

تولید آزمایشگاهی واکسن توکسوئید- باکترین پنج ظرفیتی کلستریدیائی و مقایسه آن با واکسن باکترین مرسوم

• رضا پیله‌چیان لنگرودی (نویسنده مسئول)

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

• احمدرضا جباری

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

• محسن موسوی شوشتری

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

• علیرضا پردیس

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۹۲ تاریخ پذیرش: دی ماه ۹۲

Emali: r.pilehchian@rvsri.ac.ir

چکیده

کلستریدیوم‌ها باکتری‌های بی‌هوازی گرم مثبت هاگ دار بوده و نقش مهمی در ایجاد بیماری‌های انسان و دام دارند. در این پژوهش سه گروه واکسن شامل، واکسن پنج ظرفیتی باکترین (کشت فرمله) تولید شده در شیشه‌های بیست لیتری و جذب شده روی یاور هیدروکسید آلومینیوم، واکسن پنج ظرفیتی باکترین تولید شده در فرمانتور تحقیقاتی و جذب شده روی هیدروکسید آلومینیوم و گروه سوم واکسن پنج ظرفیتی کشت توکسوئید-باکترین (واکسن اولترافیلتری) تولید شده در فرمانتور تحقیقاتی و جذب شده روی یاور هیدروکسید آلومینیوم در سطح آزمایشگاهی تولید و بررسی شد. کلیه آزمون‌های بیضری، عدم وجود سمیت غیر عادی و توان ایمنی زائی، برای هر یک از سه نوع واکسن انجام شد. نتایج نشان داد که هر سه نوع واکسن کارآئی داشته و قابل استفاده اند ولی واکسن توکسوئید-باکترین تولید شده به وسیله فرمانتور و اولترافیلتر، بهترین انتخاب برای تولید انبوه است.

کلمات کلیدی: واکسن پنج ظرفیتی، کلستریدیوم، توکسوئید، فرمانتور، اولترافیلتراسیون

• Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 106 pp: 34-42

A Production of pentavalent Clostridial toxoid vaccine and its comparison to conventional bacterin vaccine

By: Pilehchian Langroudi, R., (Corresponding Author), Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Jabbari, A.R., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Moosawi Shoshatory, M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Pardis A., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Received: August 2013

Accepted: January 2014

Email: r.pilehchian@rvsri.ac.ir

Genus *Clostridium*, gram positive spore forming anaerobes are very important bacteria for human and animals pathogenesis. Clostridial diseases frequently occurs in Iranian farms and different Clostridium species are responsible for high mortality in domestic animals like as sheep and goats. In the present study, three groups of experimental vaccines were produced and compared to each others. The 1st group as bacterin pentavalent vaccine was produced in 20 liters glass vessels and adsorbed on aluminium hydroxide adjuvant. The 2nd group as bacterin pentavalent vaccine has been produced within in 12 liters fermenter and adsorbed on aluminium hydroxide adjuvant. Finally, the 3rd group as bacterin-toxoid pentavalent vaccine was produced in 12 liters fermenter and adsorbed on aluminium hydroxide adjuvant. Analysis for freedom from abnormal toxicity, safety and potency tests were performed for all produced vaccine groups. The results showed that the 3rd group of produced vaccine by fermenter and purified by ultrafiltration system is the best choice for scaling up.

Keywords: Pentavalent vaccine, *Clostridium*, Toxoid, Fermenter, Ultrafiltration

مقدمه

بیماری‌های ناشی از باکتری‌های بی‌هوازی نه تنها به طور مستقیم و غیر مستقیم باعث مرگ و میر در دام می‌شوند، بلکه باعث کاهش رشد و تولید فرآورده‌های دامی نیز می‌گردند. این بیماری‌های در اغلب دامداری‌های ایران وجود داشته و موجب تلفات سنگین در گله‌های گوسفند و بز می‌گردد. اگرچه رعایت نکات بهداشتی همانند جلوگیری از پر خوری شیر در بره‌ها، جلوگیری از پر خوری علوفه تازه و یخ زده در هنگام تغذیه دام در مزارع و خوراندن قرص‌های ضد کرم‌های کبیدی به گوسفند آن جوان، توسط دامداران می‌تواند نقش مهمی در کاهش بیماری‌های ناشی از باکتری‌های بی‌هوازی در دامداری‌ها داشته باشد، ولی براساس استانداردهای موجود، واکسیناسیون برای پیشگیری از بیماری‌های کلاستریدیائی ضروری بوده و استفاده از واکسن بهترین راه مقابله با بیماری‌های کلاستریدیائی است (۱۸، ۱۹).

واکسن‌های کلاستریدیائی رایج به طور معمول به صورت باکترین (سوسپانسیون کشت فرمله)، توکسوئید یا توکسوئید-باکترین (مخلوط چند توکسوئید و کشت فرمله) ساخته می‌شوند (۹). در استانداردهای بین المللی میزان آنتی بادی محافظت کننده در برابر توکسین اِپسِلون برابر یا بیشتر از ۵ IU/ml و برای توکسین بتا برابر یا بیشتر از ۱۰ IU/ml مطرح شده است، بنابراین تکثیر کلاستریدیوم‌ها و تولید توکسین و تبدیل آن به توکسوئید و تولید واکسن ایمنی زای حاوی حداقل میزان آنتی بادی‌های محافظت کننده بالا، بسیار سودمند بوده و باید مورد توجه قرار گیرد (۸). واکسن‌های کلاستریدیائی متنوعی در کشورهای مختلف تولید و به بازار عرضه می‌گردد همانند: Besorvax (محصول ماداگاسکار، شامل کلاستریدیوم

باکتری‌های بی‌هوازی به دو گروه تقسیم می‌شوند، باکتری‌های بی‌هوازی بدون هاگ که در تولید بعضی بیماری‌ها و عفونت‌های انسان و دام اهمیت دارند و باکتری‌های بی‌هوازی هاگ دار که مهمترین جنس آن کلاستریدیوم است. تاکنون بیش از ۱۱۸ گونه کلاستریدیوم شناسائی شده که در طبیعت و همچنین در دستگاه گوارش انسان و دام زندگی می‌کنند، از این تعداد حدود ۱۵ گونه برای انسان و دام بیماری‌زا بوده و چنانچه شرایط زندگی و رشد آنها در بدن موجود زنده و حساس فراهم گردد سرعت تکثیر شده و با ترشح توکسین بیماری‌های خطرناک و کشنده‌ای ایجاد می‌کنند. برخی از بیماری‌های مهم کلاستریدیائی در انسان عبارتند از مسمومیت غذایی، گازگانگران، عفونت رحم و سقط جنین که به وسیله کلاستریدیوم پرفرینجنز تیپ A، پیگل که به وسیله کلاستریدیوم پرفرینجنز تیپ B و آنتریت نکروتیک که به وسیله کلاستریدیوم پرفرینجنز تیپ C ایجاد می‌شوند. در بیماری‌های دامی کلاستریدیوم پرفرینجنز تیپ B در اسهال عفونی بره‌های نوزاد، آنتریت نکروتیک کره اسب و آنتروتوکسمی گوسفند و بز در ایران، کلاستریدیوم پرفرینجنز تیپ C در آنتروتوکسمی گوسفند، آنتریت نکروتیک بچه خوک و آنتروتوکسمی گوساله، کلاستریدیوم پرفرینجنز تیپ D در ایجاد آنتروتوکسمی بره و گوسفند بالغ، کلاستریدیوم پرفرینجنز تیپ E در آنتروتوکسمی گاو، کلاستریدیوم شووآی در شاربن علامتی گاو، کلاستریدیوم سپتیکوم در براکسی گوسفند و کلاستریدیوم نووآی در بروز قانقارای عفونی کبد گوسفند و بز دخالت دارند (۶، ۷، ۱۱، ۱۵، ۱۷، ۱۸).

۶- ایجاد شرایط بی‌هوازی: در مراحل آماده‌سازی سوش، از دستگاه آنوکسومات کمپانی Mart هلند واجد کپسول گاز حاوی، H_2 ۱۰ درصد، CO_2 ۱۰ درصد و N_2 ۸۰ درصد و جار بی‌هوازی مخصوص آنوکسومات، برای ایجاد شرایط بی‌هوازی مطلق استفاده گردید.

۷- آماده‌سازی سویه‌ها برای تلقیح: هر یک از سویه‌های کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ‌های B, C, D، کلستریدیوم سپتیکوم و کلستریدیوم نووآی فریزدرای شده، به‌طور جداگانه با استفاده از بویون مغذی از آمپول لیوفلیزه برداشت و به لوله آزمایش حاوی محیط جگر انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در جار بی‌هوازی آنوکسومات در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس به ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت جگر منتقل و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در جار بی‌هوازی آنوکسومات در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. کنترل استریلیتی در کلیه موارد فوق با استفاده از بویون مغذی، ژلوز مغذی و مشاهده مستقیم با میکروسکوپ صورت گرفت.

الف- کشت در ظروف شیشه‌ای

از ظروف شیشه‌ای پیرکس بیست لیتری برای این منظور استفاده شد. ۱۶ لیتر محیط‌های کشت موضوع بند ۱ به‌طور جداگانه به ظروف شیشه‌ای بیست لیتری منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل و pH آن روی ۷/۵ تنظیم شد. پس از نمونه‌گیری و انجام کنترل‌های استریلیتی ۸۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون فعال در هر ظرف شیشه‌ای تلقیح شده و تکثیر باکتری بمدت ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت (ب) ترتیب بترتیب برای کلستریدیوم پرفرینجنز، کلستریدیوم سپتیکوم و کلستریدیوم نووآی) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بدون تنظیم pH در شرایط ساکن صورت پذیرفته و پس از پایان دوره رشد pH به حدود ۶ تا ۶/۵ سقوط میکرد. در این مرحله نمونه سوسپانسیون فعال باکتری جهت انجام آزمون حداقل دز کشنده برداشت و با افزودن فرمالدئید به نسبت ۰/۶ درصد، فرآیند دتوکسیفیکاسیون آغاز گردید. در ادامه pH روی ۷ تنظیم شده و سوسپانسیون فرم‌له شده بمدت ۱۰ روز در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس برای ۲ ماه در سردخانه ۴-۸ سانتی‌گراد قرار داده شد.

ب- کشت در فرمانتور

در این مرحله از فرمانتور تحقیقاتی دوازده لیتری ساخت ایران مجهز به همزن در کف محفظه و پمپ پرستالینک جهت انتقال مواد مورد تلقیح به درون محفظه فرمانتور، استفاده شد. ۸ لیتر از محیط‌های کشت موضوع بند های ۲، ۳ و ۴ به درون محفظه فرمانتور انتقال یافته و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل می‌گردید، سپس فرآیند سرد کردن فرمانتور آغاز و از محیط کشت نمونه گرفته شد و از آن برای کنترل استریلیتی محیط کشت فرمانتور استفاده شد. تکثیر باکتری پس از تلقیح در یک دوره ۶ تا ۱۶ ساعته انجام می‌شد و در پایان این دوره نمونه کشت غیر فرم‌له برداشت و برای سایر فعالیت‌ها در نظر گرفته شد. سپس با افزودن فرمالدئید به نسبت ۰/۶ درصد به سوسپانسیون فعال، فرآیند دتوکسیفیکاسیون آغاز و پس از ۵ روز انکوباسیون و دتوکسیفیکاسیون در داخل فرمانتور، سوسپانسیون فرم‌له شده به ظروف شیشه‌ای ۱۰

سپتیکوم و شووآی)، Barvac ۸ (محصول بهرینگ، حاوی توکسوئیدهای کلستریدیوم شووآی، سپتیکوم، همولیتیکوم، نووآی، سوردلی، پرفرینجنز تیپ‌های D و Ultra choice)، (C ۷) (محصول فایزر، شامل کلستریدیوم نووآی، شووآی، سپتیکوم، سوردلی و پرفرینجنز تیپ‌های D و C است). واکسن شاربن علامتی گاو به‌عنوان اولین واکسن کلستریدیائی تولید شده در ایران در سال ۱۳۱۴ به بازار وارد شد، سپس واکسن چند ظرفیتی آنروتوکسمی گوسفند و بز در سال ۱۳۲۳ تولید گردید و با شناسایی تدریجی بیماری‌های ناشی از باکتری‌های بی‌هوازی دام و ارتقاء روش تولید، سایر واکسن‌های بی‌هوازی مورد نیاز کشور نیز در موسسه رازی تولید گردید، در حال حاضر واکسن باکترین چهار ظرفیتی آنروتوکسمی گوسفند و بز، حاوی واکسن اسهال عفونی بره‌های نوزاد (کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B)، واکسن استراک یا آنروتوکسمی گوسفند‌های جوان (کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C)، واکسن قلوه نرمی بره و گوسفند (کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D) و واکسن براکسی گوسفند (کلستریدیوم سپتیکوم)، همچنین واکسن تک ظرفیتی قانقاریای عفونی کبد گوسفند (کلستریدیوم نووآی) و واکسن شاربن علامتی گاو (کلستریدیوم شووآی) در موسسه رازی تولید می‌شود (۱۳ و ۴-۱). با توجه به اینکه مصرف واکسن‌های چند ظرفیتی باکترین و تک ظرفیتی، پرهزینه بوده و مستلزم تزریقات متعدد و صرف وقت و انرژی زیادی است، بنابراین پژوهشی در زمینه تولید واکسن توکسوئیدی چند ظرفیتی بسیار ضروری به نظر می‌رسید. بدین منظور می‌بایست ابتدا توکسین‌های مورد نیاز با استفاده از فرمانتور و ایجاد تغییرات مورد لزوم در محیط کشت و شرایط رشد باکتری تولید و سپس با تغلیظ و تخلیص توکسین‌ها و فرمولاسیون مناسب، واکسن چند ظرفیتی مطابق استاندارد‌های بین‌المللی تولید و کنترل شود.

مواد و روش‌ها

- ۱- محیط‌های کشت عمومی و کنترلی: بویون مغذی، محیط کشت جگر، liver infusion broth (براث مغذی، پیتون، نمک، عصاره جگر چرخ شده و جوشانیده گوساله است، آب دیونیزه و pH نهائی ۷/۵).
- ۲- محیط کشت کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ‌های C و B و کلستریدیوم سپتیکوم: پیتون، Na_2HPO_4 ، نمک NaCl، سیستمین هیدروکلراید، عصاره مخمر، محلول ویتامین و عناصر ضروری و گلوکز ۵۰ درصد با غلظت نهائی ۱ درصد که فرآیند استریل آن جداگانه صورت گرفته و همراه با سوش تلقیح گردید.
- ۳- محیط کشت کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D، پیتون، Na_2HPO_4 ، نمک NaCl، سیستمین هیدروکلراید، عصاره مخمر، محلول ویتامین و عناصر ضروری و محلول دکسترین ۵۰ درصد با غلظت نهائی ۱ درصد که فرآیند استریل آن جداگانه صورت گرفته و همراه با سوش تلقیح گردید.
- ۴- محیط کشت کلستریدیوم نووآی: پیتون، Na_2HPO_4 ، نمک NaCl، سیستمین هیدروکلراید، پودر جگر و محلول مالتوز ۵۰ درصد با غلظت نهائی ۱ درصد که فرآیند استریل آن جداگانه صورت گرفته و همراه با سوش تلقیح گردید.
- ۵- سویه‌های باکتریائی: کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ‌های (CN301) C - (CN228) B - (CN409) D کلستریدیوم سپتیکوم (CN913) و کلستریدیوم نووآی تیپ (CN804) B

هر رقت به دو موش آزمایشگاهی ۱۸ تا ۲۲ گرمی و مشاهده مرگ موش ها طی ۴۸ ساعت صورت گرفت.

۲- آزمون عدم وجود سمیت غیر عادی: (Freedom from Abnormal toxicity) از هر نمونه کشت باکتریایی ۲ ml به هر یک از ۲ سر خوکچه هندی ۳۰۰ تا ۴۰۰ گرمی و ۵ ml / به هر یک از ۵ سر موش ۱۸ تا ۲۲ گرمی تزریق و واکنش های موضعی و سیستمیک حیوانات نظیر آماس و ایجاد چرک و عفونت در ناحیه تزریق، لنگش، بی اشتها، عدم تعادل در هنگام حرکت و خواب آلودگی (به مدت ۵ روز برای موش ها و ۱۰ روز برای خوکچه ها) تحت بررسی قرار گرفت.

۳- آزمون توان ایمنی زائی: (potency) هر یک از کشت های دتوکسیفیکه فوق الذکر ۲ ماه پس از آغاز دتوکسیفیکاسیون مورد آزمون توان ایمنی زائی قرار گرفتند. ارزیابی ایمنی زائی بر اساس استاندارد فارماکوپه اروپا و با تزریق به خرگوش و تعیین میزان آنتی بادی تولید شده در خون به روش آزمون خنثی سازی سرم صورت گرفت. در این ارزیابی از نرمال سالین به عنوان رقیق کنند، توکسین اپسیلون ۳۳ mg/ml / ۰/۳، توکسین بتا ۴ mg/ml / ۰/۴، آنتی توکسین استاندارد اپسیلون (۱ IU/ml) و آنتی توکسین استاندارد بتا (IU/ml) ۱ و سرم خون خرگوش (RPS) استفاده شد. برای تهیه RPS، ۱/۵ میلی لیتر توکسوئید به صورت زیر جلدی به هر خرگوش از یک گروه ۱۰ عددی خرگوش ۳ تا ۶ ماهه تزریق شد. خرگوش ها پس از ۲۱ روز مجدداً مورد تزریق دز مشابهی از توکسوئید (یادآور) قرار گرفتند و ۱۴ روز پس از تزریق دوم خونگیری انجام شد و پس از جدا سازی سرم، میزان آنتی بادی های آن اندازه گیری شد.

۴- برای انجام آزمون خنثی سازی سرم، در ۵ لوله آزمایش در هر لوله ۰/۴ میلی لیتر توکسین و به ترتیب ۵ ml / ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ آنتی توکسین استاندارد افزوده و حجم مخلوط در هر لوله با سرم فیزیولوژی به ۲ ml رسید (این ۵ محلول به نام تست توکسین شناخته می شوند). ۵ لوله دیگر نیز با شرایط یکسانی تهیه شد با این تفاوت که به جای آنتی توکسین استاندارد از حجم های سریالی RPS استفاده شد (۵ محلول RPS برای سنجش آنتی توکسین).

۵- محتویات لوله ها به خوبی مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. سپس از محتویات هر لوله به صورت IV به دو موش و به هر یک ۰/۵ ml تزریق شد و حیوانات ۷۲ ساعت تحت نظر قرار گرفتند.

۶- آزمون بی ضرری (safety): از هر مورد ۵ ml به صورت زیر پوستی در ناحیه بالای کتف به هر یک از دو راس گوسفند سالم تزریق و واکنش های موضعی و سیستمیک حیوانات نظیر آماس چرکی، قرمز شدن و عفونت در ناحیه تزریق، نکروز ناحیه تزریق، لنگش، بی اشتها، عدم تعادل در هنگام حرکت، خواب آلودگی و تب به مدت دو هفته ارزیابی شد.

نتایج

در مرحله آماده سازی سوس، تمامی آزمون های کنترل استریلیتی موفقیت آمیز بود و این نتایج در مشاهدات میکروسکوپی نیز تأیید شد. پس از انجام فرآیند دتوکسیفیکاسیون، بررسی حیوانات آزمایشگاهی در آزمون عدم وجود سمیت غیر عادی (موش ها پنج روز و خوکچه ها ۱۰ روز پس از تزریق) هیچگونه عارضه ای را نشان ندادند. هفت نوع واکسن آزمایشی در سه گروه فرمولاسیون و کنترل شد.

لیتری انتقال یافته و برای مدت ۲ ماه در سردخانه ۸-۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

دتوکسیفیکاسیون

برای دتوکسیفیکاسیون، بر اساس فارماکوپه اروپا به میزان ۰/۶ درصد فرم آلدئید به ترکیب مورد نظر اضافه شد و به مدت یک هفته در دمای آزمایشگاه و به مدت حداقل دو هفته در سردخانه ۴ درجه سانتی گراد تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. سپس آزمایش باقی مانده سمیت با تزریق سوسپانسیون دتوکسیفیکه به موش انجام گرفت و توکسوئید برای استفاده های بعدی در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

آزمایش باقی مانده سمیت

موش های ۱۷ تا ۲۲ گرمی به صورت IV تحت تزریق ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون دتوکسیفیکه قرار گرفته و تا ۷۲ ساعت تحت نظر قرار گرفتند. در صورت عدم بروز تلفات در موش ها، این توکسوئید برای ارزیابی ایمنی زائی مورد استفاده قرار گرفت.

استحصال توکسوئید به روش اولترافیلتراسیون

از سیستم اولترافیلتراسیون مینی سارتوکن با مدول ۰/۲ میکرون در مرحله میکروفیلتراسیون و مدول kD100 در مرحله اولترافیلتراسیون برای این منظور استفاده شد. ابتدا ۱۰ لیتر سوسپانسیون دتوکسیفیکه از مدول ۰/۲ میکرون عبور داده شد، سپس محلول عبور داده شده از مدول kD100 عبور داده شد و حجم آن به ۱ لیتر رسید و به یخچال ۴ درجه سانتی گراد منتقل و برای مراحل بعدی استفاده شد.

فرمولاسیون واکسن های آزمایشی

در صدهای مختلفی از تیپ های C، B و D کلستریدیوم پرفرینجنز، کلستریدیوم سپتیکوم و کلستریدیوم نووآی برای تولید سه گروه واکسن آزمایشی در هفت تکرار در نظر گرفته شد. گروه اول شامل واکسن پنج ظرفیتی باکترین (کشت فرمله) تولید شده در شیشه های بیست لیتری و جذب شده روی یاور هیدروکسید آلومینیوم، گروه دوم شامل واکسن پنج ظرفیتی باکترین تولید شده در فرمانتور تحقیقاتی دوازده لیتری و جذب شده روی هیدروکسید آلومینیوم و گروه سوم شامل واکسن پنج ظرفیتی توکسوئید-باکترین تولید شده در فرمانتور تحقیقاتی دوازده لیتری و جذب شده روی یاور هیدروکسید آلومینیوم بود. در تکرار های مختلف هر گروه، میزان درصد ماده فعال موجود در واکسن، متغیر بود. در همه موارد از کشت فرمله کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B و کلستریدیوم نووآی و از توکسوئید کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ های C و D و کلستریدیوم سپتیکوم استفاده گردید. در واکسن اولترافیلتر شده از توکسوئید و کشت فرمله استفاده گردید. برای انتخاب بهترین واکسن، همه واکسن های آزمایشی مورد آزمون های کنترلی قرار گرفتند.

آزمون های کنترلی

۱- آزمون حداقل دز کشنده (Minimum Lethal Dose, MLD): توان توکسین زائی باکتری با استفاده از رقت های مناسب و تزریق داخل سیاهرگی

جدول ۱- واکسن پنج ظرفیتی باکترین جذب شده روی هیدروکسید آلومینیوم ۱/۵٪ تولید شده در شیشه‌های بیست لیتری بدون تنظیم pH (تکرار اول).

عیار ماده فعال (IU)	ماده فعال	درصد	شکل دارویی	ترکیب واکسن
۷/۵	β	۱۰	باکترین	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B
۷/۵	β	۱۰	باکترین	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C
۵	ϵ	۴۰	باکترین	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D
غیر فعال	α	۱۰	باکترین	کلستریدیوم سپتیکوم
۵	α	۲۰	باکترین	کلستریدیوم نوآی
-	-	۱۰	-	هیدروکسید آلومینیوم

جدول ۲- واکسن پنج ظرفیتی باکترین جذب شده روی هیدروکسید آلومینیوم ۱/۵٪ تولید شده در شیشه‌های بیست لیتری بدون تنظیم pH (تکرار دوم).

عیار ماده فعال (IU)	ماده فعال	درصد	شکل دارویی	ترکیب واکسن
۷/۵	β	۱۰	باکترین	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B
۷/۵	β	۱۰	باکترین	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C
۶	ϵ	۴۰	باکترین	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D
۲ MLD/ml	α	۲۰	باکترین	کلستریدیوم سپتیکوم
۴	α	۱۰	باکترین	کلستریدیوم نوآی
-	-	۱۰	-	هیدروکسید آلومینیوم

نتایج واکسن آزمایشی گروه دوم

در گروه دوم واکسن پنج ظرفیتی باکترین تولید شده در فرمانتور و جذب شده روی یاور هیدروکسید آلومینیوم، مورد آزمون توان ایمنی زائی قرار گرفت که نتایج آن در جداول ۳ و ۴ مشاهده می شود (تکرار اول و دوم).

نتایج واکسن آزمایشی گروه اول

در گروه اول واکسن پنج ظرفیتی باکترین تولید شده در شیشه های بیست لیتری و جذب شده روی یاور هیدروکسید آلومینیوم، مورد آزمون توان ایمنی زائی قرار گرفت که نتایج آن در جداول ۱ و ۲ مشاهده می شود (تکرار اول و دوم).

جدول ۳- واکسن پنج ظرفیتی باکترین جذب شده روی هیدروکسید آلومینیوم ۱/۵٪ تولید شده در فرمانتور تحقیقاتی همراه با تنظیم pH (تکرار اول).

عیار ماده فعال (IU)	ماده فعال	درصد	شکل دارویی	ترکیب واکسن
۷/۵	β	۷/۵	باکترین	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B
۷/۵	β	۷/۵	باکترین	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C
۳	ϵ	۴۵	باکترین	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D
۲MLD/ml	α	۱۵	باکترین	کلستریدیوم سپتیکوم
۴/۵س	α	۱۵	باکترین	کلستریدیوم نوآی
-	-	۱۰	-	هیدروکسید آلومینیوم

جدول ۴- واکسن پنج ظرفیتی باکترین جذب شده روی هیدروکسید آلومینیوم ۱/۵٪ تولید شده در فرمانتور تحقیقاتی همراه با تنظیم pH (تکرار دوم).

ترکیب واکسن	شکل دارویی	درصد	ماده فعال	عیار ماده فعال (IU)
کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B	باکترین	۱۰	β	۱۰
کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C	باکترین	۱۰	β	۱۰
کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D	باکترین	۵۰	ε	۵
کلستریدیوم سبتیکوم	باکترین	۱۰	α	۲ MLD/ml
کلستریدیوم نوآی	باکترین	۱۰	α	۳
هیدروکسید آلومینیوم	-	۱۰	-	-

نتایج واکسن آزمایشی گروه سوم

در گروه سوم واکسن پنج ظرفیتی توکسوئید-باکترین تولید شده در فرمانتور و جذب شده روی یاور هیدروکسید آلومینیوم، مورد آزمون توان ایمنی زائی قرار گرفت که نتایج آن در جداول ۵، ۶ و ۷ مشاهده می شود (تکرار اول، دوم و سوم).

پس از انتخاب بهترین واکسن از گروه سوم (تکرار اول تا سوم واکسن توکسوئید-باکترین جذب شده روی هیدروکسید آلومینیوم)، عیار پادتن های اپسیلون و بتا در سرم خون گوسفندان تزریق شده با آن بر اساس استاندارد فارماکوپه اروپا (بندهای ۳ تا ۵ مواد و روش ها) ارزیابی شد که نتایج آن در جدول ۸ مشاهده می گردد.

جدول ۵- واکسن پنج ظرفیتی توکسوئید-باکترین تغلیظ و تخلیص شده به وسیله سیستم اولترافیلتراسیون و جذب شده روی هیدروکسید آلومینیوم ۱/۵٪ تولید شده در فرمانتور تحقیقاتی همراه با تنظیم pH (تکرار اول).

ترکیب واکسن	شکل دارویی	درصد	ماده فعال	عیار ماده فعال (IU)
کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B	باکترین	۳	β	۴/۵
کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C	توکسوئید	۳	β	۴/۵
کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D	توکسوئید	۵	ε	۲/۵
کلستریدیوم سبتیکوم	توکسوئید	۴	α	۲ MLD/ml (Resiste)
کلستریدیوم نوآی	باکترین	۴	α	۲
هیدروکسید آلومینیوم	-	۱۰	-	-
سرم فیزیولوژی	-	۷۰/۶	-	-
فرم آلدئید	-	۰/۴	-	-

جدول ۶- واکسن پنج ظرفیتی توکسوئید-باکترین تغلیظ و تخلیص شده به وسیله سیستم اولترافیلتراسیون و جذب شده روی هیدروکسید آلومینیوم ۱/۵٪ تولید شده در فرمانتور تحقیقاتی همراه با تنظیم pH (تکرار دوم).

ترکیب واکسن	شکل دارویی	درصد	ماده فعال	عیار ماده فعال (IU)
کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B	باکترین	۴	β	۴/۵
کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C	توکسوئید	۴	β	۴/۵
کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D	توکسوئید	۸	ε	۴
کلستریدیوم سبتیکوم	توکسوئید	۵	α	۳ MLD/ml (Resiste)
کلستریدیوم نوآی	باکترین	۵	α	۳/۵
هیدروکسید آلومینیوم	-	۱۰	-	-
سرم فیزیولوژی	-	۶۳/۶	-	-
فرم آلدئید	-	۰/۴	-	-

جدول ۷- واکسن پنج ظرفیتی توکسوئید-باکترین تغلیظ و تخلیص شده به روش اولترافیلتراسیون و جذب شده روی هیدروکسید آلومینیوم ۱/۵٪ تولید شده در فرمانتور همراه با تنظیم pH (تکرار سوم).

ترکیب واکسن	شکل دارویی	درصد	ماده فعال	عیار ماده فعال (IU)
کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B	باکترین	۶	β	۱۰
کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C	توکسوئید	۶	β	۱۰
کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D	توکسوئید	۱۰	ϵ	۶
کلستریدیوم سپتیکوم	توکسوئید	۷	α	۴MLD/ml (Resiste)
کلستریدیوم نوآی	باکترین	۷	α	۵
هیدروکسید آلومینیوم	-	۱۰	-	-
سرم فیزیولوژی	-	۵۳/۶	-	-
فرم آلهید	-	۰/۴	-	-

جدول ۸- عیار پادتن های اپسیلون و بتا در سرم خون گوسفندان تزریق شده با بهترین واکسن

عیار پادتن های اپسیلون و بتا				نوع واکسن	
دو هفته پس از تزریق اول		دو هفته پس از تزریق دوم		توکسوئید-باکترین	
بتا	اپسیلون	بتا	اپسیلون	قبل از تزریق	توکسوئید-باکترین
۰/۳	۰/۵	۰/۳	۰/۵	تکرار اول	توکسوئید-باکترین
۰/۳	۰/۵	۰/۳	۰/۵	تکرار دوم	توکسوئید-باکترین
۰/۳	۰/۵	۰/۳	۰/۵	تکرار سوم	توکسوئید-باکترین

صورت حصول نتایج مطلوب این روش در تولید انبوه واکسن نیز بکارگیری و موجب بهبود کیفیت تولید و سهولت حمل و نقل، بسته بندی، عرضه و استفاده در دامداری ها گردد.

اولین بار پژوهشگران موسسه ولکام انگلستان واکسن چند ظرفیتی کلستریدیائی را برای مبارزه با بیماری های کلستریدیائی دامی، تولید نمودند(۱۵)، سپس دیگر موسسات اروپائی و آمریکائی نیز واکسن های کلستریدیائی مشابهی را تولید کردند(۱۹). FORTRESS® یک واکسن باکترین چند ظرفیتی مشتمل بر کشت های استاندارد و کشته شده کلستریدیوم سپتیکوم، شووآی، سوردلی، نوآی و پرفرینجنز تیپ C و D همراه با یاور محلول در آب (Stimugen™) است. این واکسن که ساخت کارخانه فایزر است که برای ایجاد ایمنی در گوساله های سالم در مقابل بیماری های شاربن علامتی، ادم بدخیم، قانقاریای عفونی کبد، گانگرن گازی، آنروتوکسمی و انتریت بکار می رود. تولید صنعتی آنروتوکسمی که یک واکسن چهار ظرفیتی باکترین است، با استفاده از فرمانتور در بخش تحقیق و تولید واکسن های بی هوازی موسسه رازی از سال ۱۳۶۸ آغاز و تاکنون نیز به طور مستمر انجام می شود. این واکسن شامل باکترین های اسهال عفونی بره های نوزاد، استراک، آنروتوکسمی گوسفند و براکسی است. همچنین واکسن باکترین قانقرایای کبد گوسفند نیز در این بخش

بحث

استفاده از واکسن بهترین راه مقابله با بیماری های کلستریدیائی است، واکسن های رایج معمولاً به صورت باکترین یا توکسوئید یا توکسوئید-باکترین ساخته می شوند به این ترتیب که با افزودن فرمالدهید به سوسپانسیون فعال باکتریائی به نسبت ۰/۶ درصد، باکتری غیر فعال شده و توکسین به توکسوئید تبدیل می شود. توکسوئید، توکسینی است که به صورت غیر قابل برگشت دنا توره شده است، بنابراین قابلیت کشندگی خود را از دست داده ولی قابلیت ایمنی زائی خود را حفظ کرده است. واکسن های کلستریدیائی رایج معمولاً مخلوطی از تعدادی باکترین یا توکسوئید یا مخلوط چند باکترین و توکسوئید است (۹).

واکسن های کلستریدیائی چند ظرفیتی به صورت توأم با واکسن های باکتریائی دیگر و یا بصورت غیر توأم، به روش های سنتی مرسوم و یا نو ترکیب در موسسات واکسن سازی دنیا تولید می شوند (۸، ۱۶، ۱۷) که به دلائل تجاری اطلاعات دقیق آنها در مقالات بین المللی منتشر نمی شود، لذا در این پژوهش تلاش شد که با تکیه بر اطلاعات، دانش، تجارب گران بها و مقالات منتشر شده محققین موسسه رازی و منابع در دسترس، به روش مناسب تصفیه و استحصال واکسن توکسوئیدی دست یافته و از نظر قابلیت ایمنی زائی با واکسن چند ظرفیتی باکتریائی مقایسه شود تا در

منابع مورد استفاده

- 1- Ardehali M., Darakhshan H., (1974), Production and standardization of *Clostridium perfringens* polyvalent vaccine in Iran; Develop biol. standard. Vol.32. 31-34.
- 2- Ardehali M., Darakhshan H., (1979), Isolation and typing of *Clostridium oedematiens* (*C. novyi*) from cases of Black disease of sheep in Iran, Comparative Immunology, Microbiology and infectious diseases, volum 2, issue 1, 1979, 107-111.
- 3- Ardehali M., Darakhshan H. Moosavi M. (1984). The existence and present situation of Clostridia diseases of domestic animals in Iran. Archives of Razi Institute, 34, 35-27-32.
- 4- Ardehali M., Moosawi M., Pilehchian R. (1992) Mass production of *Clostridium oedematiens* vaccine against Black disease of sheep. Archives of Razi Institute, No 42/43, 91.
- 5- Ardehali M., Pilehchian R., Moosawi M. (1995), The application of fermenter in Iran for large scale cultivation of enterotoxaemia vaccine. xxx world veterinary congress abstract . Japan.
- 6- Bergey D. H. et al, Bergey's manual of determinative bacteriology, Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- 7- Cato E.P., George W.L., Finegold S.M., (1986). Genus Clostridium, p. 1141-1182. In P. Sneath (ed.), Bergey's manual of systemic bacteriology, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- 8- Chandran D., Naidu S.S., Sugumar P., Rani G.S., Vijayan S.P., Mathur D., Garg L.C., Srinivasan V.A., (2010), Development of a recombinant epsilon toxoid vaccine against enterotoxaemia and its use as a combination vaccine with live attenuated sheep pox virus against enterotoxaemia and sheep pox, Clinical Vaccine Immunology, 17(6):1013-6.
- 9- EDQM. (2010). European Pharmacopoeia, *Clostridium perfringens* vaccines for veterinary use. EDQM, Strasbourg, France.
- 10- Hepple T.R. (1967). Aluminium hydroxide as an adjuvant for Clostridial vaccines. Immunobiol standard. Vol.6, 173-180.
- 11- Krivoshein Y.S., (1989), Handbook on Microbiology. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Mir Publishers, Moscow.
- 12- Pilehchian R., Jabbari A.R. Moosawi Shoshtari M., (2012), Large scale production of Blackleg vaccine by fermenter and enriched culture medium in Iran, Archives of Razi Institute, Vol. 67, No. 1, 43-49.
- 13- Rood J.I., (1998) Virulence genes of *Clostridium perfringens*, Annual Review of Microbiology. 52, 333-360.
- 14- Sterne M., Batty I., Thomson H., Robertson J.M., (1962). Immunization of sheep with multicomponent Clostridial vaccines. Veterinary Record 74, 909.
- 15- Sterne, M., Batty, I., (1975), Pathogenic clostridia, Butterworth & Co, London.

تولید می گردد (۱، ۴، ۵). شرکت اینتروت یک واکسن توکسوئید چند ظرفیتی به نام Ovivac vet یک واکسن توکسوئیدی کامل شامل توکسوئید های کلستریدیوم سپتیکوم، شووآی، تتانی و پرفرینجنز تیپ D و C تولید نموده است که برای ایمن سازی گوسفندان بالغ و بره ها در مقابل بیماری های براکسی، شاربن علامتی، کزاز و قلوه نرمی مورد استفاده قرار میگیرد. Covexin-8 یک واکسن توکسوئید-باکترین چند ظرفیتی شامل کلستریدیوم سپتیکوم، شووآی، تتانی، نووآی و پرفرینجنز تیپ D و C است که به وسیله شرکت فایزر برای ایمن سازی گوسفند و خوک در مقابل بیماری های براکسی، شاربن علامتی، غانغرایای عفونی کبد، کزاز و استراک، انتروتوکسمی و قلوه نرمی مورد استفاده قرار میگیرد.

تولید فرآورده های بیولوژیک جدید دارای ارزش صادراتی بوده و از ابزارهای موثر درآمد ارزی کشور است. جمعیت گوسفند و بز کشور را که سالانه در حدود ۱۲۰ میلیون دز واکسن های بی هوازی دریافت می دارد، می توان با مصرف یک واکسن چند ظرفیتی توکسوئید-باکترین جدید نه تنها در مقابل بیماری ها مربوطه مصون نمود بلکه ایجاد این مصونیت به طور یکجا صورت می گیرد، بنابراین در پژوهش حاضر واکسن پنج ظرفیتی کلستریدیائی کشت توکسوئید-باکترین تولید، و عیار آن در دام هدف مطابق استانداردهای بین المللی ارزیابی و بررسی گردید. واکسن ها هر یک به طور جداگانه تولید شدند و به شکل یک واکسن پنج ظرفیتی توکسوئید-باکترین به نسبت های مورد نظر مخلوط و با یاور هیدروکسید آلومینیوم ترسیب گردید (۱۰).

بر اساس پروتکل ها، مقررات و استانداردهای رایج، استفاده از توکسوئید به عنوان منبعی برای تولید واکسن، نیازمند مطالعاتی است که طی آن پارامتر های تولید واکسن از جمله کالیبراسیون میزان توکسوئید مورد استفاده در واکسن، لزوم یا عدم لزوم استفاده از یاور، نوع و مقدار یاور مورد نیاز، مقدار واکسن قابل تزریق جهت ایجاد حداقل IU/ml ضروری، نوع تزریق (IV, IP, SC) و محل تزریق برای ایجاد حداکثر ایمنی، همچنین تزریق به حیوانات هدف به منظور مشاهده نتایج آن و بررسی های میدانی می بایست مد نظر قرار گیرند (۹). با توجه به این نکات، در آزمون های بی ضرری و توان ایمنی زائی، هر یک از توکسوئیدها یا باکترین ها، به طور جداگانه به حیوانات آزمایشگاهی و گوسفند تزریق و عیار آنها مطابق استانداردهای بین المللی ارزیابی و بررسی گردید. با توجه به توضیحات و جداول مندرج در بخش نتایج، در مقایسه سه گروه واکسن تولیدی در این پژوهش مشخص گردید که اگرچه واکسن کلستریدیائی پنج ظرفیتی باکترین کارائی خوبی از نظر استانداردهای بین المللی دارد (۹) ولی عیار واکسن کلستریدیائی پنج ظرفیتی توکسوئید-باکترین، بالاتر از واکسن باکترین است. در حال حاضر با توجه به وجود فرمانتورهای صنعتی و سیستم اولترافیلتراسیون در موسسه رازی، تولید واکسن های کلستریدیائی توکسوئیدی نیز امکان پذیر است و تولید انبوه واکسن توکسوئیدی در آینده می تواند در پیشگیری از بیماری های باکتریائی های بی هوازی در دامداری های کشور مفید و موثر باشد و واکسن توکسوئیدی همراه با یاور هیدروکسید آلومینیوم، قادر خواهد بود که دام را در مقابل بیماری های کلستریدیائی ایمن کند.

16- Salvarani, FM., Conceição, FR., Cunha, CEP., Moreira, GMSG., Pires, PS., Silva, ROS., Alves, GG., Lobato, FCF., (2013). Vaccination with recombinant *Clostridium perfringens* toxoids α and β promotes elevated antepartum and passive humoral immunity in swine, Vaccine, 31, 38, 4152-4155.

17- Titball R.W., (2009), *Clostridium perfringens* vaccines, Vaccine 27, D44–D47.

18- Topley, W.W.C., Wilson, G.S., Collier, L., Balows, A., Sussman, M., (2005), Topley & Wilson's microbiology & microbial infections. 10th edition London Hodder Arnold.

19- Walker P.D. (1992). Bacterial vaccines old and new, veterinary and medical, Vaccine, Vol.10, Issue 14, 977.

