


Τεχνολογίες παραγωγής εμβολίων και φάγων σε εργαστηριακή και βιομηχανική κλίμακα

Τσέρτου Μαριάννα

Αθήνα, 30/10/2023



Παραγωγή αυτεμβολίων

Επιλογή βακτηρίου

Καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό

Καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό

Εξουδετέρωση

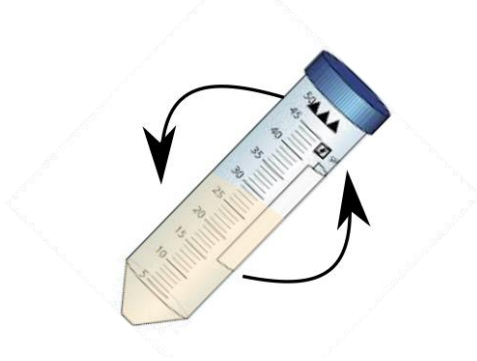
Συγκομιδή

Μέτρηση συγκέντρωσης

Παραγωγή εμβολίου

Καλλιέργεια βακτηρίων σε μικρή κλίμακα

Καλλιέργεια του βακτηρίου σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα



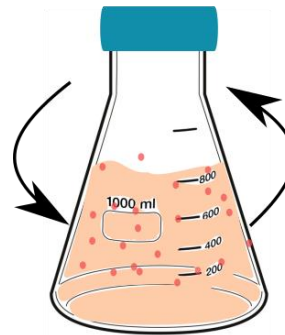
Ενοφθαλισμός υγρού θρεπτικού

- Overnight
- Purity test 3
- Αδρανοποίηση
- Sterility test 1



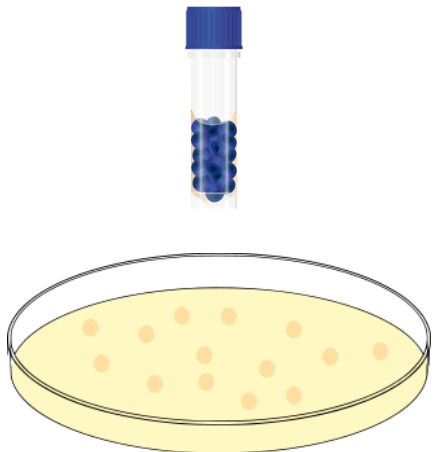
Προετοιμασία υγρής καλλιέργειας

- Overnight
- Purity test 2



Συλλογή βιομάζας

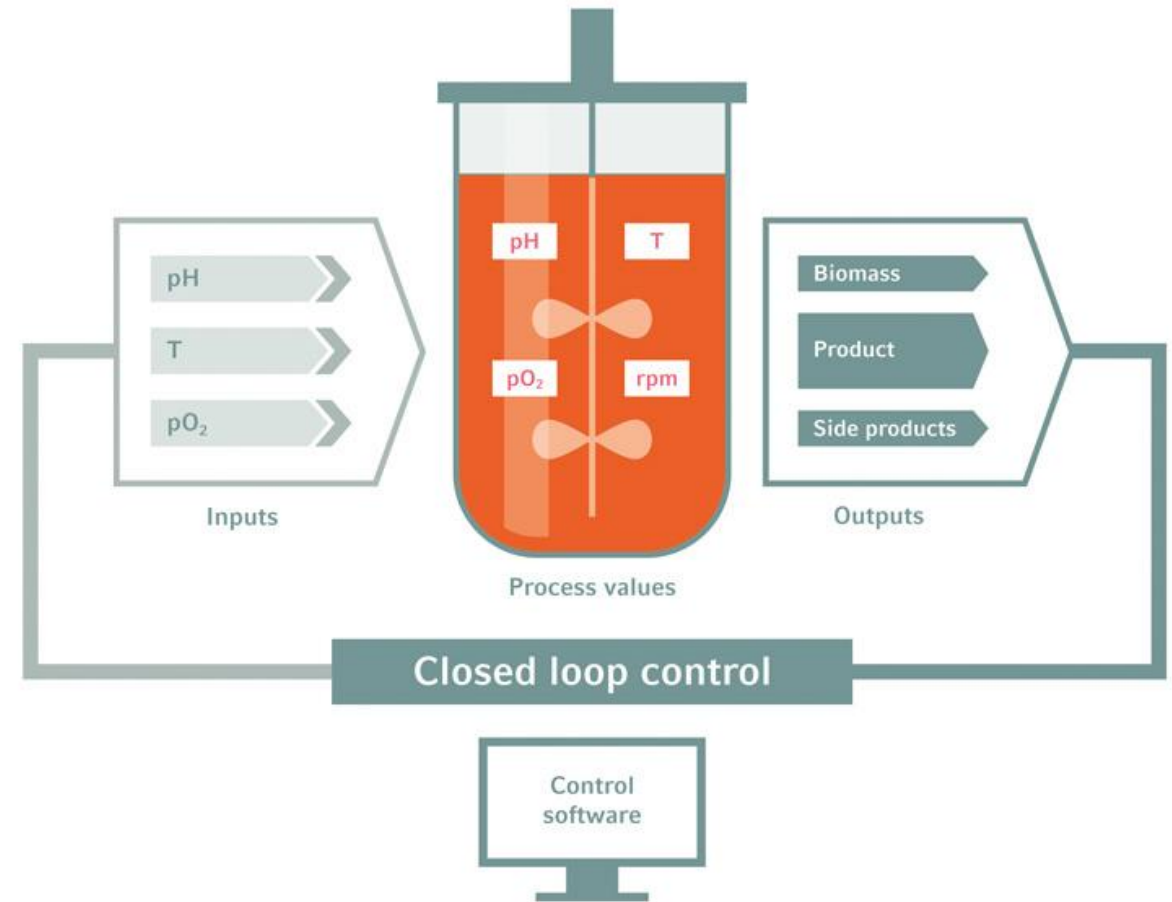
- Φυγοκέντρηση
- Ανασύσταση
- Sterility test 2
- Μέτρηση βιομάζας
- Αποθήκευση



Καλλιέργεια βακτηρίων σε μεγάλη κλίμακα

Βιοαντιδραστήρες

- Κλειστά συστήματα
- Αισθητήρες (pH, DO, T, level)
- Υποδοχές εισόδου (αέρια, υγρά)
- Υποδοχές εξόδου (δείγμα, συγκομιδή)
- Λογισμικό



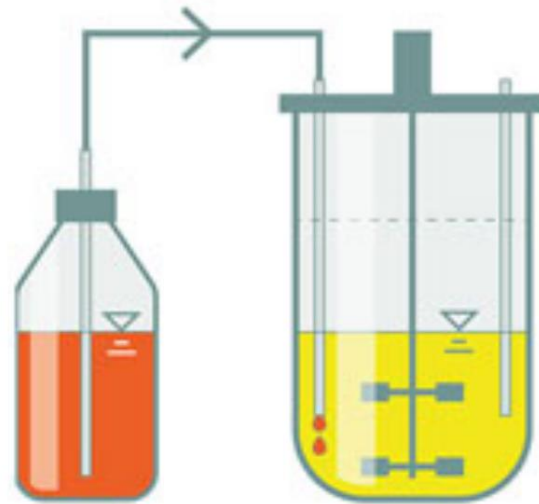
Καλλιέργεια βακτηρίων σε μεγάλη κλίμακα

Δεδομένος αρχικός
όγκος θρεπτικού
μέσου



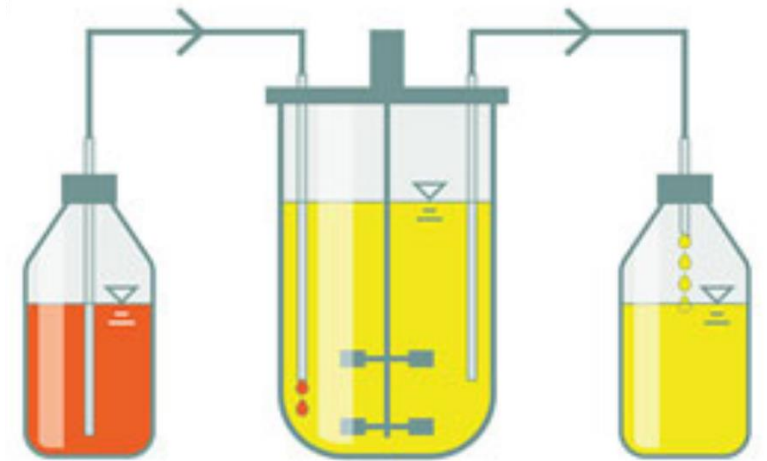
Batch culture

Τροφοδότηση με
φρέσκο θρεπτικό
μέσο



Fed-Batch culture

Τροφοδότηση με φρέσκο
θρεπτικό μέσο και
ταυτόχρονη απομάκρυνση
χρησιμοποιημένου



Continuous culture

Πρόληψη δονακίωσης οφειλόμενης στο *Vibrio harveyi* με καινοτόμα εργαλεία
pRevention Of viBriosis caUSed by Vibrio harveyi with innovative Tools – ROBUST

ΥΕ3.1 Παραγωγή αυτεμβολίων



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Ταμείο
Περιφερειακής Ανάπτυξης



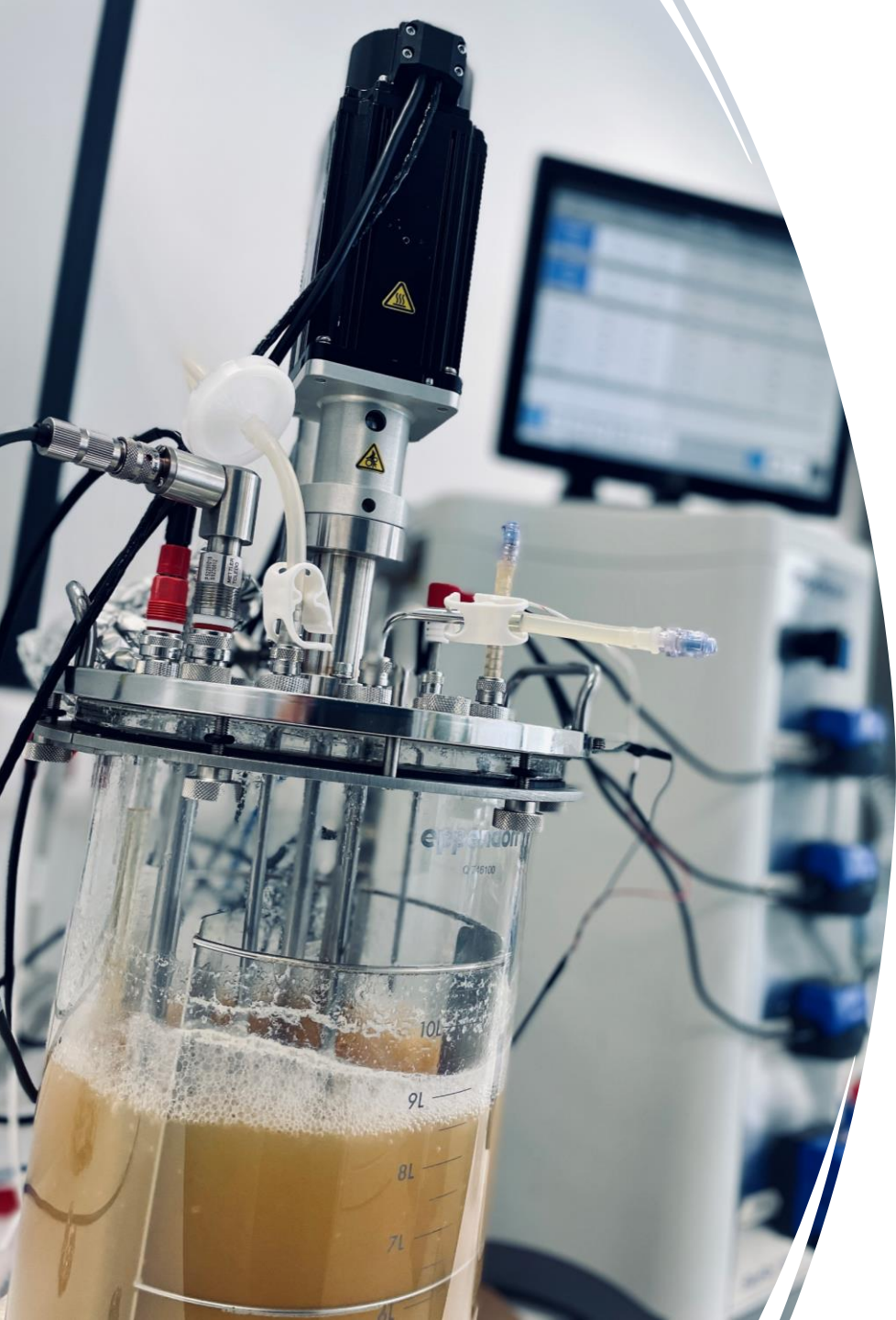
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΝΔΥΣΕΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΕΤΠΑ & ΤΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΑΝΕΚ

ΓΓΕΚ
ΓΕΝΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ
ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑΣ

ΕΠΑνεΚ 2014-2020
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



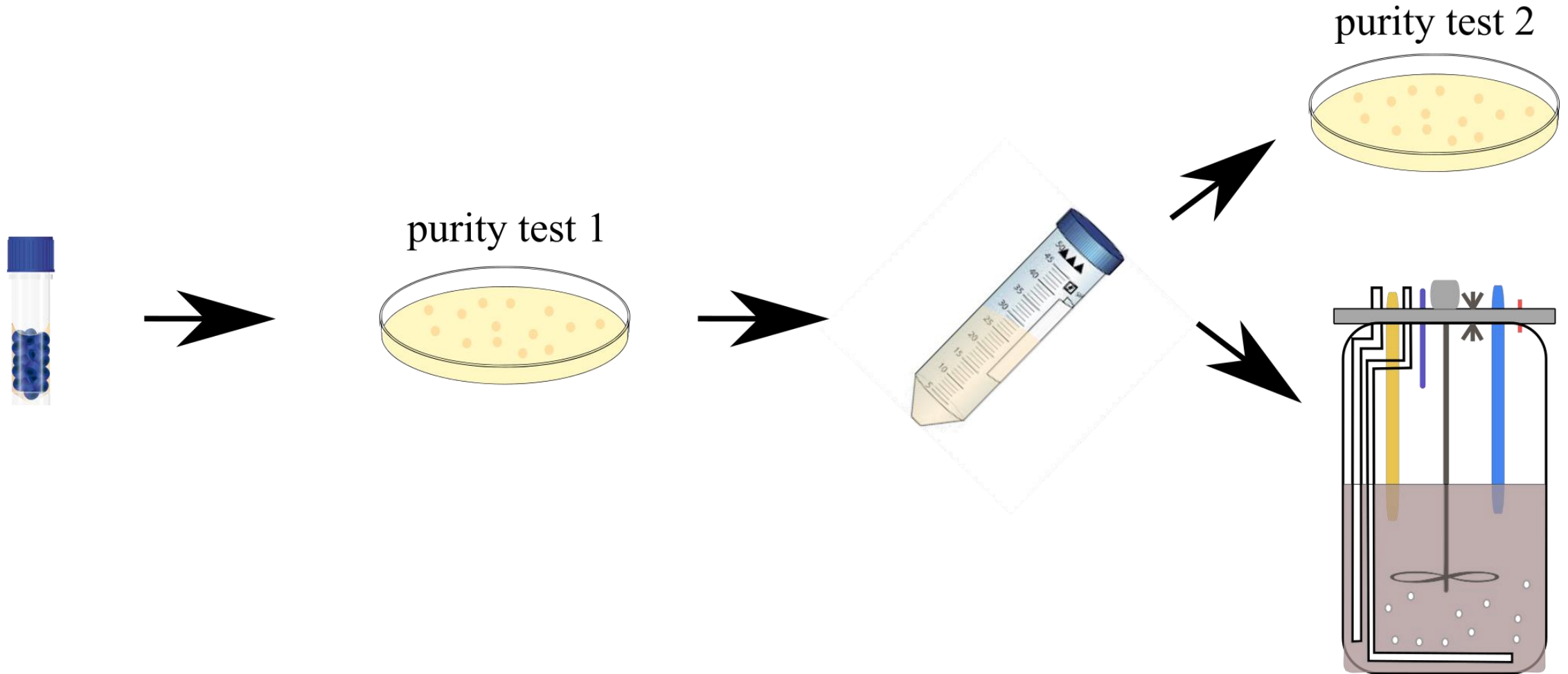
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Παραγωγή αυτεμβολίων στα πλαίσια του ROBUST

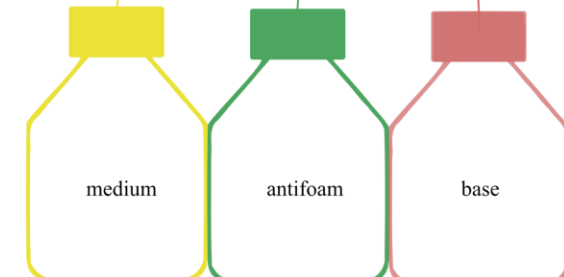
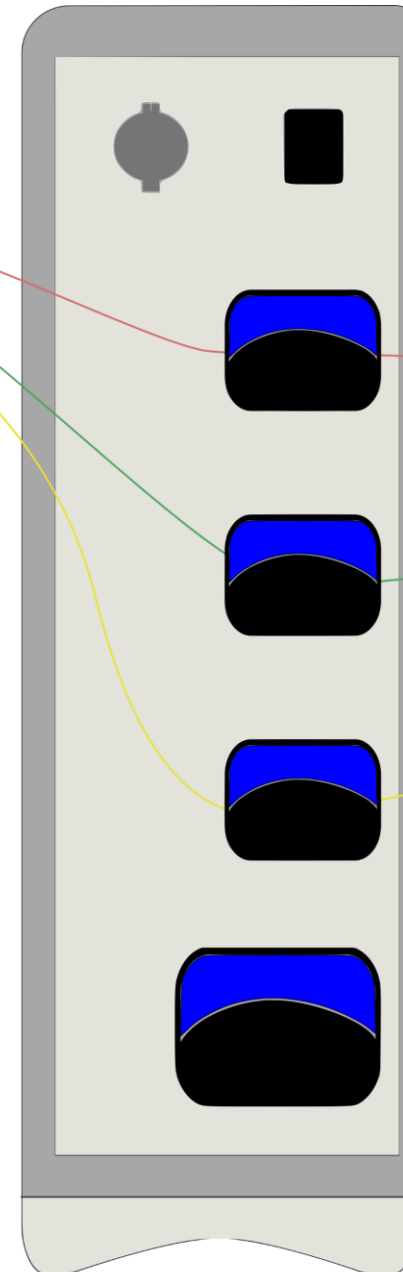
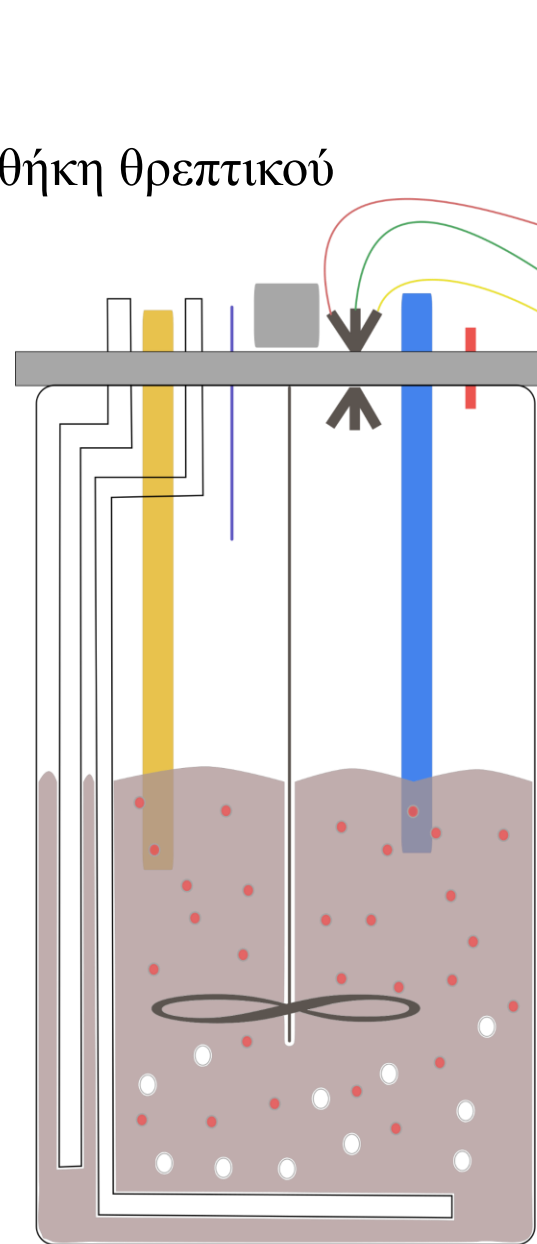
- Δύο στελέχη *V. harveyi*
- Bioflo 320
- Fed – Batch καλλιέργεια

Παραγωγή βιομάζας βακτηρίων



Παράμετροι ζύμωσης

- pH setpoint: 7.0
- T setpoint: 25°C
- DO setpoint: 40%
- Time profile για προσθήκη θρεπτικού
- Διάρκεια: 16 ώρες



Loop	Mode	SP	PV	Units	Cascade	Output
Standard						
Agitation	Off	50	0	RPM	None	0.0
Temp	Off	0.000	20.987	°C	None	0.0
Sensors						
1-pH	Off	7.00	-26.75	pH	None	0.0
2-DO	Off	50.0	8.6	%	None	0.0
pH-Opt	Off	7.00	99.99	pH	None	0.0
Spurge						
S-Flow	Off	0.0	0.0	SLPM	None	0.0
S-Air	Off	0.0	0.0	%	2-DO	0.0
S-O2	Off	0.0	0.0	%	2-DO	0.0
S-N2	Off	0.0	0.0	%	None	0.0
S-CO2	Off	0.0	0.0	%	None	0.0
Overlay						
O-Flow	Off	0.0	0.0	SLPM	None	0.0

EFT 00:00 14 Apr 2014 09:46

Unit 1 - Trend

1-pH	2-DO	Agit	S-Flo	P1	P2	P3	Temp
PV 7.79	PV 5.1	PV 225	PV 0.0	PV 0.0	PV 0.0	PV 0.0	PV 26.3
SP 7.00	SP 40.0	SP 200	SP 1.0	SP 1.5	SP 0.0	SP 0.0	SP 25.0
OU -100.0	OU 36.5	OU 11.7	OU 0.0	OU 0.0	OU 0.0	OU 0.0	OU -100.0



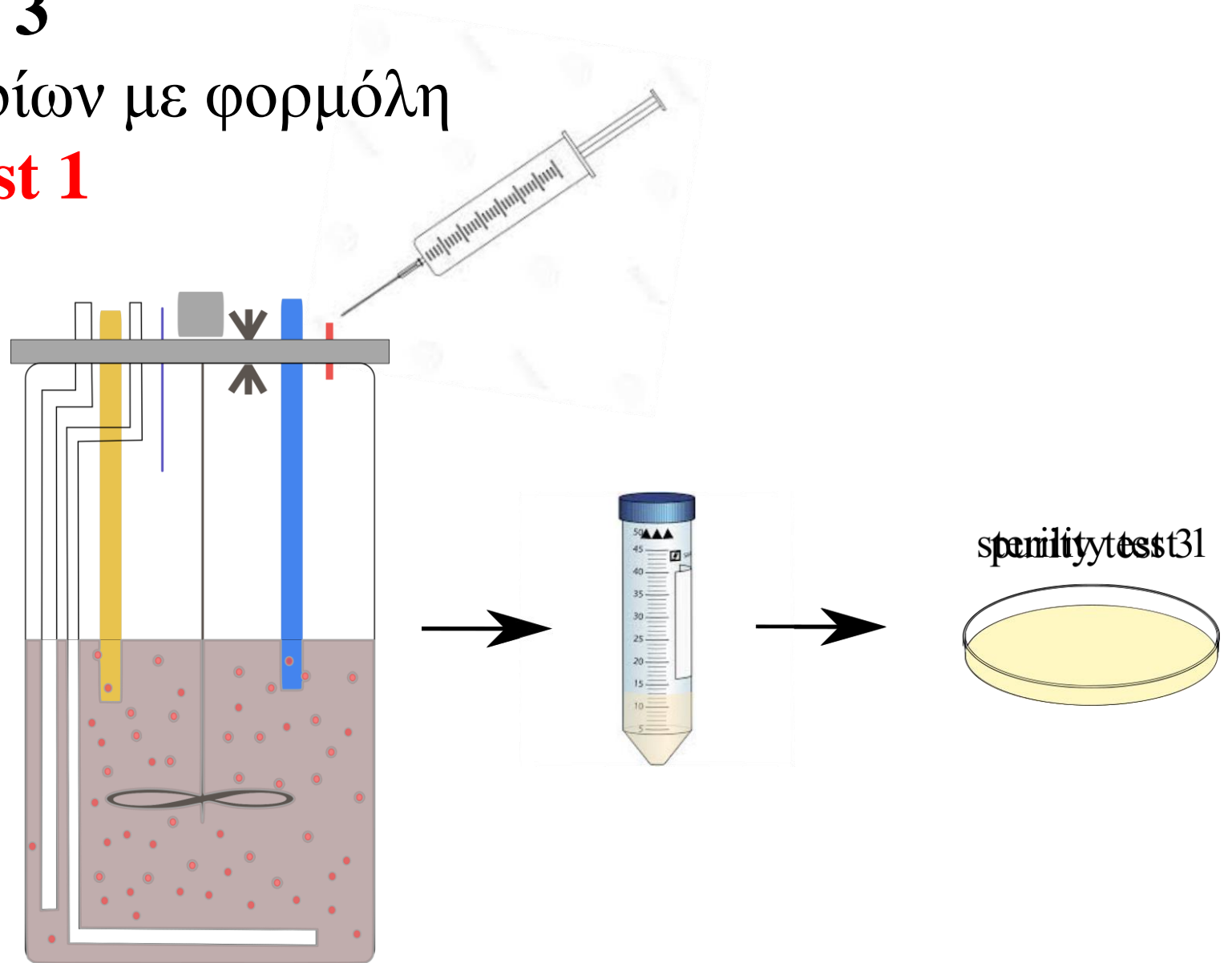
Summary Single Export
SAMPLE RATE 60 Sec DISPLAY TIME 1 Day
Zoom ← Read → Clear

📄 🧪 📈 🔗 🌐 🔍 🔔
🖥️ 🗄️ 🔧 👤

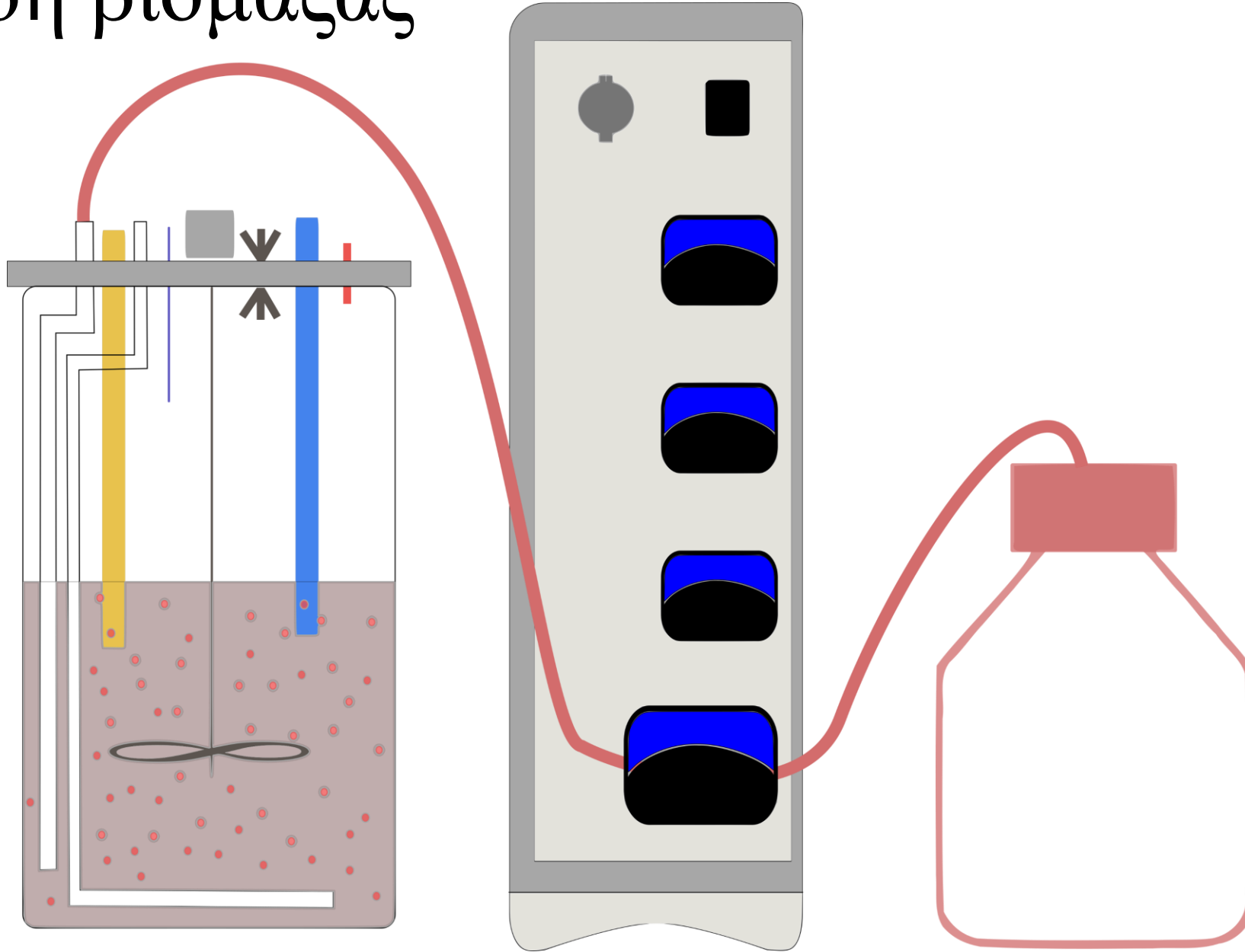
EFT(HH:MM) 00:00

15 Jun 2023 07:44

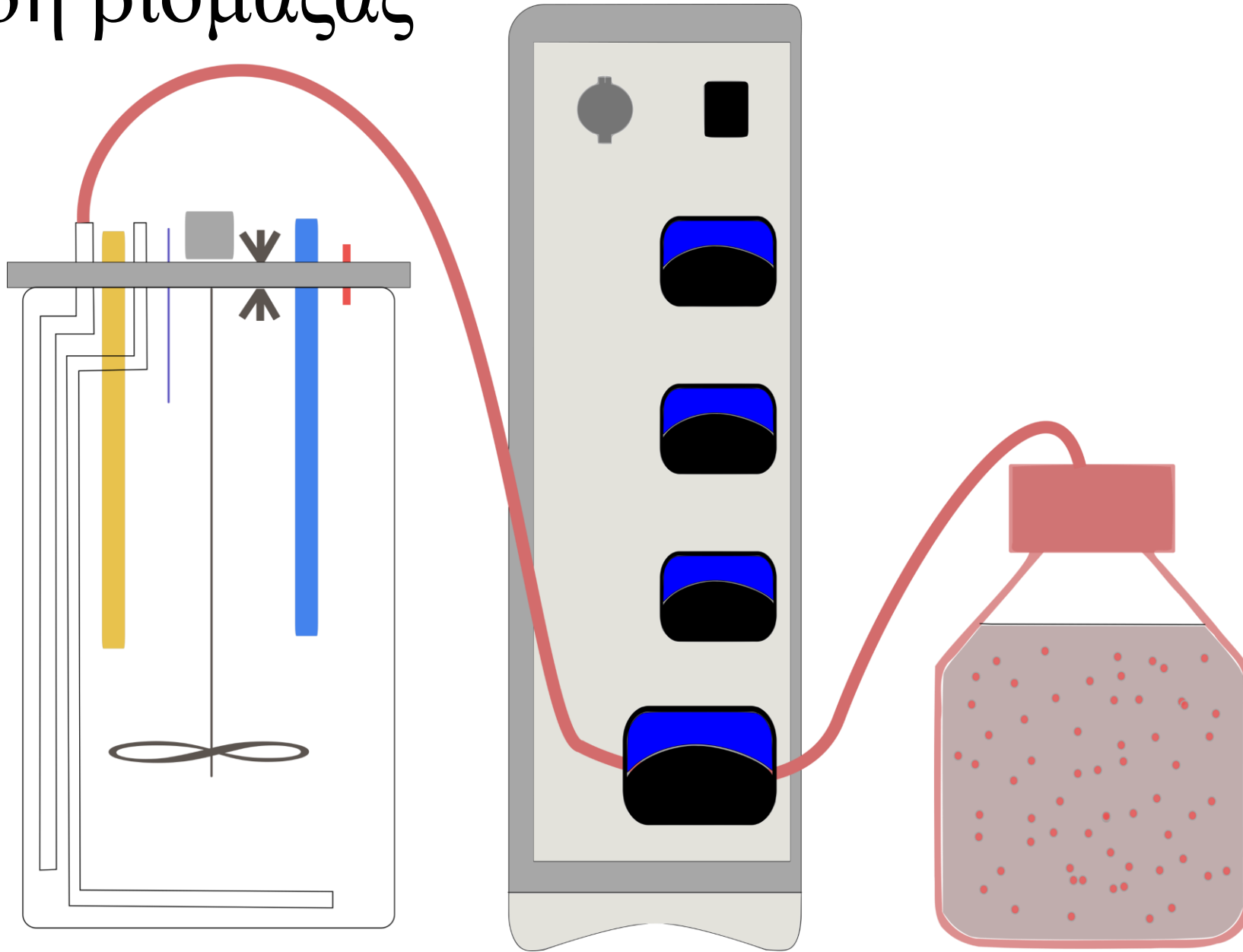
- Δείγμα για **purity test 3**
- Εξουδετέρωση βακτηρίων με φορμόλη
- Δείγμα για **sterility test 1**



Συγκομιδή βιομάζας



Συγκομιδή βιομάζας



Συλλογή της τελικής βιομάζας

Φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση του θρεπτικού και της φορμόλης

Ανασύσταση και συμπύκνωση με φυσιολογικό ορό



Έκπλυση με φυσιολογικό ορό

- **Sterility test 2**
- Μέτρηση βιομάζας
- Αποθήκευση

Συγκέντρωση βιομάζας *V. harveyi* : $\sim 10^{11}$ cfu ml⁻¹

Παρασκευή εμβολίων

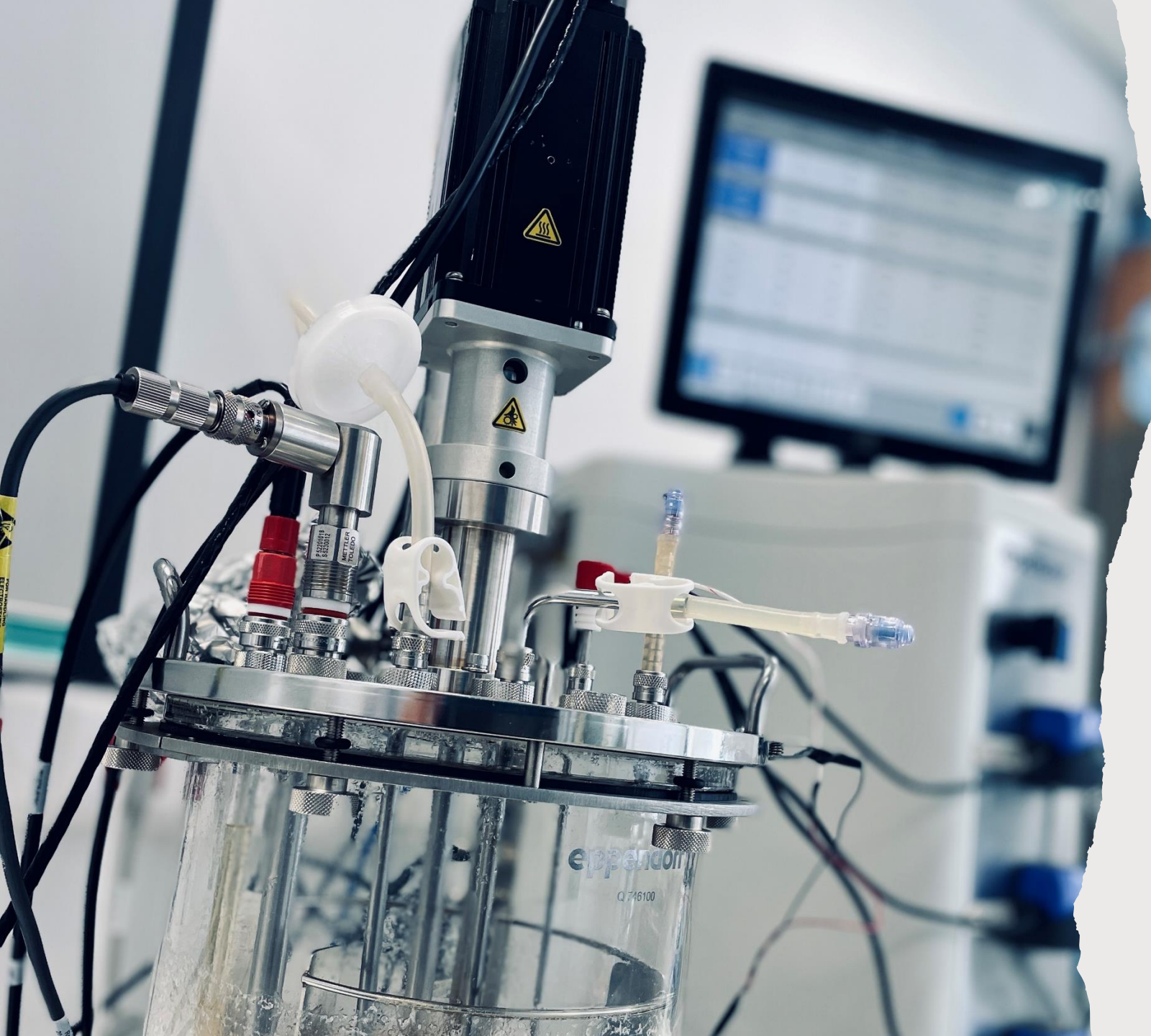
Υδατοδιαλυτά για εμβάπτιση

- Αραίωση της βιομάζας σε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό (βακτηρίνη) ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση βακτηρίου 10^9 cfu mL⁻¹

Ενέσιμα εμβόλια με τη χρήση ανοσοενισχυτικών

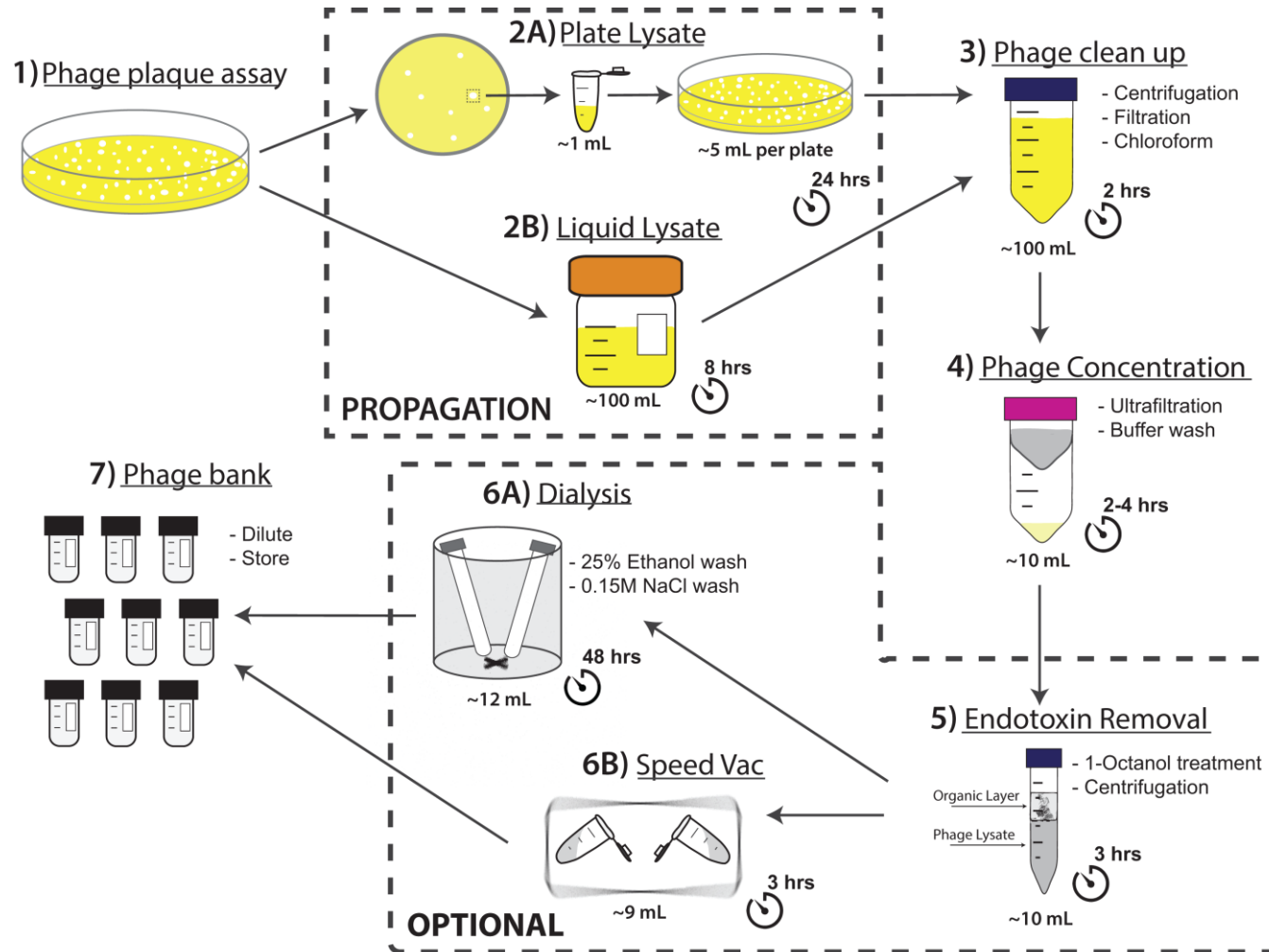
- Αραίωση της βιομάζας σε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό (βακτηρίνη)
- Ανάμιξη με ανοσοενισχυτικό Montanide 763 A VG με τη χρήση ειδικού ομογενοποιητή υψηλής απόδοσης MICCRA D-9 high shear mixer με ειδική κεφαλή για παρασκευή γαλακτωμάτων
- Ανάμιξη με ανοσοενισχυτικό Gel 01 της SEPPIC



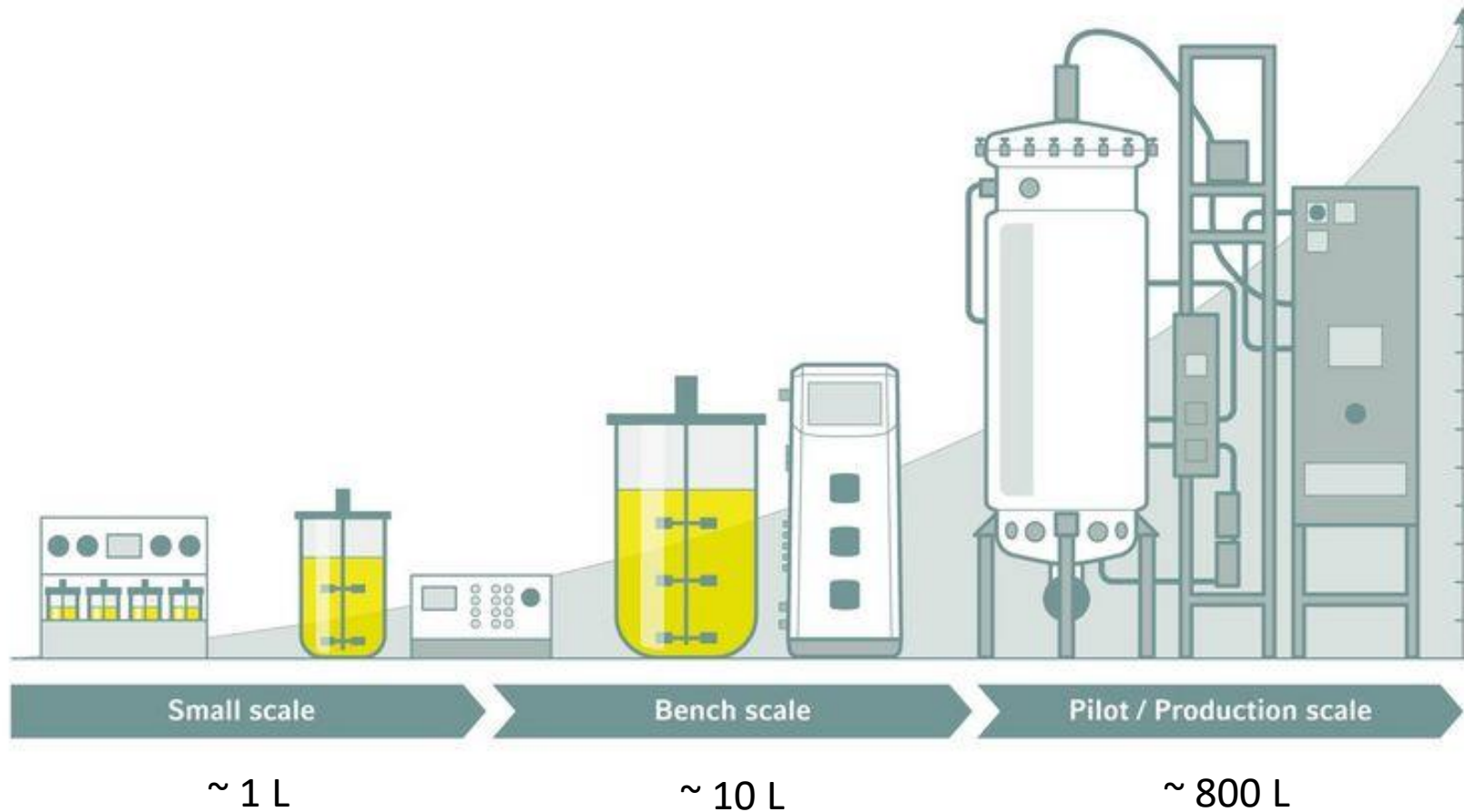


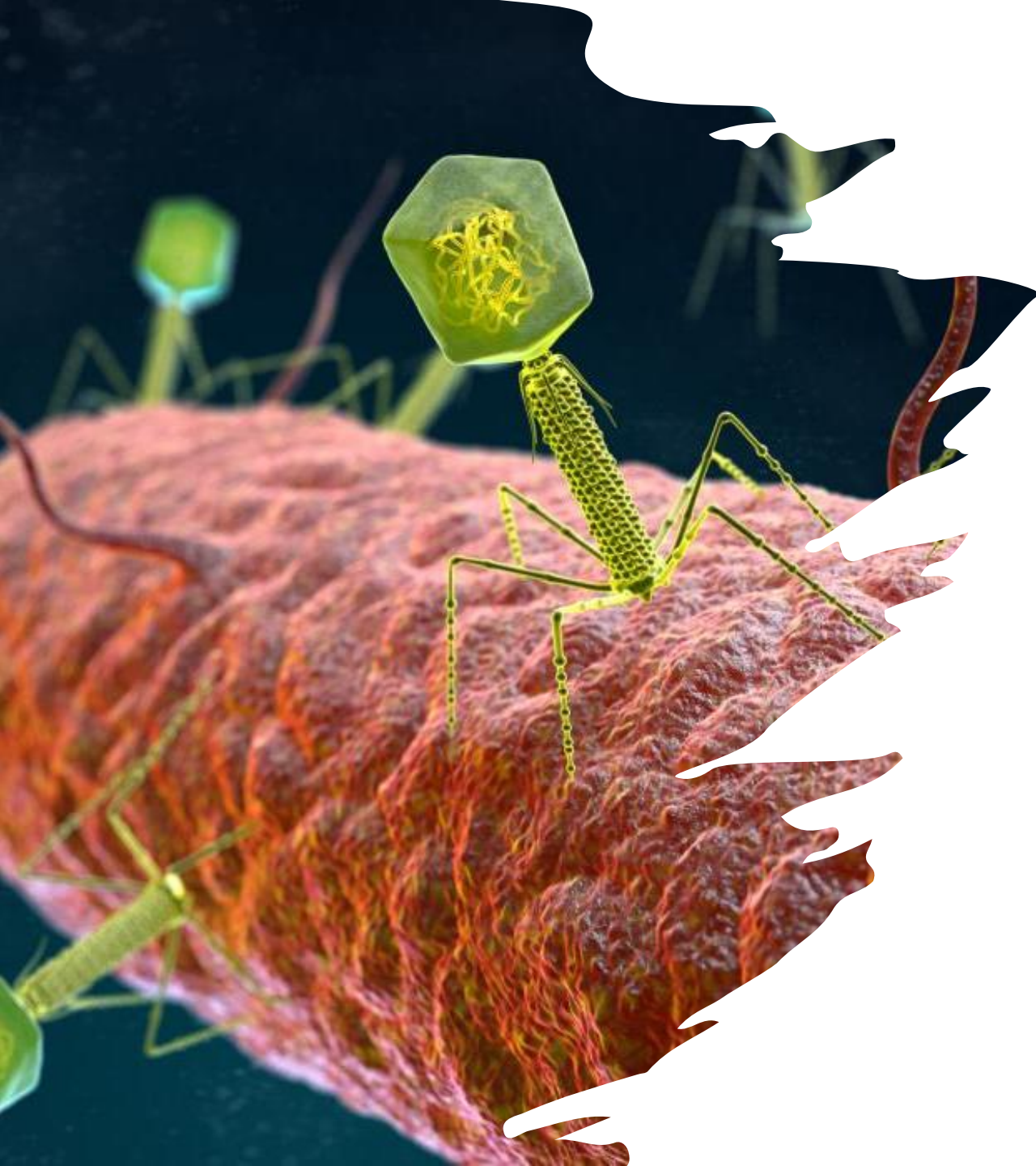
Παραγωγή
βακτηριοφάγων σε
βιοαντιδραστήρες

Αύξηση φάγων σε εργαστηριακή κλίμακα



Παραγωγή φάγων σε μεγάλη κλίμακα





Βακτήριο - ξενιστής

- Ρυθμός ανάπτυξης
- Υποδοχείς
- Μεταβολική δραστηριότητα
- Στάδιο στον κύκλο ζωής

Βακτηριοφάγο

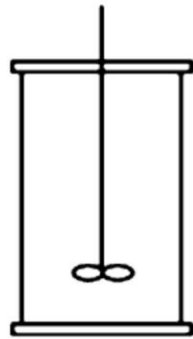
- Ρυθμός προσρόφησης
- Μέγεθος έκρηξης
- Χρόνος λύσης

Άλλοι παράγοντες

- Φορτίο μόλυνσης
- MOI
- Συνθήκες καλλιέργειας (θερμοκρασία, pH, αερισμός, ανάδευση, παρουσία ιόντων)

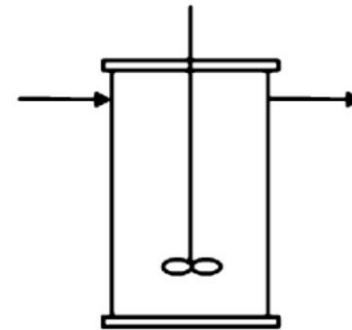
Τύποι βιοαντιδράστηρων

A



Διαλείποντος έργου ή ασυνεχούς λειτουργίας

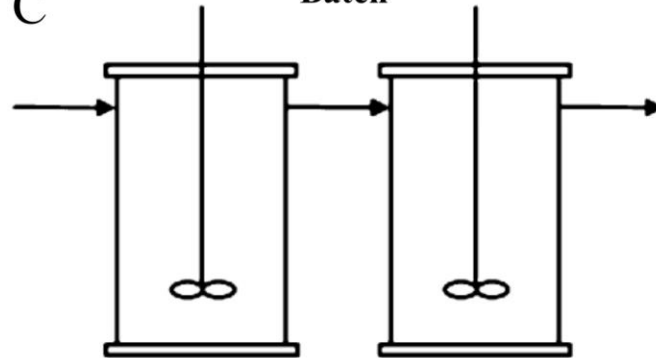
B



Συνεχούς λειτουργίας

C

Batch



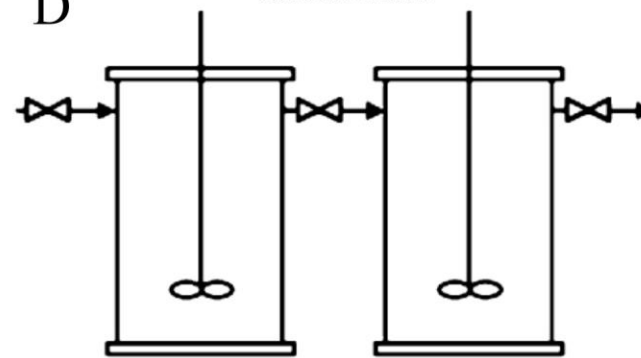
Stage 1
Host Growth

Stage 2
Host Infection

Συνεχούς λειτουργίας δύο σταδίων
Two-stage Continuous

D

Continuous



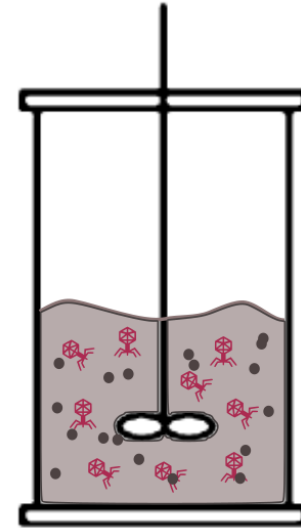
Stage 1
Host Growth

Stage 2
Host Infection

Επαναλαμβανόμενης λειτουργίας δύο σταδίων
Two-stage cycling

Βιοαντιδράστρες διαλείποντος έργου

- Σταθερός όγκος
- Δεδομένο αρχικό ΜΟΙ
- Τερματισμός λειτουργίας όταν ο φάγος κυριαρχήσει
- Βέλτιστες συνθήκες μόλυνσης (ΜΟΙ, όγκος και φορτίο μόλυνσης)



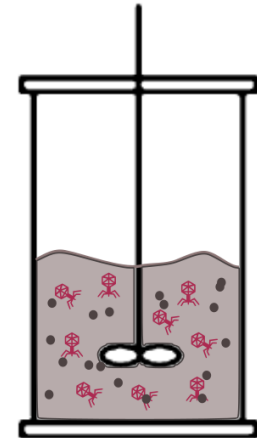
Βιοαντιδράστηρες διαλείποντος έργου



- Σχετικά υψηλοί τίτλοι
- Σταθερότητα της διαδικασίας
- Σχετική ευκολία στη λειτουργία και τον έλεγχο



- Χρόνος διακοπής για την προετοιμασία
- Η παραγωγή περιορίζεται από τον μέγιστο διαθέσιμο όγκο του εξοπλισμού
- Πιθανές διακυμάνσεις από παρτίδα σε παρτίδα



Πρόληψη δονακίωσης οφειλόμενης στο *Vibrio harveyi* με καινοτόμα εργαλεία
pRevention Of viBriosis caUSed by Vibrio harveyi with innovative Tools – ROBUST

ΥΕ3.2 Παραγωγή κοκτέιλ φάγων



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Ταμείο
Περιφερειακής Ανάπτυξης



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΝΔΥΣΕΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΕΤΠΑ & ΤΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΑΝΕΚ

ΓΓΕΚ
ΓΕΝΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ
ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑΣ

ΕΠΑνεΚ 2014-2020
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ

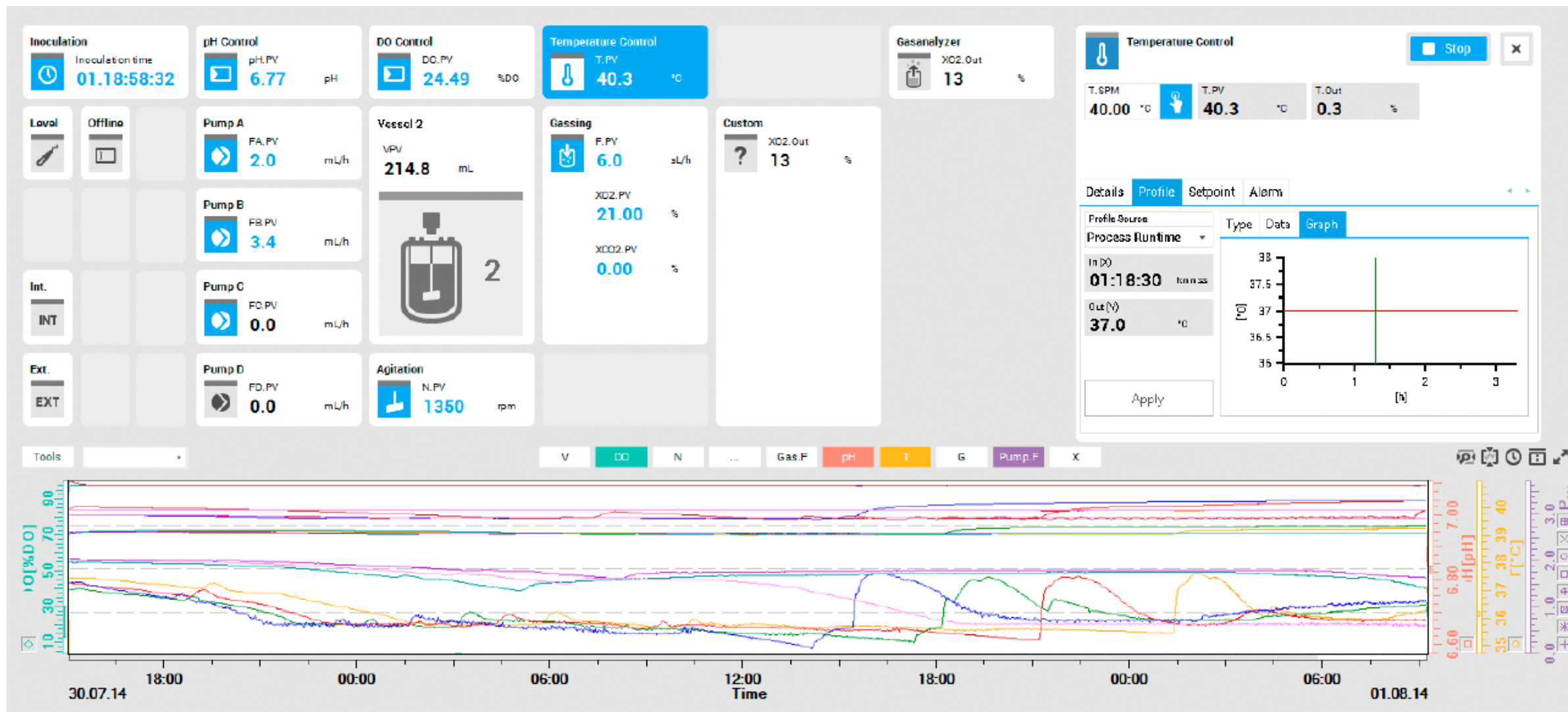


Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Δοκιμές με το σύστημα DASbox mini-bioreactor της Eppendorf

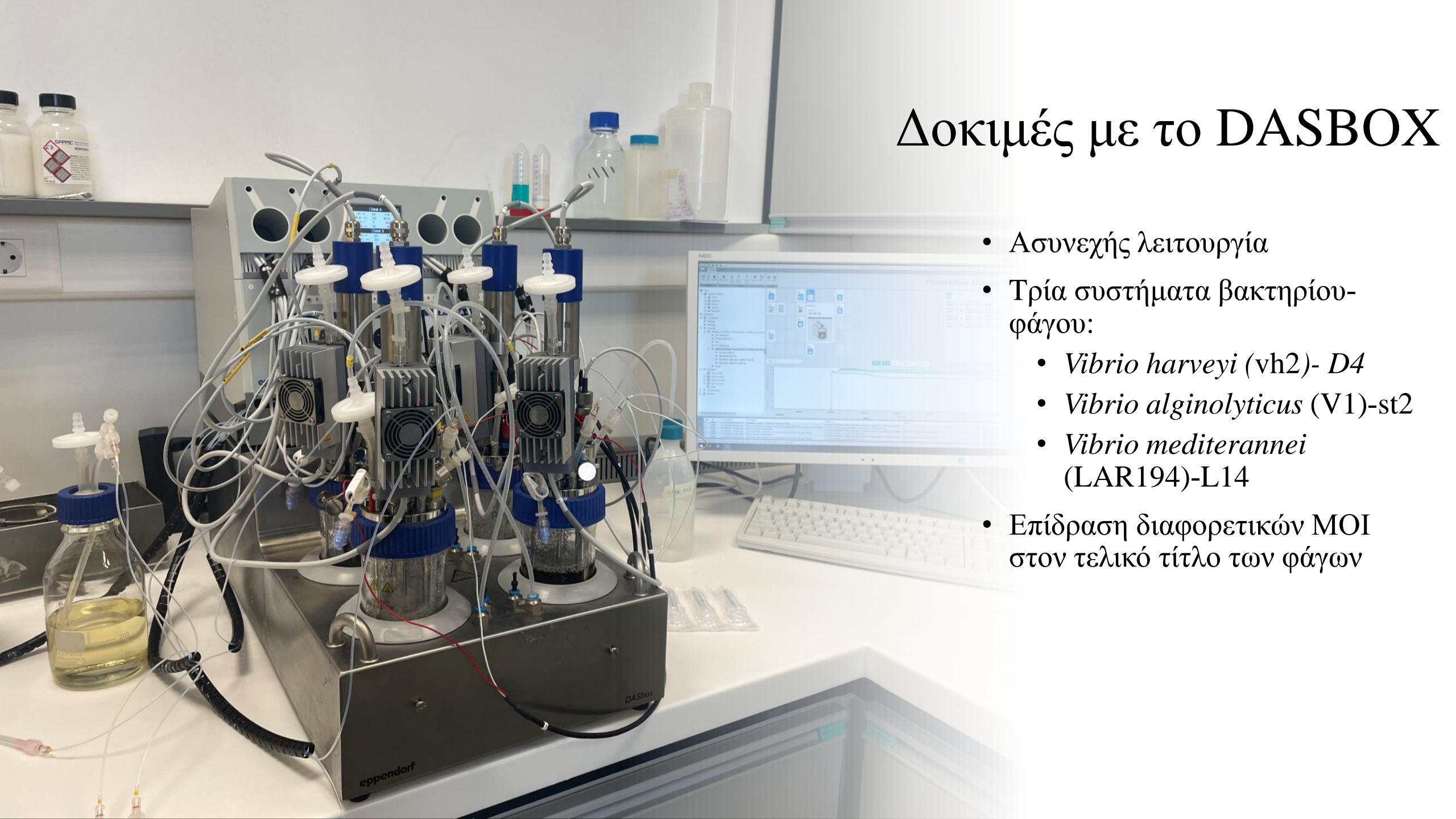


Εγκατάσταση του συστήματος DASbox mini-bioreactor της Eppendorf στο ΕΛΚΕΘΕ



Δοκιμές με το DASBOX

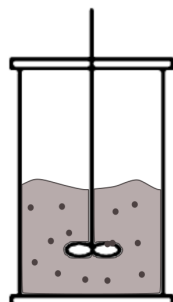
- Ασυνεχής λειτουργία
- Τρία συστήματα βακτηριουφάγου:
 - *Vibrio harveyi* (vh2)- D4
 - *Vibrio alginolyticus* (V1)-st2
 - *Vibrio mediterannei* (LAR194)-L14
- Επίδραση διαφορετικών MOI στον τελικό τίτλο των φάγων



Πορεία εργασιών

Προετοιμασία αντιδραστήρων

- Συναρμολόγηση
- Καλιμπράρισμα
- Αποστείρωση



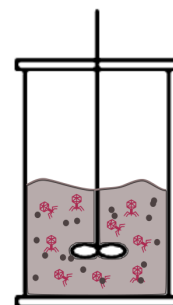
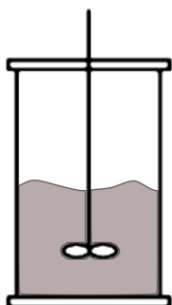
Μόλυνση με φάγο

- Καταγραφή OD
- Τιτλοδότηση



Εμβολιασμός με ο/η καλλιέργεια βακτηρίου στόχου

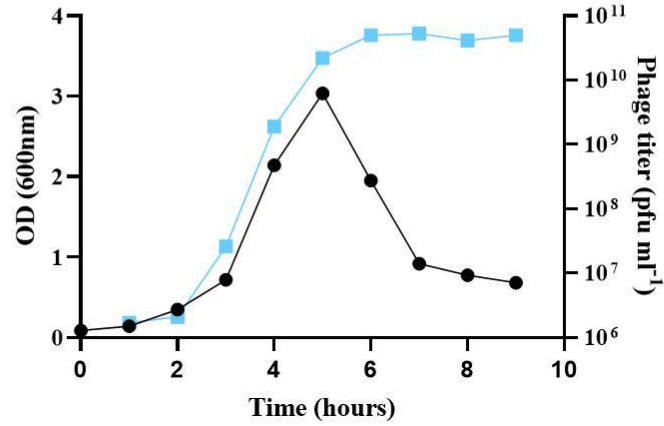
- Καταγραφή OD



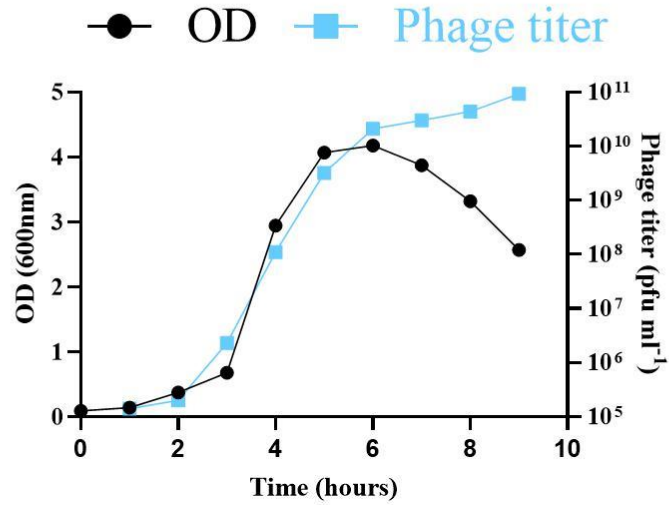
Συλλογή φάγου

- Φυγοκέντρηση
- Φιλτράρισμα
- Τιτλοδότηση
- Αποθήκευση

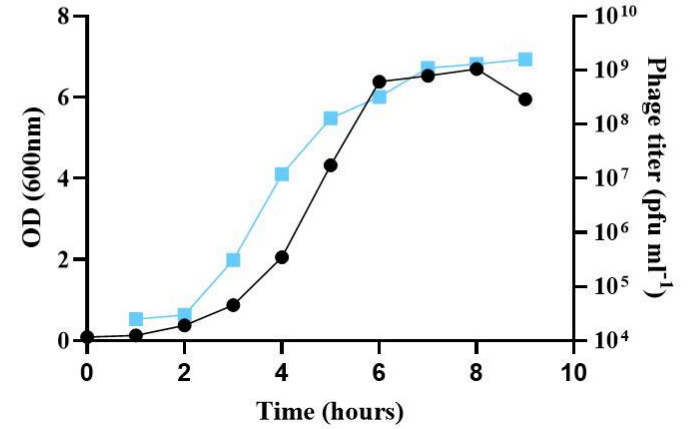
MOI 0.1



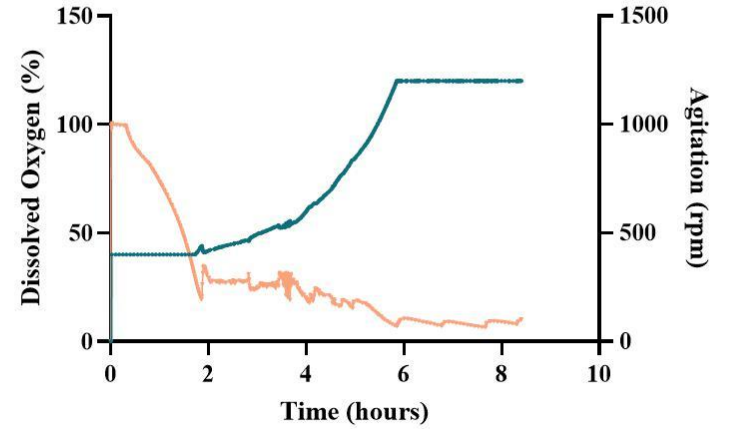
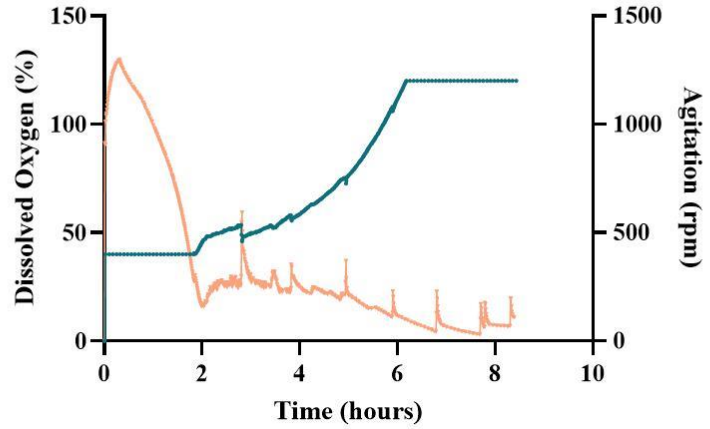
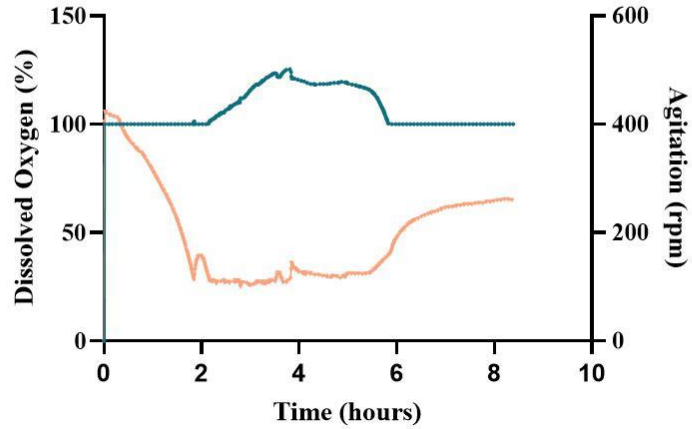
MOI 0.01



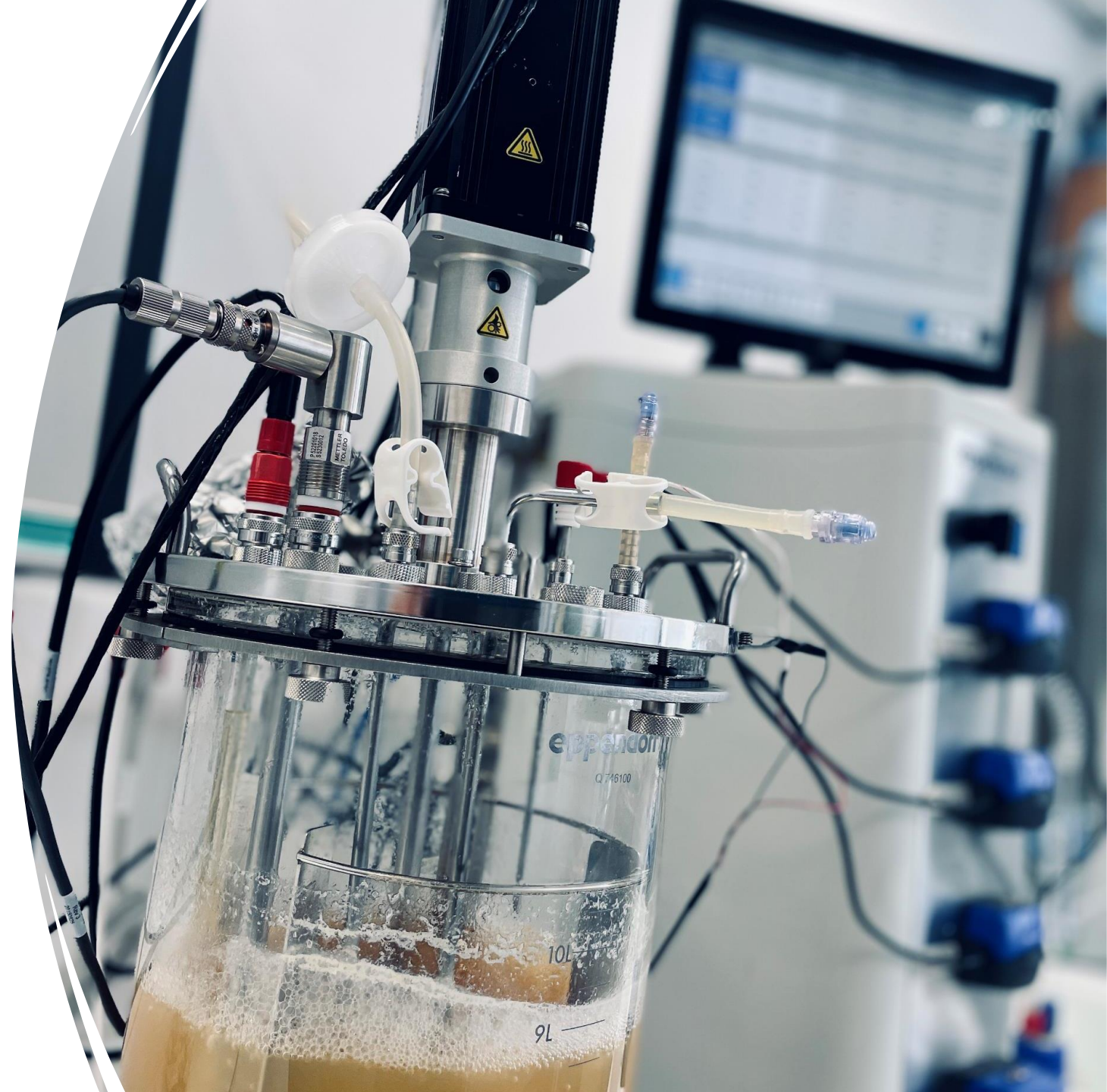
MOI 0.001



—●— OD —■— Phage titer
—○— DO (%) —□— Agitation

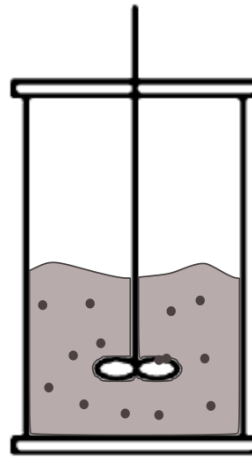


Παραγωγή φάγων σε μεγάλη κλίμακα



Παραγωγή φάγου σε μεγάλη κλίμακα

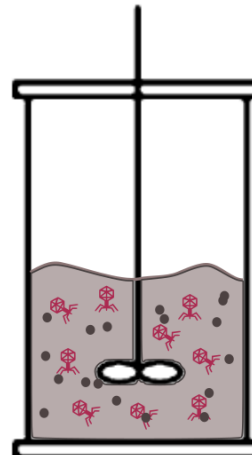
Αύξηση βακτηρίου



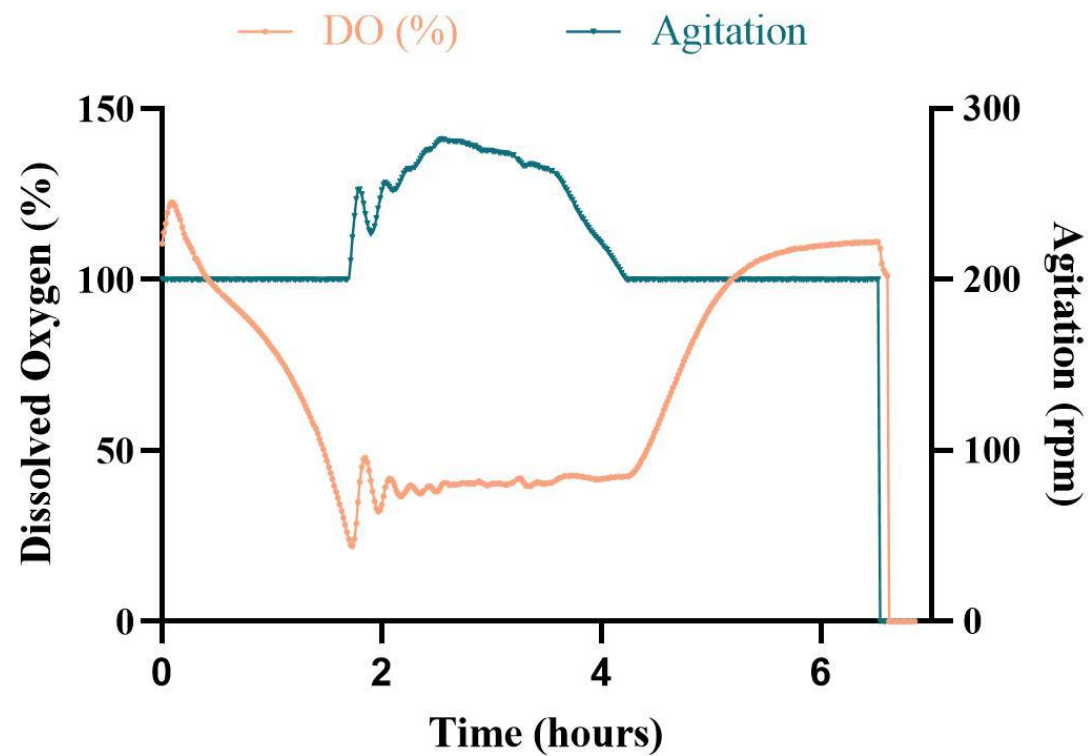
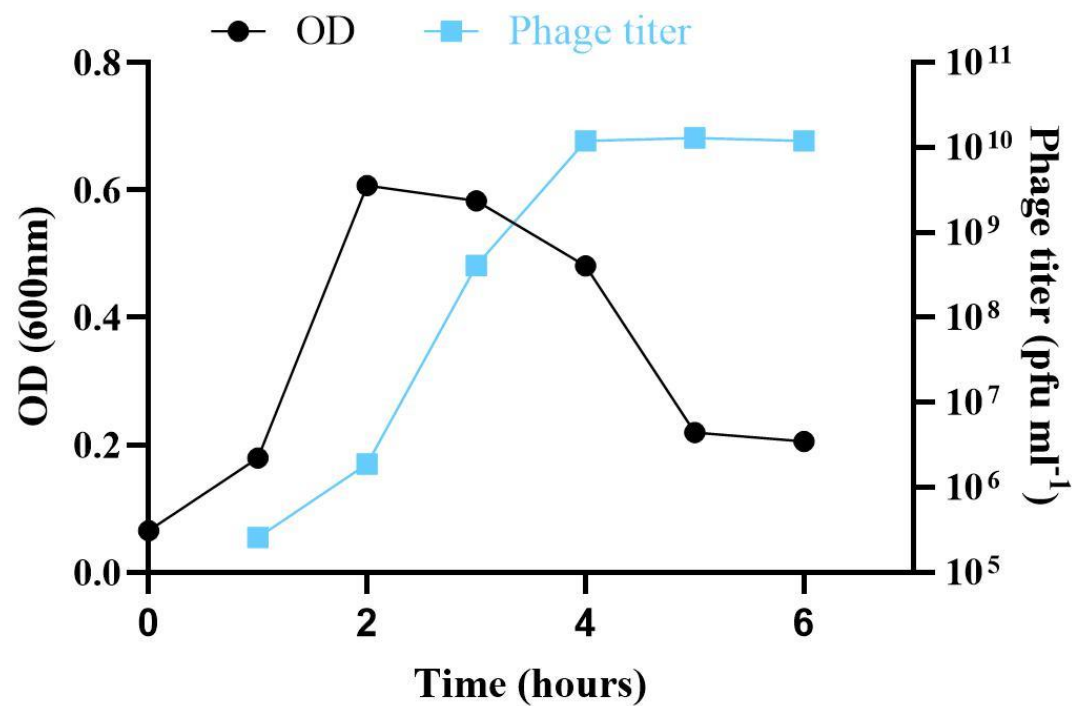
Θρεπτικό: BHI 2%
Όγκος: 5 L
Αρχικό pH: 7.5
DO setpoint: 40%
T: 25°C

Μόλυνση με φάγο

MOI 0.1

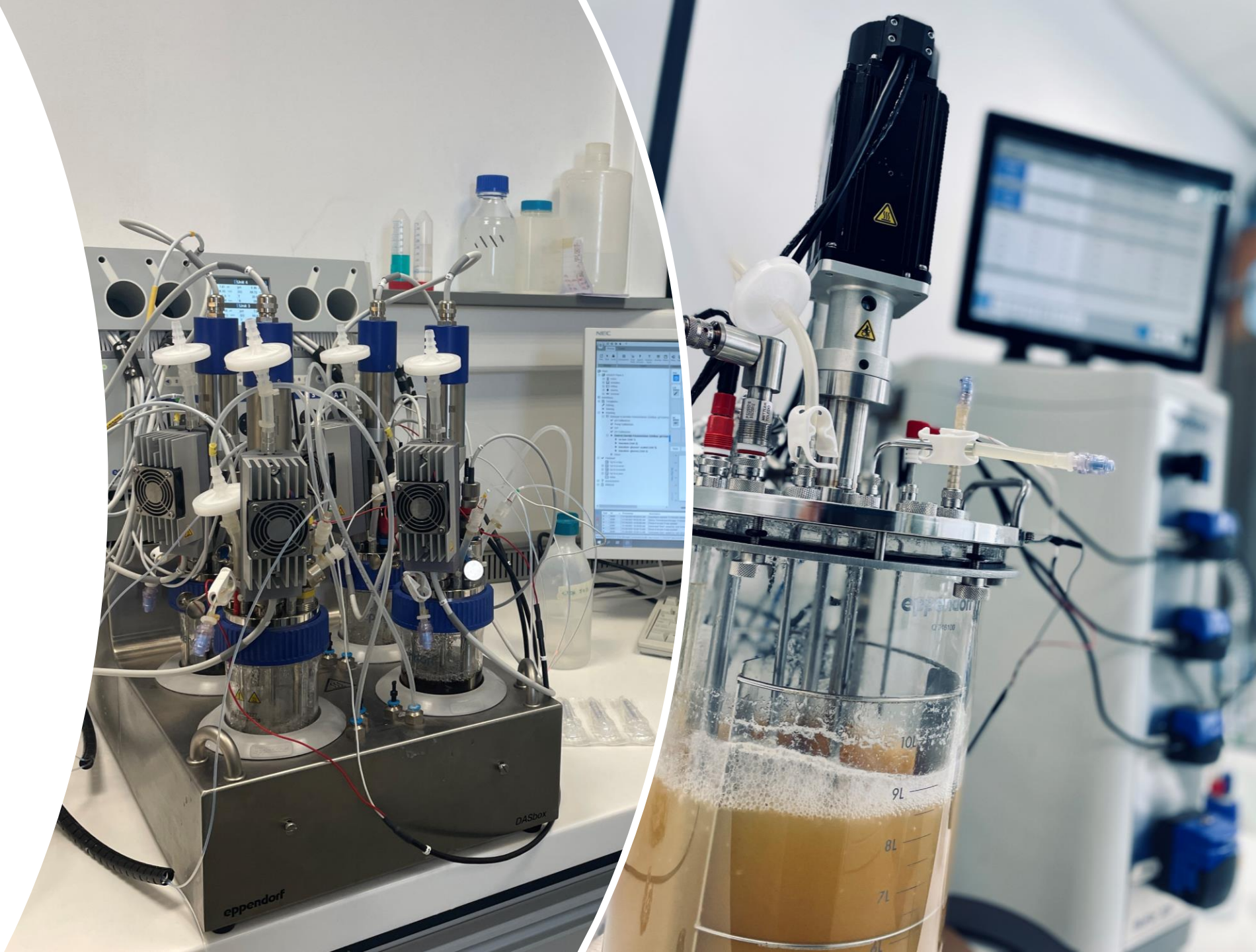


Όγκος μόλυνσης: 50 mL



Μελλοντικά

- Βελτιστοποίηση συλλογής του φάγου
- Βελτιστοποίηση περαιτέρω συνθηκών





AQUATIC BIOLOGICALS
AQUACULTURE HEALTH



 **IRIDA**

Σας ευχαριστώ
πολύ

