروس‌ها با دقت بالا، حفظ ویروس و قابلیت تخلیظ آن است و از معایب آن به گرانی و بسیار تخصصی بودن می‌توان اشاره کرد (۷۰).

#### ۴- سانتریفیوژ

سانتریفیوژ روشی برای جداسازی مولکول‌هایی با چگالی متفاوت و یکی از مفیدترین و پرکاربردترین تکنیک‌ها در آزمایشگاه بیولوژی مولکولی است. در بیولوژی ذرات ویروس می‌شود با سرعت بالا و نیروی گریز از مرکز قوی می‌توانند باعث جدا شدن ذرات غیرعفونی شود (۷۶) و

اساس ایجاد شرایط برای برهمکنش‌های برگشت‌پذیر بین لیگاند ثابت و یک بیومولکول رخ می‌دهد. در تحقیقات چند نوع لیگاند مهم که برای خالص‌سازی ویروس استفاده شده‌اند که عبارتند از لیگاند میل ترکیبی فلز، سولفات هپارین و لیگاند لکتین (۵۲). کروماتوگرافی میل ترکیبی دومین روش خالص‌سازی کروماتوگرافی پرکاربرد برای وکتورهای ویروسی است. انتخابی‌ترین روش کروماتوگرافی میل ترکیبی، کروماتوگرافی ایمونوآفینیتی است که بر تعامل خاص بین آنتی بادی‌های ثابت و آنتی ژن‌های سطحی ویروس وابسته است (۷۴،۷۳،۵۴). Reiter و همکاران به توصیف یک روش خالص‌سازی کروماتوگرافی تمایلی هپارین دو مرحله‌ای را برای جدا کردن ذرات مانند ویروس‌های پوشش‌دار از سایر وزیکول‌های خارج سلولی پرداختند. اولین مرحله شامل جمع‌آوری و جداسازی ذرات ویروس مانند و وزیکول‌های خارج سلولی از ناخالصی‌های کوچکتر در حالت جریان بود. سپس جریان جمع‌آوری شده با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی هپارین خالص‌تر می‌شد. خصوصیات ذرات، به ویژه توزیع اندازه ذرات و داده‌های طیف‌سنجی جرمی، نشان می‌داد که وزیکول‌های خارج سلولی بر بخش جریان غالب هستند و ذرات شبه ویروسی (Virus-Like Particles: VLPs) در اوج شستشو جمع می‌شوند. روش توسعه یافته در تحقیق آنها به راحتی امکان انجام سریع جداسازی ویروس و ذرات ویروس مانند را در عرض مدتی کوتاه فراهم می‌نمود (۵۲).



شکل ۶ - تصویر شماتیک عملکرد کروماتوگرافی تمایلی. مولکول هدف در نمونه برای اتصال به لیگاند به مولکول مکمل خود متصل می‌شود. این لیگاندها با پیوند کوالانسی قوی به ماتریکس نامحلول و جامد (معمولاً پلیمری مثل آگارز یا پلی‌آکریل‌آمید) متصل می‌شوند. بیومولکول هدف با استفاده از مکانیسم برهمکنش‌هایی که به صورت خاص روی لیگاند طراحی شده جذب می‌شود. تیمار لیگاند با مولکول رقابتی، تغییر در pH یا قدرت یونی باعث جذب می‌شود. پس از خروج مولکول‌های غیرهدف، محلول شوینده به ستون اضافه می‌شود تا اتصال بین لیگاند و مولکول هدف را از بین برده و تنها مولکول هدف همراه با محلول شوینده از ستون خارج شود.

تحلیلی تعادل شیب چگالی (DGE-AUC) در مقایسه با استاندارد طلای فعلی، یک روش ساده‌تر، حساس‌تر و سرویتپ-آگوستیک برای توصیف گونه‌های کپسید در درمان‌های ژنی مبتنی بر ناقل ویروسی و واکسن‌ها ارائه می‌دهد (۸۳). این روش دارای قابلیت قدرتمند جداسازی ویروس براساس چگالی، حفظ ویروس، جداسازی ویروس زنده و شستشو و استفاده مجدد از ابزار است. معایب آن شامل گرانی، زمان بر بودن و نیاز به تخصص و تجربه بالا است (۷۷).

#### ۴-۱-۲ اولتراسانتریفیوژ سرعت منطقه‌ای (Rate zonal)

چگالی شناور ویروس‌ها  $1.19 \text{ g/cm}^3$  است. در اولتراسانتریفیوژ سرعت منطقه‌ای استوک ویروس در بالای یک گرادیان چگالی پیوسته به عنوان یک لایه نازک قرار می‌گیرد. در طول اولتراسانتریفیوژ، ذرات به دلیل چگالی بیشتر، اما با سرعتی که به اندازه آنها نیز بستگی دارد، توسط محلول گرادیان حرکت می‌کنند. سایر محیط‌های گرادیان از جمله یدیکسانول، Percoll® و Nycodenz® با موفقیت برای خالص‌سازی ویروس‌های آنفلانزا و هیپاتیت استفاده شده‌اند (۸۵،۸۴) در تحقیقی توسط Segura و همکاران نشان داده شد که جایگزینی اولتراسانتریفیوژ با گرادیان چگالی ساکارز با اولتراسانتریفیوژ ناحیه‌ای با استفاده از یدیکسانول به عنوان محیط گرادیان، به طور قابل توجهی کارایی تخلیص رتروویروس را بهبود می‌بخشد و خلوص بیش از ۹۵٪ بدون وزیکول‌های غشای سلولی را ایجاد می‌کند (۸۶). از مزایای این روش می‌توان به قابلیت جداسازی ویروس‌ها بر اساس اندازه و شکل اشاره نمود. این روش احتمال از دست دادن ویروس را به دلیل چسبیدن به دیواره لوله یا دناتورده شدن کاهش می‌دهد. اولتراسانتریفیوژ سرعت منطقه‌ای می‌تواند برای تخلیص ویروس‌ها از نمونه‌های رقیق استفاده شود و یک روش سریع برای جداسازی ویروس‌ها به خصوص در مقایسه با روش‌های کروماتوگرافی باشد. از معایب آن می‌توان به گران بودن، زمان‌بر بودن و پایین بودن راندمان جداسازی اشاره نمود (۸۰).

#### ۵- گرادیان‌ت کلرید سزیم

کلرید سزیم (CsCl) یکی از موادی است که در خالص‌سازی با تکنیک‌های ته نشینی گرادیان‌ت چگالی، سانتریفیوژ ایزوپیکنیک یا سانتریفیوژ شیب چگالی تعادلی استفاده می‌شود. این روش بر این فرض استوار است که یک سوسپانسیون ویروس بر روی یک گرادیان‌ت از پیش ساخته شده به دنبال اولتراسانتریفیوژ منجر به مهاجرت ذرات ویروس شده تا آنها مطابق با چگالی شناور خودشان به تعادل برسند. در مورد ساکارز، محلول بسیار چسبناک و بیش از حد اسمزی است که باعث کاهش بازده کلی ویروس موجود می‌شود (۸۷). علاوه بر حلالیت و چگالی بالا، کلرید سزیم قادر به تشکیل محلول‌هایی با قدرت یونی و ویسکوزیته کم می‌باشد. همچنین، در یک pH مناسب کلرید سزیم بر فعالیت‌های بیولوژیک ویروس تأثیرگذار نمی‌باشد. کلرید سزیم نور UV را جذب نمی‌کند و اجازه آنالیزهای فتومتریک فرکشن‌های گرادیان‌ت را می‌دهد و به راحتی از فرکشن‌های ویروسی توسط دیالیز، فیلتراسیون یا اولتراسانتریفیوژ حذف می‌شود (۸۹،۸۸). در مطالعه‌ای نشان داده شد که یک روش سانتریفیوژ با گرادیان چگالی کلرید سزیم اصلاح شده با استفاده از سانتریفیوژ

چنانچه نیروی سانتریفیوژ و زمان به خوبی تنظیم شده باشند، معمولاً از دست دادن محصول به شکل رسوب به صورت همزمان مشکل ساز نمی‌باشد، اما اگر ذرات ویروسی با بقایای سلولی مرتبط شوند، ممکن است باعث ایجاد مشکلاتی شوند (۷۸،۷۷).

#### ۴-۱-۴ اولتراسانتریفیوژ

اولتراسانتریفیوژ یک تکنیک متداول انتخابی برای تخلیص ویروس‌ها از مواد دیگر است. در هر سوسپانسیون میزان رسوب نه تنها به اندازه، چگالی و مورفولوژی ذرات بلکه به ویسکوزیته محیطی که ذرات در آن معلق هستند و نیرویی که در طول سانتریفیوژ روی ذرات اعمال می‌شود، نیز بستگی دارد. توجه به دو رویکرد در سانتریفیوژ مهم است: میزان سرعت سانتریفیوژ و هم چگالی بودن. در طول سانتریفیوژ ذرات نمونه به صورت مجموعه‌ای از باندها و نقاط جدا می‌شوند. سانتریفیوژ هم چگالی ذرات را صرفاً بر اساس چگالی متفاوت آنها جدا می‌کند. Jiang و همکاران نشان دادند که در مورد Lentivirus سانتریفیوژ ناحیه‌ای میزان شیب چگالی نباید بیشتر از چگالی ذرات باشد در حالی که در سانتریفیوژ هم چگالی حداکثر چگالی باید همیشه از میزان چگالی ذرات تجاوز کند (۷۹). از مزایای این روش قابلیت جداسازی ذرات بر اساس اندازه و شکل و تخلیص ویروس با حفظ آن است در حالی که تهیه مقدمات این روش گران و شرایط اعمال و تهیه میزان بالای نمونه از محدودیت‌های آن است (۷۶).

#### ۴-۱-۴ اولتراسانتریفیوژ با گرادیان چگالی

اولتراسانتریفیوژ با چگالی تعادلی، رایج‌ترین روش مورد استفاده برای جداسازی ویروس‌ها است. با استفاده از این تکنیک، ذرات ویروسی با توجه به چگالی شناورشان جدا می‌شوند. یک محلول متراکم در لوله اولتراسانتریفیوژ به گونه‌ای که یک گرادیان چگالی تشکیل شود، به صورت لایه لایه قرار می‌گیرد. محلول به سمت پایین لوله متراکم‌تر است. استوک ویروس معمولاً در بالای گرادیان پیوسته قرار می‌گیرد و لوله با سرعت بسیار بالایی سانتریفیوژ می‌شود تا زمانی که ذرات ویروس به نقطه‌ای برسند که چگالی گرادیان برابر با چگالی شناورشان (تعادل) باشد. روش دیگر، گرادیان در طول اولتراسانتریفیوژ با استفاده از محیط‌های خود مولد دارای شیب گرادیان مانند کلرید سزیم، Iodixanol، یا Nycodenz است. از آنجایی که سانتریفیوژ باید در زمانی انجام شود که تمام ذرات نمونه به میزان کافی به تعادل رسیده باشند، این روش معمولاً بسیار زمان‌بر است (۸۱،۸۰). Gias و همکاران در پژوهشی نشان دادند که اولتراسانتریفیوژ مبتنی بر یدیکسانول جایگزینی برای تخلیص گرادیان چگالی ساکارز سنتی برای ویروس سنسیشیال تنفسی انسانی (hRSV: Respiratory syncytialvirus) ارائه می‌کند که بر محدودیت‌های ویسکوزیته ساکارز و خواص بیش‌اسمزی غلبه می‌نماید. این روش با استفاده از یدیکسانول، سولفات منیزیم به عنوان عامل تثبیت کننده و EDTA برای جداسازی ویروس، خالص‌سازی ویروس hRSV را تا ۶۹٪ به دست می‌آورد و نیاز به حذف پایین دستی از طریق دیالیز را به دلیل سمی نبودن یدیکسانول برای سلول‌های HeLa برطرف می‌کند (۸۲). Sternisha و همکاران نشان دادند که در این دسته اولتراسانتریفیوژ

که سابقاً در تولید واکسن‌های ویروسی استفاده شده است. اما امروزه فیلتراسیون جریان مماسی که اساس آن جداسازی اجزا از هم بر پایه وزن مولکولی و تغلیظ مداوم و حذف پارتیکل‌های اضافی می‌باشد که می‌تواند کارایی واکسن تهیه شده را افزایش دهد (۹۶،۴۹،۴۶). از محاسن دیگر این روش عدم استفاده از مواد و معرف‌های توکسیک، زمان جداسازی سریع و جریان مماسی مداوم در طول فیلتر غشایی با کات آف مناسب ۱۰۰ kD تحت شرایط کنترل شده می‌باشد (۹۶،۹۵،۹۴). نقش حیاتی ویروس آنفلوانزا در زمینه‌های دامپزشکی و انسانی محققان و صنایع را وادار کرد تا کل ذرات ویروس را از طریق روش‌های مختلف تخلیص تهیه کنند. به عنوان مثال، این ویروس بر روی یک گرادایانت ساکارز در آزمایشگاه و در مقیاس بزرگ جدا شده است (۹۸،۹۷). در این مطالعات از روش کروماتوگرافی حذف اندازه برای خالص‌سازی ویروس استفاده شده است (۳۸). در بین رزین‌های مورد استفاده در این مطالعه، سفاروز C۱ بهترین جداسازی را نشان داده است (۱۰). بیشتر تلاش‌ها در خالص‌سازی ویروس اخیراً به سمت کروماتوگرافی ستونی سوق دارد، مانند کروماتوگرافی حذف اندازه، که ممکن است به عنوان مرحله نهایی مورد استفاده قرار گیرد (۹۹). این مطالعه یک فرآیند ساده را ارائه می‌کند که می‌تواند در خالص‌سازی ویروس آنفلوانزای پرندگان H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> فعال و غیرفعال استفاده شود (۳۸). به نظر می‌رسد مقادیر ظرفیت اتصال گزارش شده برای ناقل‌های ویروسی (۱۰۱۱-۱۰۱۲ ذره ویروسی در هر میلی‌لیتر رزین) با مقادیر گزارش شده برای DNA پلاسمید، مطابقت دارد (۱۰۰،۵۷). با توجه به شباهت سطح ساختاری آنها با ناقل‌های ویروسی، این آلاینده‌ها یک چالش جدی هستند زیرا جدا کردن آنها با استفاده از روش‌های تخلیص توصیف شده در حال حاضر دشوار و گاهی غیرممکن است و به حداقل رساندن سطوح آنها در مرحله تولید بسیار مهم است. کپسیدهای خالی تقریباً از ناقلان ویروسی قابل تشخیص نیستند، اما فاقد ژنوم ناقل هستند یا حاوی اسید نوکلئیک کمی هستند و بنابراین غیرفعال‌اند. با این حال، هنوز هم به پاسخ ایمنی حاد علیه ناقل در داخل بدن کمک می‌کنند. بنابراین، مقامات نظارتی محدودیت‌هایی از نسبت کل به ذرات عفونی را برای انواع خاص ناقل‌های ویروسی تعیین کرده‌اند. سازمان غذا و داروی آمریکا حداکثر نسبت ۳۰:۱ را توصیه می‌کند (۷۲،۵۲). با توجه به تفاوت قابل توجه بین چگالی شناور کپسیدهای ویروسی خالی و کامل، جداسازی ذرات خالی (Ad: Advertising Vectors) توسط اولتراسانتریفیوژ با چگالی تعادلی امکان‌پذیر می‌باشد (۱۰۱). در مقابل، توان پاکسازی ذرات خالی توسط کروماتوگرافی بحث برانگیز است (۱۰۲). برخلاف وکتورهای، جداسازی ذرات خالی و کامل آدنوویروس با استفاده از روش کروماتوگرافی ستونی تبادل آنیونی در مقیاس آزمایشگاهی و اخیراً با استفاده از کروماتوگرافی تبادل یونی مبتنی بر غشاء انجام شده است (۱۰۳،۵۲). حذف سایر اشکال ناقل غیرفعال، مانند ذرات ناقل دناتوره شده، به ندرت در مقالات گزارش و یا مورد بحث قرار گرفته است (۱۰۴). به منظور تسهیل استفاده از اولتراسانتریفیوژ در یک پروتکل تخلیص در مقیاس بزرگ، امکان ترکیب کروماتوگرافی و اولتراسانتریفیوژ وجود دارد. به عنوان مثال، استفاده از اولتراسانتریفیوژ به عنوان مرحله نهایی تخلیص برای حذف گونه‌های آلوده کننده نزدیک

(g ۴۰۰۰۰) به سطحی از خالص‌سازی ویروس‌ها دست می‌یابد که قابل مقایسه با با اولتراسانتریفیوژ معمولی (g ۱۰۰۰۰۰) است و جایگزین مقرون‌به‌صرفه‌تری برای تحقیقات ویروس‌شناسی است (۷۶). گرادایانت CsCl می‌تواند ذرات را بر اساس چگالی آنها جدا کند، که به جداسازی ویروس‌ها از ذرات دیگر با چگالی متفاوت مانند باکتری‌ها، سلول‌ها و مولکول‌های آلی بزرگ کمک می‌کند. این روش احتمال از دست دادن ویروس را به دلیل چسبیدن به دیواره لوله یا دناتوره شدن کاهش می‌دهد اما روشی گران و هزینه بر است (۸۴).

### روش‌های جداسازی ویروس برای تولید انبوه و آزمایشگاهی

انتخاب روش مناسب برای جداسازی ویروس به عوامل مختلفی از جمله تجهیزات، نوع ویروس، حجم نمونه مورد نیاز، کاربرد مورد نظر، هزینه، زمان، تخصص و راندمان جداسازی بستگی دارد (۱۲). از روش‌های مناسب برای تولید انبوه ویروس اولتراسانتریفیوژ با چگالی تعادلی: این روش برای جداسازی ویروس‌ها در مقیاس بزرگ و با خلوص بالا مناسب است (۷۷). فیلتراسیون و اولترافیلتراسیون صنعتی روشی برای جداسازی ویروس‌ها از ذرات بزرگتر مانند باکتری‌ها و سلول‌ها در مقیاس بزرگ مناسب است (۱۸)، کروماتوگرافی تبادل یونی: این روش برای جداسازی ویروس‌ها با خلوص بالا و در مقیاس‌های مختلف مناسب است (۶۱)، روش‌های مولکولی: این روش‌ها برای جداسازی ویروس‌ها با خلوص بالا و در مقیاس‌های مختلف مناسب هستند، اما می‌توانند گران باشند (۱۲). از روش‌های مناسب برای تولید ویروس در شرایط آزمایشگاهی می‌توان به رسوب گذاری (۱۶)، میکروفیلتراسیون (۲۴)، اولتراسانتریفیوژ آزمایشگاهی (۸۰) و گرادایانت کلرید سزیم (۸۵) می‌توان اشاره نمود.

### بحث

در یک مطالعه برای بازیابی بهینه پروتئین ویروسی هاری (Rabies virus) و حذف بهینه ناخالصی‌هایی مانند DNA سلولی باقیمانده و (Bovine serum albumin) BSA سلول میزبان از روش جایگزین جدید کروماتوگرافی سولفات سلوفین به جای سانتیفیوژ که برای سایر واکسن‌های ویروسی حیوانی و انسانی به کار رفته است استفاده شده است. نتایج نشان داده است که واکسن‌ها بسیار ایمنی‌زا هستند و همچنین محافظت در موش‌ها منجر به درجه حفاظت کافی پس از واکسیناسیون شده است (۹۰). در مطالعه دیگری تلاش شده است با خالص‌سازی سلول‌های آلوده به ویروس با استفاده از روش فیلتراسیون جریان مماسی، ویروس هاری حاوی گلیکوپروتئین تغلیظ و خالص‌سازی شده است، که نقش مهمی در افزایش قدرت و کارایی واکسن و ایمنی‌زایی واکسن تولیدی داشته است (۹۳،۹۲،۹۱). امروزه در دنیا این روش جهت تغلیظ و خالص‌سازی پروتئین مرسوم شده است و در سیستم تولید واکسن هاری دامی در کشور روش نوینی می‌باشد، که می‌تواند گام بزرگی در جهت افزایش قدرت و کارایی واکسن باشد. با توجه به اینکه غلظت بالای ویروس در زمان تولید واکسن نقش مهمی در میزان قدرت و کارایی آن ایفا می‌کند، تغلیظ ویروس با کمک این تکنیک بر عملکرد مناسب واکسن در طول دوره نگهداری تأثیرگذار می‌باشد (۹۳). از معمول‌ترین روش‌ها، استفاده از اولتراسانتریفیوژ و الکتروفورز گرادایانت ساکارز بوده



nology and Bioengineering. 2019;116(9):2292-302.

12. Ajayi OO, Johnson SA, Faison T, Azer N, Cullinan JL, Dement-Brown J, et al. An updated analysis of viral clearance unit operations for biotechnology manufacturing. *Current Research in Biotechnology*. 2022;4:190-202.

13. Turpeinen DG, Joshi PU, Kriz SA, Kaur S, Nold NM, O'Hagan D, et al. Continuous purification of an enveloped and non-enveloped viral particle using an aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology*. 2021;269:118753.

14. Du P, Sun P, Sun S, Dong J, Dong H, Liu R, et al. Separation and purification of foot-and-mouth disease virus by multiple-stage aqueous two-phase extraction system. *Process Biochemistry*. 2019;77:143-50.

15. Marichal-Gallardo P, Börner K, Pieler MM, Sonntag-Buck V, Obr M, Bejarano D, et al. Single-use capture purification of adeno-associated viral gene transfer vectors by membrane-based steric exclusion chromatography. *Human Gene Therapy*. 2021;32(17-18):959-74.

16. Colombet J, Robin A, Lavie L, Bettarel Y, Cauchie H, Sime- Ngando T. Virioplankton 'pegylation': use of PEG (polyethylene glycol) to concentrate and purify viruses in pelagic ecosystems. *Journal of microbiological methods*. 2007;71(3):212-9.

17. Hao X, Chen J, Xu M, Zheng H, Li X, Wang M, et al. Separation and purification of enveloped and non-enveloped viruses from water samples using an aqueous two-phase system. *Process Biochemistry*. 2022;119:58-67.

18. Johnson SA, Chen S, Bolton G, Chen Q, Lute S, Fisher J, et al. Virus filtration: A review of current and future practices in bioprocessing. *Biotechnology and Bioengineering*. 2022;119(3):743-61.

19. Torii S, Oishi W, Zhu Y, Thakali O, Malla B, Yu Z, et al. Comparison of five polyethylene glycol precipitation procedures for the RT-qPCR based recovery of murine hepatitis virus, bacteriophage phi6, and pepper mild mottle virus as a surrogate for SARS-CoV-2 from wastewater. *Science of The Total Environment*. 2022;807:150722.

20. Carvalho SB, Silva RJ, Moreira AS, Cunha B, Clemente JJ, Alves PM, et al. Efficient filtration strategies for the clarification of influenza virus-like particles derived from insect cells. *Separation and Purification Technology*. 2019;218:81-8.

21. Wickramasighe SR, Fan R, Qian X. Virus removal and virus purification. *Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes*: Elsevier; 2019. p. 69-96.

22. Gupta I, Farinas ET, Mitra S. Development of carbon nano-

به هم در پایان یک فرآیند کروماتوگرافی استاندارد، زمانی که حجم ذخایر ویروسی به راحتی قابل کنترل باشد، جالب توجه می‌باشد (۵۸).

### تقدیر و تشکر

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج به دلیل حمایت مالی از پروژه: ۹۸۰۱۸۷-۹۸۰۰۵-۰۰۵-۱۸-۱۸ تقدیر و تشکر نمایند.

### منابع مورد استفاده

1. Shojai TM, Langeroudi AG, Karimi V, Barin A, Sadri N. The effect of *Allium sativum* (Garlic) extract on infectious bronchitis virus in specific pathogen free embryonic egg. *Avicenna journal of phytomedicine*. 2016;6(4):458.
2. Trombetta CM, Marchi S, Manini I, Lazzeri G, Montomoli E. Challenges in the development of egg-independent vaccines for influenza. *Expert Review of Vaccines*. 2019;18(7):737-50.
3. Jorge S, Dellagoštin OA. The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnology Research and Innovation*. 2017;1(1):6-13.
4. Rodrigues AF, Soares HR, Guerreiro MR, Alves PM, Coroadinha AS. Viral vaccines and their manufacturing cell substrates: New trends and designs in modern vaccinology. *Biotechnology journal*. 2015;10(9):1329-44.
5. Hansen L, Daoussi R, Vervaeet C, Remon J-P, De Beer T. Freeze-drying of live virus vaccines: a review. *Vaccine*. 2015;33(42):5507-19.
6. Afrough B, Dowall S, Hewson R. Emerging viruses and current strategies for vaccine intervention. *Clinical & Experimental Immunology*. 2019;196(2):157-66.
7. Han S. Clinical vaccine development. *Clinical and experimental vaccine research*. 2015;4(1):46-53.
8. Felberbaum RS. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnology journal*. 2015;10(5):702-14.
9. Kalbfuss-Zimmermann B, Reichl U, Wen E, Ellis R, Pujar N. Viral vaccines purification. *Vaccine development and manufacturing*. 2014;1:97-180.
10. Junter G-A, Lebrun L. Polysaccharide-based chromatographic adsorbents for virus purification and viral clearance. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2020;10(4):291-312.
11. Chiang MJ, Pagkaliwangan M, Lute S, Bolton G, Brorson K, Schofield M. Validation and optimization of viral clearance in a downstream continuous chromatography setting. *Biotech-*



- tube-metal organic framework (MOF) hybrid antiviral micro-filtration membrane. *Separation and Purification Technology*. 2023;315:123766.
23. Herath G, Yamamoto K, Urase T. Removal of viruses by microfiltration membranes at different solution environments. *Water Science and Technology*. 1999;40(4-5):331-8.
24. Zhu B, Clifford DA, Chellam S. Virus removal by iron coagulation-microfiltration. *Water research*. 2005;39(20):5153-61.
25. Sinclair T, Robles D, Raza B, Van den Hengel S, Rutjes S, de Roda Husman A, et al. Virus reduction through microfiltration membranes modified with a cationic polymer for drinking water applications. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*. 2018;551:33-41.
26. Goodrich EM, Bohonak DM, Geneš PW, Peterson E. Recent advances in ultrafiltration and virus filtration for production of antibodies and related biotherapeutics. *Approaches to the Purification, Analysis and Characterization of Antibody-Based Therapeutics*. 2020:137-66.
27. Jacquet N, Wurtzer S, Darracq G, Wyart Y, Moulin L, Moulin P. Effect of concentration on virus removal for ultrafiltration membrane in drinking water production. *Journal of Membrane Science*. 2021;634:119417.
28. Loewe D, Dieken H, Grein TA, Salzig D, Czermak P. A combined ultrafiltration/diafiltration process for the purification of oncolytic measles virus. *Membranes*. 2022;12(2):105.
29. Arunkumar A, Singh N. Ultrafiltration behavior of recombinant adeno associated viral vectors used in gene therapy. *Journal of Membrane Science*. 2021;620:118812.
30. Wu L. Virus retentive filter paper for processing of plasma-derived proteins 2020.
31. Ikner LA, Gerba CP, Bright KR. Concentration and recovery of viruses from water: a comprehensive review. *Food and Environmental Virology*. 2012;4:41-67.
32. Liu P, Hill VR, Hahn D, Johnson TB, Pan Y, Jothikumar N, et al. Hollow-fiber ultrafiltration for simultaneous recovery of viruses, bacteria and parasites from reclaimed water. *Journal of microbiological methods*. 2012;88(1):155-61.
33. Hulo C, De Castro E, Masson P, Bougueleret L, Bairoch A, Xenarios I, et al. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic acids research*. 2011;39(suppl\_1):D576-D82.
34. Hagen S, Baumann T, Wagner HJ, Morath V, Kaufmann B, Fischer A, et al. Modular adeno-associated virus (rAAV) vectors used for cellular virus-directed enzyme produg therapy. *Scientific reports*. 2014;4(1):3759.
35. Schindler SE, McCall JG, Yan P, Hyrc KL, Li M, Tucker CL, et al. Photo-activatable Cre recombinase regulates gene expression in vivo. *Scientific reports*. 2015;5(1):13627.
36. Scherr M, Battmer K, Eder M, Schüle S, Hohenberg H, Ganser A, et al. Efficient gene transfer into the CNS by lentiviral vectors purified by anion exchange chromatography. *Gene therapy*. 2002;9(24):1708-14.
37. Li F, Liu B, Xiong Y, Zhang Z, Zhang Q, Qiu R, et al. Enhanced Downstream Processing for a Cell-Based Avian Influenza (H5N1) Vaccine. *Vaccines*. 2024;12(2):138.
38. Shirvan AN, Samianifard M, Ghodsian N. Purification of avian influenza virus (H9N2) from allantoic fluid by size-exclusion chromatography. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. 2016;40(1):107-11.
39. Lothert K, Offersgaard AF, Pihl AF, Mathiesen CK, Jensen TB, Alzua GP, et al. Development of a downstream process for the production of an inactivated whole hepatitis C virus vaccine. *Scientific Reports*. 2020;10(1):16261.
40. Pang J-H, Guo C-F, Hao P-L, Meng S-L, Guo J, Zhang D, et al. Evaluation of the Robustness Verification of Downstream Production Process for Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine and Different Chromatography Medium Purification Effects. *Vaccines*. 2024;12(1):56.
41. Kovpak A, Ivin YY, Pinaeva A, Khapchaev YK, Ozherelkov S, Belyakova A, et al. Application of ultrafiltration membranes for purification and concentration of Sabin poliovirus type 1. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2021;98(2):135-43.
42. Steppert P, Mosor M, Stanek L, Burgstaller D, Palmberger D, Preinsperger S, et al. A scalable, integrated downstream process for production of a recombinant measles virus-vectored vaccine. *Vaccine*. 2022;40(9):1323-33.
43. Inouye M, Burnouf T. The role of nanofiltration in the pathogen safety of biologicals: an update. *Current Nanoscience*. 2020;16(3):413-24.
44. Hoseinzadeh M, Jiryai Sharahi A, Hosseini Manesh P, Esmaeili M, editors. *Nanofiltration (NR) and reverse osmosis (RO) as emerging methods in water purification*. Second Int Conf on Chemistry and Chemical Engineering, Tehran, Iran; 2021.
45. Arola K, Van der Bruggen B, Mänttari M, Kallioinen M. Treatment options for nanofiltration and reverse osmosis concentrates from municipal wastewater treatment: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*.

- 2019;49(22):2049-116.
46. Musumeci T, Leonardi A, Bonaccorso A, Pignatello R, Puglisi G. Tangential flow filtration technique: An overview on nanomedicine applications. *Pharmaceutical nanotechnology*. 2018;6(1):48-60.
47. Hein MD, Chawla A, Cattaneo M, Kupke SY, Genzel Y, Reichl U. Cell culture-based production of defective interfering influenza A virus particles in perfusion mode using an alternating tangential flow filtration system. *Applied microbiology and biotechnology*. 2021;105:7251-64.
48. Grzenia DL, Carlson JO, Wickramasinghe SR. Tangential flow filtration for virus purification. *Journal of Membrane Science*. 2008;321(2):373-80.
49. Cai L, Yang Y, Jiao N, Zhang R. Evaluation of tangential flow filtration for the concentration and separation of bacteria and viruses in contrasting marine environments. *PloS one*. 2015;10(8):e0136741.
50. Lasareishvili B, Shi H, Wang X, Hillstead KD, Tediashvili M, Jaiani E, et al. Virus recovery by tangential flow filtration: A model to guide the design of a sample concentration process. *Biotechnology Progress*. 2021;37(1):e3080.
51. Wagner C, Inthaler B, Lemmerer M, Pletzenauer R, Birner-Gruenberger R. Biophysical characterization of adeno-associated virus vectors using ion-exchange chromatography coupled to light scattering detectors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(21):12715.
52. Reiter K, Aguilar PP, Wetter V, Steppert P, Tover A, Jungbauer A. Separation of virus-like particles and extracellular vesicles by flow-through and heparin affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2019;1588:77-84.
53. Agarwal H, Wang X, Kulkarni NR, Tao S, Demers C. Application of machine learning in ensuring viral safety of biotherapeutics: Case study demonstrating prediction and optimization of viral clearance performance of anion exchange chromatography. *Current Research in Biotechnology*. 2023;6:100140.
54. Mazzer AR, Perraud X, Halley J, O'Hara J, Bracewell DG. Protein A chromatography increases monoclonal antibody aggregation rate during subsequent low pH virus inactivation hold. *Journal of Chromatography A*. 2015;1415:83-90.
55. Pan C, Becerra-Arteaga A, Tran B, Chinn M, Wang H, Chen Q, et al. Characterizing and enhancing virus removal by protein A chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*. 2019;116(4):846-56.
56. Effio CL, Oelmeier SA, Hubbuch J. High-throughput characterization of virus-like particles by interlaced size-exclusion chromatography. *Vaccine*. 2016;34(10):1259-67.
57. Vajda J, Weber D, Brekel D, Hundt B, Müller E. Size distribution analysis of influenza virus particles using size exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2016;1465:117-25.
58. Steppert P, Burgstaller D, Klausberger M, Tover A, Berger E, Jungbauer A. Quantification and characterization of virus-like particles by size-exclusion chromatography and nanoparticle tracking analysis. *Journal of Chromatography A*. 2017;1487:89-99.
59. Meng H, Sorrentino M, Woodcock D, O'Riordan C, Dhanwan V, Verhagen M, et al. Size exclusion chromatography with dual wavelength detection as a sensitive and accurate method for determining the empty and full capsids of recombinant adeno-associated viral vectors. *Human Gene Therapy*. 2022;33(3-4):202-12.
60. Farkas K, Pang L, Lin S, Williamson W, Easingwood R, Fredericks R, et al. A gel filtration-based method for the purification of infectious rotavirus particles for environmental research applications. *Food and environmental virology*. 2013;5:231-5.
61. Lagoutte P, Mignon C, Donnat S, Stadthagen G, Maš J, Sodoyer R, et al. Scalable chromatography-based purification of virus-like particle carrier for epitope based influenza A vaccine produced in *Escherichia coli*. *Journal of virological methods*. 2016;232:8-11.
62. Yang Y, Li H, Li Z, Zhang Y, Zhang S, Chen Y, et al. Size-exclusion HPLC provides a simple, rapid, and versatile alternative method for quality control of vaccines by characterizing the assembly of antigens. *Vaccine*. 2015;33(9):1143-50.
63. Fekete S, Beck A, Veuthey J-L, Guillaume D. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015;113:43-55.
64. Grönberg A. Ion exchange chromatography. *Biopharmaceutical Processing*: Elsevier; 2018. p. 379-99.
65. Sviben D, Forcic D, Ivancic-Jelecki J, Halassy B, Brgles M. Recovery of infective virus particles in ion-exchange and hydrophobic interaction monolith chromatography is influenced by particle charge and total-to-infective particle ratio. *Journal of Chromatography B*. 2017;1054:10-9.
66. Zhou W, Bi J, Janson J-C, Dong A, Li Y, Zhang Y, et al. Ion-exchange chromatography of hepatitis B virus surface antigen from a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *Journal of Chromatography A*. 2005;1095(1-2):119-25.

67. Adriaenssens EM, Lehman SM, Vandersteegen K, Vandenhuevel D, Philippe DL, Cornelissen A, et al. CIM® monolithic anion-exchange chromatography as a useful alternative to CsCl gradient purification of bacteriophage particles. *Virology*. 2022;434(2):265-70.
68. Shields PA, Farrah SR. Characterization of virus adsorption by using DEAE-sepharose and octyl-sepharose. *Applied and environmental microbiology*. 2002;68(8):3965-8.
69. Weigel T, Soliman R, Wolff MW, Reichl U. Hydrophobic-interaction chromatography for purification of influenza A and B virus. *Journal of Chromatography B*. 2019;1117:103-17.
70. Li H, Yang Y, Zhang Y, Zhang S, Zhao Q, Zhu Y, et al. A hydrophobic interaction chromatography strategy for purification of inactivated foot-and-mouth disease virus. *Protein Expression and Purification*. 2015;113:23-9.
71. Rieser R, Koch J, Faccioli G, Richter K, Menzen T, Biel M, et al. Comparison of different liquid chromatography-based purification strategies for adeno-associated virus vectors. *Pharmaceutics*. 2021;13(5):748.
72. Lothert K, Pagallies F, Feger T, Amann R, Wolff MW. Selection of chromatographic methods for the purification of cell culture-derived Orf virus for its application as a vaccine or viral vector. *Journal of biotechnology*. 2020;323:62-72.
73. Zhao M, Vandersluis M, Stout J, Haupts U, Sanders M, Jacquemart R. Affinity chromatography for vaccines manufacturing: Finally ready for prime time? *Vaccine*. 2019;37(36):5491-503.
74. Ramos-de-la-Peña AM, González-Valdez J, Aguilar O. Protein A chromatography: Challenges and progress in the purification of monoclonal antibodies. *Journal of separation science*. 2019;42(9):1816-27.
75. Opitz L, Salaklang J, Büttner H, Reichl U, Wolff MW. Lectin-affinity chromatography for downstream processing of MDCK cell culture derived human influenza A viruses. *Vaccine*. 2007;25(5):939-47.
76. Nasukawa T, Uchiyama J, Taharaguchi S, Ota S, Ujihara T, Matsuzaki S, et al. Virus purification by CsCl density gradient using general centrifugation. *Archives of virology*. 2017;162:3523-8.
77. Moreira AS, Cavaco DG, Faria TQ, Alves PM, Carrondo MJ, Peixoto C. Advances in lentivirus purification. *Biotechnology journal*. 2021;16(1):2000019.
78. Stace-Smith R, Martin RR. Virus purification in relation to diagnosis. *Diagnosis of Plant Virus Diseases: CRC Press*; 2019. p. 129-58.
79. Jiang W, Hua R, Wei M, Li C, Qiu Z, Yang X, et al. An optimized method for high-titer lentivirus preparations without ultracentrifugation. *Scientific reports*. 2015;5(1):13875.
80. Sviben D, Forčić D, Kurtović T, Halassy B, Brgles M. Stability, biophysical properties and effect of ultracentrifugation and diafiltration on measles virus and mumps virus. *Archives of virology*. 2016;161:1455-67.
81. DeMarino C, Barclay RA, Pleet ML, Pinto DO, Branscome H, Paul S, et al. Purification of high yield extracellular vesicle preparations away from virus. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2019(151):e59876.
82. Gias E, Nielsen S, Morgan L, Toms G. Purification of human respiratory syncytial virus by ultracentrifugation in iodixanol density gradient. *Journal of virological methods*. 2008;147(2):328-32.
83. Sternisha SM, Wilson AD, Bouda E, Bhattacharya A, Verheul R. Optimizing high-throughput viral vector characterization with density gradient equilibrium analytical ultracentrifugation. *European Biophysics Journal*. 2023:1-6.
84. Sood G, Sharma M, Kaushal R. Centrifugation: Basic principle, types. *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship: Elsevier*; 2023. p. 133-43.
85. Rikkert LG, Engelaer M, Hau CM, Terstappen LW, Nieuwland R, Coumans FA. Rate zonal centrifugation can partially separate platelets from platelet-derived vesicles. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*. 2020;4(6):e12366.
86. de las Mercedes Segura M, Garnier A, Kamen A. Purification and characterization of retrovirus vector particles by rate zonal ultracentrifugation. *Journal of virological methods*. 2016;133(1):82-91.
87. Jin W, Xing Z, Song Y, Huang C, Xu X, Ghose S, et al., editors. Protein aggregation and mitigation strategy in low pH viral inactivation for monoclonal antibody purification. *MABs*; 2019: Taylor & Francis.
88. Sulalman I, Yaakol A. Purification and Antiserum Production of Sweet Potato Feathery Mottle Potyvirus (SPFMV).
89. Ghabrial S. A transmissible disease of *Helminthosporium victoriae*-evidence for a viral etiology. *Fungal virology: CRC Press*; 2018. p. 163-76.
90. Busse R, Hirai M, Voss C. *Virus Purification and Removal*. 2015.
91. Trabelsi K, Zakour MB, Kallel H. Purification of rabies virus produced in Vero cells grown in serum free medium. *Vaccine*. 2019;37(47):7052-60.
92. Sullivan HA, Wickersham IR. Concentration and purifica-

- tion of rabies viral and lentiviral vectors. Cold Spring Harbor Protocols. 2015;2015(4):pdb. prot075887.
93. Frazatti-Gallina NM. Purified Vero-cell rabies vaccine. Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention, Volume 2: Elsevier; 2015. p. 261-8.
94. Busatto S, Vilanilam G, Ticer T, Lin W-L, Dickson DW, Shapiro S, et al. Tangential flow filtration for highly efficient concentration of extracellular vesicles from large volumes of fluid. Cells. 2018;7(12):273.
95. Zydney AL. New developments in membranes for bioprocessing—A review. Journal of Membrane Science. 2021;620:118804.
96. Haraszti RA, Miller R, Stoppato M, Sere YY, Coles A, Didiot M-C, et al. Exosomes produced from 3D cultures of MSCs by tangential flow filtration show higher yield and improved activity. Molecular Therapy. 2018;26(12):2838-47.
97. Tseng Y-F, Weng T-C, Lai C-C, Chen P-L, Lee M-S, Hu AY-C. A fast and efficient purification platform for cell-based influenza viruses by flow-through chromatography. Vaccine. 2018;36(22):3146-52.
98. Weigel T, Solomaier T, Wehmeyer S, Peuker A, Wolff MW, Reichl U. A membrane-based purification process for cell culture-derived influenza A virus. Journal of Biotechnology. 2016;220:12-20.
99. Fischer LM, Wolff MW, Reichl U. Purification of cell culture-derived influenza A virus via continuous anion exchange chromatography on monoliths. Vaccine. 2018;36(22):3153-60.
100. Transfiguracion J, Manceur AP, Petiot E, Thompson CM, Kamen AA. Particle quantification of influenza viruses by high performance liquid chromatography. Vaccine. 2015;33(1):78-84.
101. Effio CL, Hubbuch J. Next generation vaccines and vectors: Designing downstream processes for recombinant protein-based virus-like particles. Biotechnology journal. 2015;10(5):715-27.
102. Adams B, Bak H, Tuštan AD. Moving from the bench towards a large scale, industrial platform process for adeno-associated viral vector purification. Biotechnology and bioengineering. 2020;117(10):3199-211.
103. Zaveckas M, Snipaitis S, Pesliakas H, Nainys J, Gedvilaite A. Purification of recombinant virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein using ion-exchange monolith chromatography. Journal of Chromatography B. 2015;991:21-8.
104. Aguilar PP, Schneider TA, Wetter V, Maresch D, Ling WL, Tover A, et al. Polymer-grafted chromatography media for the purification of enveloped virus-like particles, exemplified with HIV-1 gag VLP. Vaccine. 2019;37(47):7070-80.

