Archive of SID

(مقاله پژوهشی)

# مقایسه روش‌های جداسازی توکسین کورینه باکتریوم دیفتریه سویه واکسینال استاندارد از طریق سپراتور و فیلترپرس به منظور افزایش کیفیت و کمیت محصول نهایی

اردشیر فرامرزی[1]، مجتبی نوفلی[2*]، آزاده توفیقی[3]، فرشته شاهچراغی[4]

۱-دانشیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی.
۲-کارشناسی ارشد موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی.
۳- استادیار گروه میکروبیولوژی.
۴-استاد گروه میکروبیولوژی.

۱و۲-بخش تحقیق و تولید واکسنهای باکتریایی پزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
۳-گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران.
۴-بخش میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

*** نویسنده مسئول:**
مجتبی نوفلی، بخش تحقیق و تولید واکسنهای باکتریایی پزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
**تلفن:** ۰۰۹۸۹۱۹۸۳۸۶۷۱۸
Email: noofeli1234@yahoo.com

## چکیده

**زمینه و هدف:** این مطالعه مبتنی بر افزایش و ارتقاء کیفیت و کمیت مطلوب‌تر و موثرتر در تولید این واکسن در کشور بود. در این راستا دو روش (سپراتور و فیلترپرس) در جداسازی توکسین عامل مولد بیماری یعنی *کورینه باکتریوم دیفتریه* سویه واکسینال از پیکره باکتری-های کشت یافته در فرمانتور، مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

**روش بررسی:** سه سری ساخت ۳۵۰ لیتری کشت فرمانتوری دیفتری تهیه شد. جداسازی نیمی از آن در هر سری ساخت، توسط استفاده از فیلترپرس به همراه کمک کننده فیلتر (خاک دیاتومه) و نیمی دیگر با استفاده از دستگاه سپراتور انجام شد. ۳ نمونه از هر روش به میزان ۵۰ میلی‌لیتر از سه سری‌ساخت برداشته شد و آزمون‌های کمترین دوز کشنده، آزمون سمیت اختصاصی، تیتر سم حاصله به روش فولکولاسیون رامون و SDS-PAGE ژل‌الکتروفورزیس، بر روی نمونه‌ها انجام شد. سایر موارد همانند زمان صرف شده جهت رسیدن به محصول نهایی، حجم محصول و شفافیت محصول حاصل شده نیز مورد بررسی قرارگرفتند.

**یافته‌ها:** نتایج حاصله در تمامی آزمون‌ها در روش جداسازی با سپراتور نسبت به روش جداسازی با فیلترپرس دارای برتری قابل ملاحظه‌ای بود. همچنین حجم محصول نهایی پس از جداسازی و شفافیت آن بروش سپراتور بهتر از روش فیلترپرس بود. مضافا اینکه زمان لازم برای جداسازی و هزینه های بکار رفته در روش سپراتور بمراتب کمتر از روش فیلترپرس بود.

**نتیجه گیری:** استفاده از روش جداسازی با سپراتور جایگزین مناسبی بر روش جداسازی توسط فیلترپرس در میزان افزایش کیفیت و کمیت تولید واکسن دیفتری می‌باشد و از این لحاظ می‌تواند کیفیت و کمیت واکسن تولیدی را ارتقاء بخشد.

**واژگان کلیدی:** *دیفتری*، واکسن، توکسین، سپراتور، فیلترپرس.

**دریافت مقاله:** ۱۳۹۸/۱/۲۹ **دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده:** ۱۳۹۸/۵/۱ **اعلام قبولی:** ۱۳۹۸/۵/۸



www.SID.ir

Archive of SID

## مقدمه

دیفتری بیماری حاد باکتریایی دستگاه تنفس و به طور شدید و بالقوه کشنده است که میزان مرگ و میر آن در کودکان و افراد مسن بیشتر است. عامل این بیماری *کورینه باکتریوم دیفتریه* است که با وارد کردن اگزوتوکسین ترشحی خود به بدن میزبان، می‌تواند آثار مخربی در سیستم اعصاب و بافت عضلانی افراد ایجاد کند. واکسن این بیماری سالیان متمادی است که در دنیا تولید می شود و طبق دستوالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO) یکی از واکسنهای اجباری است که در ترکیب با توکسوئید کزاز و سیاه سرفه بعنوان ثلاث و یا علاوه بر این دو جز به همراه هموفیلوس آنفلوانزا و هپاتیت بصور پنتاوالان و با اضافه شدن پولیو غیرفعال به عنوان هگزاوالان استفاده می شود (۱).

روند تولید این واکسن بگونه ای است که بعد از کشت باکتری در درون فرمانتور، توسط روشهایی سم آن جداسازی شده و پس از سمیت زدایی به توکسوئید تبدیل شده که نهایتا پس از مراحل متعدد تخلیص به عنوان توکسوئید دیفتری قابل استفاده در ترکیب با واکسنهای دیگر خواهد بود. در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی که مرجع تولید این واکسن در ایران و منطقه میباشد، روش متداولی برای جداسازی توکسین کورینه باکتریوم دیفتریه وجود دارد که در این روش جداسازی توکسین با استفاده از فیلترپرس های چند صفحه ای سایتز صورت میگیرد. این روش دارای معایبی اعم از استفاده از خاک دیاتومه به عنوان کمک کننده فیلتر، هدر رفت میزان زیادی از محصول (سم باکتری)، ایجاد مخاطره برای پرسنل به دلیل سمیت توکسین و امکان انتقال آلودگی میکروبی، باز بودن سیستم و لحاظ هزینه های شرایط آسپتیک، طولانی بودن فرآیند نهایی استحصال توکسین و در نتیجه احتمال تخریب ساختار توکسین تحت تاثیر محیط و دمای آزمایشگاه و همچنین هزینه بر بودن این روش میباشد. در این مطالعه استحصال توکسین توسط دستگاه سپراتور و فلترپرس سایتز از لحاظ کمی و کیفی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت و نهایتا روش بهتر جداسازی توکسین *کورینه باکتریوم دیفتریه* توسط سپراتور از کشت فرمانتوری آن انتخاب گردید. این مطالعه برای اولین بار در دنیا در مقیاس صنعتی انجام گرفت و نتایج آن بسیار ارزشمند و کاربردی خواهد بود.

## روش بررسی

### سویه واکسینال و محیط کشت:

از سویه واکسینال کورینه باکتریوم دیفتریه PW8 تحت سویه CN2000 بعنوان باکتری استاندارد تولید کننده توکسین استفاده شد. محیط های کشت لوفلر و استینر که محیط اختصاصی رشد باکتری و نیز جهت تولید توکسین میباشند، بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO) ساخته و استفاده شدند.

### تست حداقل دوز کشندگی ( Minimal Lethal Dose):

تست حداقل دوز کشندگی، کمترین میزان توکسین که قادر به کشتن حیوان مورد آزمایش میباشد را نشان میدهد. یک میلی لیتر از توکسین را که با رقتهای مختلف از ۱/۵۰۰۰ تا ۱/۱۰۰۰۰ با بافر مناسب رقیق شده است را به دو خوکچه هندی بصورت زیرجلدی تزریق کرده و کمترین تیتری که قادر به کشتن هر دو خوکچه تا ۴ روز را باشند بعنوان حداقل دوز کشندگی ثبت می‌گردد (۲).

### تست سمیت اختصاصی ( Specific Toxicity Test):

به منظور کنترل صحت تبدیل توکسین به توکسوئید می بایست تست سمیت اختصاصی یا specific toxicity test انجام شود . جهت انجام این تست نیاز به ۶ عدد خوکچه هندی Guinea pigs مدل Pirbright 350-


www.SID.ir

Archive of SID

250 گرم در هر گروه تست می باشد که به ۵ خوکچه حداقل Lf ۵۰۰ توکسوئید به صورت زیر جلدی تزریق می شود و یک خوکچه شاهد میباشد. افزایش وزن خوکچه ها و نیز علایم کلینیکی روزانه به مدت ۴۲ روز کنترل می گردد . هرگونه عدم افزایش وزن یا مرگ و میر یا فلج شدن خوکچه ها بیانگر عدم تبدیل مناسب توکسین به توکسوئید است. در صورتی که نتیجه این تست رضایت بخش نباشد بایستی مجددا" توکسوئید به گرم خانه ۳۵ درجه سانتیگراد جهت سمیت زدایی مجدد ( Re-detoxification)، منتقل و فرمالین به میزان 3-1 میلی لیتر در هزار میلی لیتر به توکسین اضافه شود و به مدت ۲ هفته در گرم‌خانه نگهداری و به طور متناوب توکسین و فرمالین مخلوط گردند. پس از سپری شدن این زمان، توکسوئید به سردخانه منتقل شده و مجددا" تست عدم سمیت اختصاصی فوق تکرار می شود. در صورتی که نتیجه این تست رضایت بخش باشد جهت تخلیص توکسوئید اقدام می شود (4 & ۳).

آزمون فولکولاسیون رامون و اندازه گیری Lf و Kf:

آزمون فولکولاسیون رامون در واقع تستی برای تشخیص حضور و یا عدم حضور آنتی ژن (توکسین) در محلول جدا شده از کشت و یا سمیت‌زدائی شده آن (توکسوئید) است که اساس آزمون مواجهه کردن آنتی بادی با آنتی‌ژن است. پس از سانتریفیوژ نمودن ۳۰ میلی لیتر از کشت ناخالص فرمانتوری توسط دستگاه سانتریفیوژ با دور ۳۵۰۰ و به مدت ۲۰ دقیقه، سوپرناتانت را جدا کرده و سپس تست Lf و Kf بر روی آنها انجام میگردد. به این ترتیب که محلول آنتی بادی استاندارد 100IU(که قادر به فلوکولاسیون با ۱۰۰ Lf توکسین یا توکسوئید میباشد) تهیه شده در موسسه سرم سازی رازی، با نسبت ۵۰ درصد رقیق سازی میگردد و تعداد ۱۰ لوله ۵ میلی لیتری با نسبت های مختلف آنتی بادی تهیه و سپس ۱ میلی لیتر نمونه توکسین شفاف شده به هرکدام از لوله‌ها، اضافه میشود. سپس داخل بن ماری با دمای ۵۰ درجه قرار داده شده و هر ۱دقیقه از آب خارج و برای تسهیل انجام واکنش توسط دست چرخانده و هم زده میشود و نهایتا در منبع نور مورد مشاهده و بررسی قرار میگیرد. اولین لوله ای که در آن دانه های رسوب (کلوئید) تشکیل شود به عنوان لوله دارای Lf تیتر و زمان طی شده تا ایجاد فولکولاسیون بعنوان Kf ثبت میگردند (۳).

پلی آکریلامید ژل الکتروفورزیس (SDS-PAGE):

تکنیکی است که به طور گسترده به منظور جداسازی ماکرومولکول‌هایی همچون پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد که جداسازی این ماکرومولکول‌ها بر اساس حرکت الکتروفورتیک آن‌ها انجام می‌گردد. میزان این حرکت به طول، کونفورماسیون و بار مولکول بستگی دارد. در این روش مولکول‌ها بر اساس تفاوت در وزن مولکولیشان از یکدیگر جدا می‌گردند. بطور خلاصه پس از سرهم کردن قطعات دستگاه و تهیه ژل بر اساس دستورالعمل سازنده، نمونه ها احیاء شده و پس از حرارت دادن بمیزان ۲۰ میکرولیتر در چاهک ها بارگیری میشوند. پس از انجام الکتروفورز، ژل حاصل توسط کوماسی بلو رنگ آمیزی شده و با دستگاه ژل داک مشاهده و ارزیابی میگردد. غلظت ژل مورد استفاده ۱۰ درصد بهمراه مارکر بیو راد از ۱۰ تا ۲۵۰ کیلو دالتون بود. تجهیزات نیز تماما از بیو راد استفاده شد.

## یافته ها

در راستای اهداف پروژه، سه سری ساخت فرمانتوری (۳۵۰ لیتری) کورینه باکتریوم دیفتریه کشت داده شد. در ابتدای هر سری ساخت، از بانک سوش واکسن، آمپول لیوفیلیزه کورینه باکتریوم دیفتریه سویه واکسینال CN-2000 دریافت گردید. سپس محتویات آمپول روی محیط کشت مغزی و منعقده لوفلر سرم کشت داده شد و پس از نگهداری


www.SID.ir

Archive of SID

در انکوباتور ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت و اطمینان از خلوص کشت، پرگنه های حاصله را با PBS شستشه و به محیط کشت مایع استینر با حجم ۱۵۰ میلی لیتر انتقال داده شد. این کشت نیز به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه شیکرانکوباتور قرار داده شد و دمای آن روی ۳۵ درجه‌ی سانتیگراد و دور آن روی ۲۰۰ تنظیم گردید. پس از گذشت ۴۸ ساعت و پس از بررسی و حصول اطمینان از خالص بودن کشت باکتری مورد نظر توسط روش رنگ آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی، میزان ۱ تا ۵ درصد از کشت حاصله به ظروف حاوی ۲۰۰۰ میلی لیتر از محیط کشت مایع استینر انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه شیکر انکوباتور با تنظیمات شرایط قبلی قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت کشت بدست آمده از لحاظ خلوص، با رنگ آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت و پس از اطمینان از خلوص آن، محتویات ظروف به فرمانتور حاوی محیط کشت مایع استینر استریل انتقال یافت و کشت فرمانتوری به مدت ۴۸ ساعت ادامه یافت. انجام آزمون‌های کنترلی حین کشت اعم از بررسی pH، بررسی خلوص کشت فرمانتوری، و آزمایش فلوکولاسیون رامون جهت تعیین تیتر توکسین حاصل از کشت انجام شد و در نهایت پس از اطمینان از خالص بودن کشت باکتری کورینه باکتریوم دیفتریه در انتهای دوره کشت فرمانتوری، نیمی از حجم محصول کشت یافته در فرمانتور به میزان ۱۵۰ لیتر تخلیه گردید و جداسازی سم باکتری توسط روش فیلتر پرس در سه مرحله با فیلترهای کاغذی مخصوص با اندازه روزنه-های مختلف به ترتیب K-900 (۵ الی ۱۵ میکرومتر)، T-500 ( ۳ الی ۵ میکرومتر) و سارتوریوس ۰,۳ میکرومتر به همراه خاک دیاتومه به عنوان کمک کننده‌ی فیلتر، انجام شد. همزمان فرمانتور به دستگاه سپراتور (مدل BT SX15-M از سپراتورهای نسل سوم) متصل گردید و نیم دیگر محصول داخل فرمانتور، توسط سپراتور جداسازی گردید. اعمال بالا عینا برای سه سری ساخت با کدهای D95-1, D95-2, D95-3 انجام شد. از هر کدام از محصولات به‌دست آمده ۵۰ میلی لیتر به عنوان نمونه مورد آزمایش (مجموعا ۶ نمونه ۵۰ میلی لیتری) برداشته و شماره گذاری شد. نمونه ها از لحاظ میزان شفافیت، حجم نهایی محصول به‌دست آمده، زمان حصول محصول نهایی، کمترین دز کشنده (MLD)، آزمون سمیت اختصاصی (STT)، فلوکولاسیون رامون ( Lf ,Kf)، SDS-PAGE ژل الکتروفورز مورد بررسی و مقایسه قرار داده شدند.

– شفایت محصول به دست آمده:

پس از انجام عمل فیلتراسیون توسط روش جداسازی توکسین با سپراتور در یک مرحله و جداسازی توکسین توسط فیلتر پرس در چند مرحله، از هر کدام نمونه برداری و مورد ارزیابی واقع گردیدند (شکل ۱).

– نتایج بررسی حجم نهایی محصول و زمان به دست آمدن آن

حجم وارده برای هر دو روش (سپراتور و فیلترپرس سایتز) در هر سری ساخت میزان ۱۷۵ لیتر در نظر گرفته شد. پس از انجام عمل جداسازی محصول توسط دو روش جداسازی توکسین توسط سپراتور و فیلتر پرس محصول های نهایی به دست آمده از لحاظ حجم و زمان به دست آمدن محصول نهایی بررسی گردیدند و نتایج ثبت گردید ( جدول ۱) **آزمون فولکولاسیون رامون و اندازه گیری Lf و Kf**

در این مطالعه میزان تیتر آنتی ژن Lf و زمان واکنش آن Kf و بر روی نمونه های محصول از طریق دو روش جداسازی توکسین توسط سپراتور و فیلتر پرس اندازه گیری شد. به این طریق که تعیین تیتر توکسین بر اساس دستورالعمل استاندارد Ramon انجام گرفت (جدول ۲ ، نمودار ۱).

بررسی نتایج کمترین دوز کشنده ( MLD):

در این مطالعه پس از انجام آزمون کمترین دوز کشنده، نتایج مورد بررسی قرار گرفت. بدین طریق که در هر سری


www.SID.ir

Archive of SID

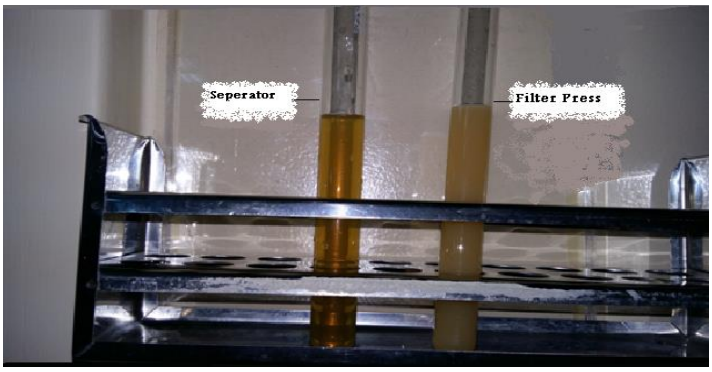
ساخت دو نمونه (از هر روش جداسازی یک نمونه)، برداشته شد و رقت‌های ۱:۵۰۰۰ تا ۱:۱۰۰۰۰ تهیه گردید. هر نمونه به ۲ سر خوکچه هندی تزریق و میزان مرگ و میر بررسی و با رقت تهیه شده تطبیق داده شد و همچنین خوکچه های مرده کالبدگشایی گردیده و درگیری غده آدرنال مورد ارزیابی و تایید قرار گرفت (شکل ۳).

**نتایج آزمون سمیت اختصاصی ( STT )**

در این مطالعه آزمون سمیت اختصاصی انجام شد، بصورتی که در هر سری ساخت دو نمونه (از هر روش جداسازی یک نمونه به میزان 2500Lf)، پس از اتمام مرحله‌ی سمیت زدایی، برداشته شد. از هر نمونه جدا شده میزان 500Lf به هر خوکچه تزریق شد. گـروه‌ها به دسته‌های ۶ تایی تقسیم شدند و در هرگروه به پنج سر از آن‌ها تزریق و یک سر از آن‌ها به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. وزن‌گیری و بررسی علائم بالینی، در فواصل ۴ روزه انجام شد و میانگین متوسط وزن رشد روزانه خوکچه ها در پایان دوره ثبت گردید (شکل ۴).

– آزمون SDS-PAGE ژل الکتروفورز

نمونه توکسوئیدهای حاصل از روش جداسازی با دستگاه سپراتور و روش جداسازی با فیلترپرس سایتز برداشته شد (در هر سری ساخت یک نمونه از هر روش) و توسط آزمایش SDS-PAGE ژل الکتروفورزیس مورد آزمون قرار گرفت. در این تست سه نمونه از سپراتور به صورت رقیق شده $^{1}/_{2}$ و دو نمونه دیگر به صورت رقیق نشده بر روی چاهکهای ژل اضافه شد. در سه چاهک دیگر نمونه‌های فیلترپرسی به صورت رقیق شده $^{1}/_{2}$ بر روی چاهک ژل ریخته شد. در چاهک اول نیز نمونه شماره ۱ فیلترپرسی به صورت تکراری ریخته شد و پس از اتمام آزمایش و رنگ آمیزی ژل و رنگبری، از آن عکس‌برداری شد ( شکل ۵).




**شکل ۱: دو نمونه برداشته شده از دو روش فیلترپرس سایتز و سپراتور**


www.SID.ir

Archive of SID

**جدول ۱: نتایج حجم ورودی و خروجی و زمان**

| ردیف | ۱ | ۲ | ۳ | ۴ | ۵ | ۶ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Batch.No | D95-1 F.P | D95-1 S | D95-2 F.P | D95-2 S | D95-3 F.P | D95-3 S |
| حجم وارد شده (لیتر) | ۱۷۵ | ۱۷۵ | ۱۷۵ | ۱۷۵ | ۱۷۵ | ۱۷۵ |
| حجم خروجی (لیتر) | ۱۴۱ | ۱۵۹ | ۱۴۵ | ۱۶۲ | ۱۴۲ | ۱۶۰ |
| زمان(ساعت) | ۹/۵ | ۲ | ۹ | ۲ | ۱۰ | ۲ |

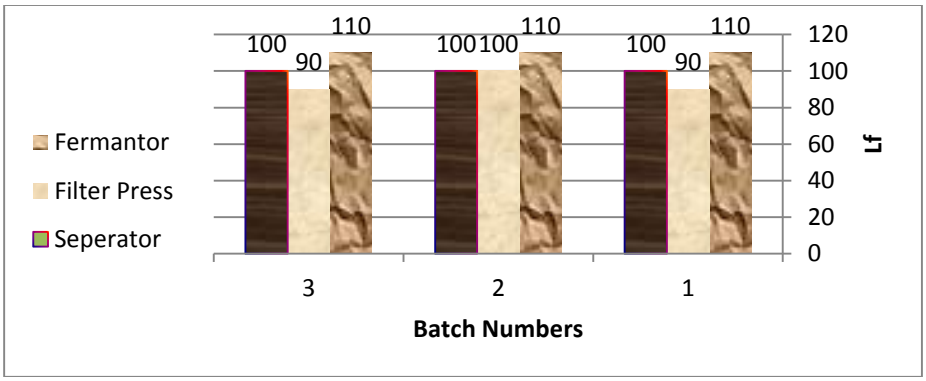
F.P: Filter Press; S: Separator

**جدول ۲: اندازه گیری Lf و Kf در نمونه‌های سه سری ساخت فرمانتوری**

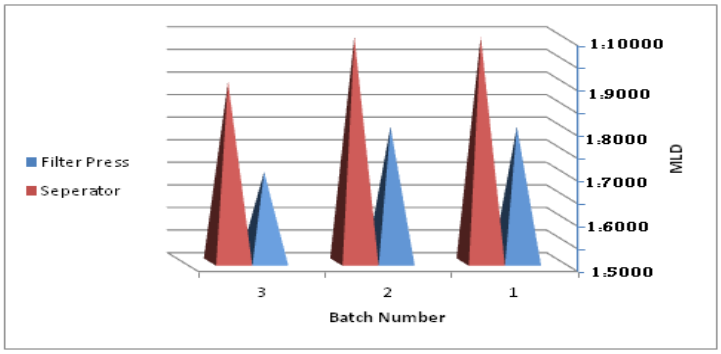
| Batch.No | D95-1-F | D95-1-F.P | D95-1-S | D95-2-F | D95-2- F.P | D95-2-S | D95-3-F | D95-3- F.P | D95-3-S |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Lf | ۱۱۰ | ۹۰ | ۱۰۰ | ۱۱۰ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ۱۱۰ | ۹۰ | ۱۰۰ |
| Kf | ۴ | ۴ | ۳ | ۶ | ۸ | ۶ | ۷ | ۸ | ۷ |

F.P: Filter Press; S: Separator; F: Fermentor

* در جدول فوق در ردیف افقی اول D95 به معنی دیفتری تولیدی در سال ۹۵ و عدد بعد از خط فاصله، شماره‌ی سری‌ساخت، F.P فیلترپرس، S سپراتور، F فرمانتور، Lf تیتر توکسین و Kf زمان واکنش آنتی‌ژن-آنتی بادی می باشد.




**شکل ۲: نمودار اندازه گیری Lf و Kf در نمونه های سه سری ساخت فرمانتوری**

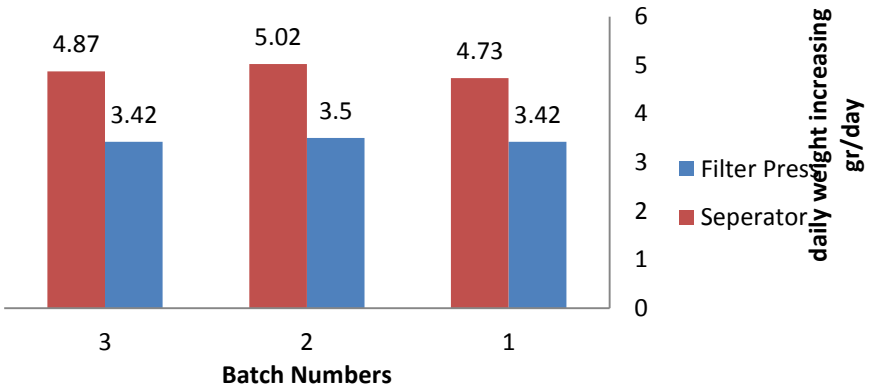



**شکل ۳: نمودار مقایسه نتایج آزمون کمترین دوز کشنده (MLD)**

* در نمودار فوق اعداد **1:5000** تا **1:10000** رقت‌های تزریق شده به خوکچه‌ها می باشد.

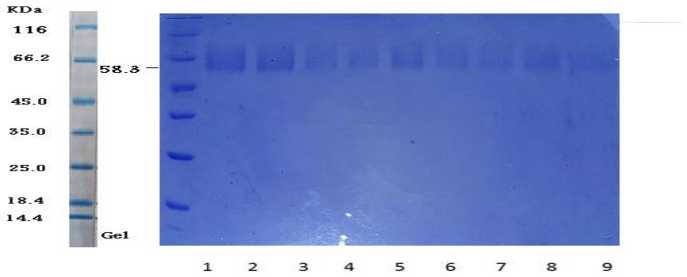

www.SID.ir

Archive of SID




**شکل ۴: نمودار نتایج میانگین وزن‌ها در تست سمیت اختصاصی (STT)**

*** در نمودار فوق daily weight increasing gr/day معرف رشد وزنی متوسط روزانه خوکچه‌ها و Batch numbers معرف شماره‌ی سری ساخت ها می باشد.**




**شکل ۵: تصویر SDS-PAGE ژل الکتروفورزیس**

* 1- D95-2 Separator crude sample; 2- D95-1 Separator Crude sample;
3- D95-3 Separator ½ sample ; 4- D95-2 Separator ½ sample;
5- D95-1 Separator ½ sample; 6- D95-3 Filter press ½ sample;
7- D95-2 Filter press ½ sample; 8- D95-1 Filter press ½ sample;
9- D95-1 Filter press ½ sample

## بحث

مهمترین گونه از خانواده کورینه باکتریوم ها، عامل بیماری دیفتری است. این باکتری باسیل گرم مثبت، کاتالاز مثبت، چماقی شکل و به شکل حروف چینی دیده می‌شود. ظاهری دندانه دار و تسبیح مانند دارد. هوازی و یا بی‌هوازی اختیاری است و در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد (حداقل ۲۰ و حداکثر ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) رشد می‌کند(۵). دیفتری بیماری حاد باکتریایی دستگاه تنفسی است. دیفتری بیماری شدید و بالقوه کشنده‌ای است که میزان مرگ و میر آن در کودکان خردسال و افراد مسن زیادتر است. عامل این بیماری باکتری *کورینه باکتریوم دیفتریه* است. ایجاد بیماری توسط اگزوتوکسین حاصل از این باکتری اتفاق می‌افتد. یکی از بهترین روش‌ها در مقابله با بیماری تزریق واکسن و پیشگیری از ایجاد بیماری است. لیکن واکسن این بیماری در دنیا تولید شده و طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی، تزریق آن


www.SID.ir

Archive of SID

جزء الزامات برای تمامی ملل قرار گرفته است. از طرفی چون این محصول یکی از مواردی است که در تمام دنیا و برای تمام اقشار جوامع مورد استفاده قرار می گیرد، از این‌رو بسیاری از محققین در دنیا مطالعات و تحقیقات فـراوانی برای بهبود بخشـیدن به کیفیت هر چه روزافـزون‌تر این فرآورده می‌نمایند. یکـی از مهم‌ترین قسمت‌ها در تولید این واکسن، جداسازی کشت فرمانتوری عامل این بیماری یعنی *کورینه باکتریوم دیفتریه* می باشد که روش‌های فراوانی برای آن ابداع و مطرح گردیده است. اهمیت این جداسازی بسیار زیاد است، چرا که هرچه کیفیت توکسین حاصله در این مرحله بهتر باشد در نتیجه کیفیت و خلوص واکسن تولید شده نیز بالاتر خواهد بود (۶).

نتایج مطالعه‌ی حاضر با مطالعه‌ی کمپکن و همکاران (۱۹۹۵) مبنی بر روش جداسازی کشت سلول‌های جانوری از طریق سانتریفیوژ دیسک پشته و روش فیلتراسیون TFF، تا حدودی تطابق داشت (۷). عملکرد دستگاه سپراتور تشابه کلی با دستگاه سانتریفیوژ دیسک‌پشته دارد و مکانیسم آن‌ها تقریبا یکی است. لیکن دو تفاوت در این دو مطالعه وجود داشت. اول اینکه در تحقیق کمپکن نمونه‌ی مورد مطالعه کشت سلول‌های جانوری بود و در مطالعه حاضر کشت باکتریایی *کورینه باکتریوم دیفتریه* بود. دوم این‌که کمپکن نتیجه محصول مطالعه‌اش را ۹۵٪ ثبت نمود و در این مطالعه نتیجه‌ی محصول حاصل شده ۹۰-۹۲٪ بود. گرچه به نظر میرسد نتیجه حاصله در مطالعه حاضر منطقی‌تر بود. چـرا که عملا نشان داده شده حجم بقایای پیکره‌ی سلول‌های باکتریایی و جانوری در جداسازی از کشت آن‌ها زیاد است و علاوه بر آن نیز املاح موجود در محیط کشت نیز می‌تواند در میزان ضایعات جداسازی شده در نظر گرفته شود. ولی از نظر زمان، جداسازی در روش سپراتور و سانتریفیوژ دیسک پشته مقدار ۱۰۰ لیتر در ساعت بود که در دو روش با هم مطابقت داشت اما در روش جداسازی در فیلترپرس سایتز این مقدار بسیار بیشتر بود.

همچنین نتیجه شفافیت و کیفیت محصول در مطالعه‌ی حاضر با حاصل تحقیقات رائو و همکاران (۱۹۹۲) و بسنارد و همکاران(۲۰۱۶) مبنی بر جداسازی توکسین *کورینه باکتریوم دیفتریه* شباهت داشت (۹ , ۸). ولی تفـاوت‌ها در روش‌های جداسازی، زمان رسیدن به محصول و تعداد دفعات در جداسازی بود. در مطالعه‌ی حاضـر روش‌های جداسازی مشتمل بر سپراتور و فیلترپرس سایتز بود، ولی در تحقیق رائو و همکاران (۱۹۹۲) مبتنی بر استفاده از TFF (Tangential Flow Filtration) و PVDF (Poly Vinyl Depth Filtration)، و در مطالعه‌ی بسنارد و همکاران(۲۰۱۶) فیلتراسیون غشائی (میکروفیلتراسیون، فیلتراسیون با جریان مماس)، سانتریفیوژ و فیلتراسیون عمیق بود. در مطالعه‌ی حاضر روش سپراتور در یک مرحله و در حالت استریل محصول جدا شد در حالی که در مطالعات آن‌ها جداسـازی با دخالت دسـت و در چـند مرحلـه انجـام شد. هم‌چنین زمان به‌دست آمدن محصول در این مطالعه توسط سپراتور بسیار کم‌تر (۲ ساعت) در مقابل روش آن‌ها بود که در روش‌های ایشان جداسازی طی ۱۰-۸ ساعت انجام شد که شباهت با زمان جداسازی با فیلتر پرس در تحقیق ما بود.

روش جداسازی توکسین از ۳۰۰ لیتر کشت فرمانتوری *کورینه باکتریوم دیفتریه* توسط ساندران و همکاران (۲۰۰۲) با روش TFF (Tangential Flow Filtration) انجام شد که همانند روش رائو و همکاران (۱۹۹۲) بود. روش ساندران نیز چند مرحله‌ای بود و شباهت به روش دوم این مطالعه داشت و طی ۱۰ ساعت انجام شد(۱۰). ولی روش اول مطالعه‌ی حاضر (جداسازی با فیلترپرس) نسبت به آن از لحاظ کیفیت، زمان استحصال محصول و همچنین تک مرحله‌ای بودن این روش، دارای برتری قابل ملاحظه‌ای بود.


www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌ی میزان محصول در روش ساندران ۹۸٪ ثبت گردید و همان‌طور که قبلا در قسمت مطالعه‌ی کمپکن و همکاران (۱۹۹۵) اشاره شد عدد ۹۸٪ به لحاظ عملی و حجم تولید صنعتی (۳۰۰ لیتر) رقمی اغراق آمیز جلوه می نماید.

**– بررسی و مقایسه‌ی دو روش جداسازی توکسین از کشت فرمانتوری *کورینه باکتریوم دیفتریه* توسط دستگاه سپراتور و فیلترپرس سایتز در این تحقیق**

در نتایج حاصله از دو روش جداسازی با فیلترپرس سایتز و سپراتور محرز گردید که میزان شفافیت محصول به دست آمده در روش سپراتور بسیار بالاتر از روش فیلترپرس سایتز است. همچنین در روش سپراتور محصول شفاف توکسین حاصل، طی یک مرحله و این در حالی بود، که در روش فیلترپرس در چند مرحله این جداسازی انجام شد. این مسئله مبین کمترین دستکاری و در نتیجه کمترین تاثیر عوامل محیطی مخرب، مانند دما و ایجاد مخاطره برای محصول به دست آمده بود. همچنین در روش سپراتور نیازی به اضافه نمودن کمک کننده خاک دیاتومه ( Diatomaceous Earth) نبود. در حالی‌که عدم استفاده از آن در فیلترپرس گریزناپذیر بود و در صورت عدم استفاده از آن تعداد دفعات تعویض کاغذهای فیلتر، بیشتر و در نتیجه در میزان هدر رفت محصول تاثیر بسزایی داشت و از طرفی به علت دستکاری زیاد و زمان‌بر بودن در کیفیت محصول نهایی تاثیرگذار بود. از طرفی استفاده و تعویض کاغذهای فیلتر به دفعات زیاد و همچنین استفاده از خاک دیاتومه از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه نبود.

– بررسی مقایسه نمونه ها در آزمون فولکولاسیون رامون (Kf ,Lf)

همان‌طور که در جدول ۲ و شکل ۲ آزمون فولکولاسیون رامون، در دو روش جداسازی توکسین مشاهده گردید، میزان Lf توکسین در نمونه سپراتور در مقایسه با نمونه مستقیم از فرمانتور و نیز نمونه فیلتر پرس با نمونه فرمانتور، افت کمتری دارد. همچنین در بررسی مقایسه سپراتور و نمونه مستقیم فرمانتور، زمان فولکوله شدن (Kf)، در روش سپراتور در دو سری ساخت، با نمونه‌ی مستقیم فرمانتور برابر، و در یک سری‌ساخت، حتی از آن کمتر بود. این در حالی بود که میزان زمان به‌دست آمده (Kf)، در روش فیلترپرس سایتز از هر دو نمونه قبلی بیشتر بود. این امر مبین این است که عکس‌العملی ضعیف‌تر در واکنش اتصال توکسین به آنتی بادی در نمونه‌ی فیلترپرس سایتز نسبت به دو نمونه‌ی دیگر وجود داشت که این مسئله به علت زمان طولانی در رسیدن به محصول نهایی، دست‌کاری بیش از حد در روند فیلتراسیون، تاثیرات خاک دیاتومه، تاثیر عوامل محیطی در نمونه‌های فیلترپرس سایتز بود.

– بررسی مقایسه‌ی محصول از لحاظ حجم و زمان

در انجام عمل جداسازی، میزان حجم ورودی از فرمانتور به هرکدام از روش‌های جداسازی، به یک اندازه (۱۷۵ لیتر) بود. در حالی که میزان خروجی در روش جداسازی توکسین با سپراتور در هر سه سری ساخت، حدود ۱۶–۱۳ لیتر کمتر از حجم اولیه‌ی ورودی، و در روش جداسازی توکسین با فیلترپرس سایتز در محدوده ۳۴–۳۰ لیتر کمتر از حجم اولیه‌ی ورودی، بود. علت کم شدن محصول در روش فیلترپرس سایتز، علیرغم پیکره باکتری‌های کشت یافته و ذرات معلق محیط کشت مورد استفاده، هدر رفت محصول در هنگام تعویض صفحات فیلتر بود. بحث دیگر در مقایسه این دو روش، زمان رسیدن به یک محصول (توکسین شفاف) بود که در روش جداسازی با سپراتور، رسیدن به محصول در زمان ثابت و مشخص و خیلی کم (۲ ساعت)، در هر سری‌ساخت، اتفاق افتاد. این در حالی بود که رسیدن به محصول نهایی شفاف (هر چند، کدر تر از محصول سپراتور)، بسیار طولانی تر (۱۰–۹ ساعت)، اتفاق افتاد. نتیجه


www.SID.ir

Archive of SID

به‌دست آمده نیز حاکی از یکی دیگر از مزایا و برتری‌های روش سپراتور بود.

- بررسی و مقایسه نتایج کمترین دوز کشنده (MLD)

همان‌گونه که در نتایج ثبت شده در نمودار آزمون کمترین دوز کشنده‌ی سم *کورینه باکتریوم دیفتریه*، حاصل از کشت فرمانتوری آن به‌دست آمد، پایین‌ترین رقت تهیه شده سم در نمونه‌های روش جداسازی توکسین با سپراتور، نیز کشنده بودند. ولی در نمونه های روش جداسازی توکسین با فیلترپرس سایتز، پایین‌ترین دوز کشنده میزان ۱:۸۰۰۰ بود. این موضـوع، نشـان دهنده قدرت بالاتر کشندگی توکسین حاصله از روش جداسازی با سپراتور و عملکرد بهینه‌ی ساختار پروتئینی و خالص‌تر بودن توکسین، نسبت به توکسین حاصله از روش فیلترپرس سایتز بود.

- بررسی و مقایسه نتایج آزمون سمیت اختصاصی (STT)

در این آزمون، پس از سمیت زدائی توکسین‌های به‌دست آمده در هر دو روش نمونه‌های برداشت شده، به خوکچه های هندی، نژاد پیربرایت، با جنسیت ماده و وزن محدوده‌ی ۲۵۰-۳۵۰ گرم تزریق گردید. طبق نتایج به دست آمده و ثبت شده در نمودار که از وزن‌گیری و میزان متوسط روزانه رشـد آن‌ها حاصل شد، در سه نمونه تزریق شده از روش سپراتور، حاصل از سه سری ساخت، میانگین رشد روزانه خوکچه‌ها به ترتیب (۴/۷۳، ۵/۰۲، ۴/۸۷) گرم، ثبت گردید. و در سه نمونه تزریق شده از روش فیلترپرس سایتز، حاصل از سه سری ساخت، میانگین رشد روزانه خوکچه‌ها به ترتیب (۳/۴۲، ۳/۵، ۳/۴۲) گرم، ثبت گردید. بنابر این رشد روزانه خوکچه‌های مورد آزمون قرار گرفته، توسط روش اول (سپراتور) بیش‌تر از رشد روزانه خوکچه‌های روش دوم ( فیلترپرس سایتز)، بود. که میتواند مبین کیفیت بالاتر محصول در روش جداسازی با سپراتور باشد.

- مقایسه‌ی نتایج تست SDS-PAGE ژل الکتروفورز

در بررسی به عمل آمده در این آزمون ۵ نمونه سپراتوری و ۴ نمونه فیلترپرسی در چاهک‌های ژل ساخته شده، ریخته شد. آن‌گونه که در ژل مشاهده گـردید، نمونه های خام و $^{1}/_{2}$ رقیق شـده با بافر روش سـپراتور باندهای مشخص‌تری با رنگ‌گیری بیشتر و واضح‌تر، با وزن مولکولی 58.3 KD نسبت به نمونه های $^{1}/_{2}$ رقیق شده با بافر روش فیلترپرس سایتز بود. گرچه پروتئین‌های 58.3 KD روش فیلترپرسی هم باندهای مشخصی از خود نشان دادند. علاوه بر موارد مذکور، محصول روش سپراتور به علت کم‌ترین مداخله دست امن‌تر و قابل اعتمادتر بود.

## نتیجه‌گیری

جداسازی توکسین *کورینه باکتریوم دیفتریه*، حاصل از کشت فرمانتوری کورینه باکتریوم دیفتریه، یکی از مهمترین موارد در رسیدن به افزایش کیفیت، خلوص و میزان تولید بهینه واکسن آن می‌باشد. این موضوع اهمیت روشی مناسب برای جداسازی بهینه و محصولی شفاف از کشت فرمانتوری باکتری دیفتری را میطلبد. اگرچه چالشهای موجود در توسعه و بهینه سازی واکسن بمنظور تولید واکسنی سالم تر و قوی تر همواره معضلاتی را بهمراه دارد که پرداختن به آنها از حوصله این مقال خارج است (۱۲ و ۱۱). در این مطالعه مشخص شد، می‌توان روش جداسازی توکسین *کورینه باکتریوم دیفتریه* حاصـل از کشت فرمانتوری با دستگاه سپراتور را، جایگزین روش متداول جداسازی توکسین با فیلترپرس سایتز نمود. چرا که روش جدید (جداسازی با سپراتور)، در آزمون‌های میزان کمترین دوز کشنده (MLD)، آزمون سمیت اختصاصی (STT)، میزان شفافیت محصول حاصله، کاهش هدر رفت زمان در رسیدن به محصول نهایی، کاهش هدررفت محصول و در نتیجه به دست آوردن محصول


www.SID.ir

Archive of SID

بیشتر، عدم استفاده از خاک دیاتومه و در نتیجه حفظ سلامت پرسنل تولید، کاهش خطر آلودگی محصول به علت کمترین مداخله دستی در مرحله جداسازی و همچنین اقتصادی‌تر و مقرون به صرفه‌تر بودن آن در تولید صنعتی واکسن دیفتری نسبت به روش متداول (جداسازی با فیلترپرس سایتز)، برتری‌های قابل توجه و قابل قبولی از خود نشان داد. عوامل فوق الذکر توانست در تولید هر چه با کیفیت تر و باصرفه‌تر بودن تولید واکسن بیماری دیفتری از لحاظ اقتصادی، تاثیر در خور توجهی داشته باشد.

## منابع

1-Choe S, Bennett MJ, Fujii G, Curmi PMG, Kantardjieff KA, Collier RJ, et al. The crystal structure of diphtheria toxin. Nature. 1992;357(6375):216-22.
2-Requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines. WHO Expert Committee on Biological Standardization Fortieth Report Geneva, World Health Organization. 1990.
3-Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines. WHO. 2013.
4-Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of DT-based combined vaccines. WHO. 2012.
5-Uchida T, Pappenheimer AM, Greany R. Diphtheria toxin and related proteins I. Isolation and properties of mutant proteins serologically related to diphtheria toxin. Journal of Biological Chemistry. 1973;248(11):3838-44.
6-Ouchterlony O. In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria. APMIS. 1948;25(1-2):186-91.
7-Kempken R, Preissmann A, Berthold W. Assessment of a disc stack centrifuge for use in mammalian cell separation. Biotechnology and bioengineering. 1995;46(2):132-8.
8-UDAYA BHASKARA RAO Y, Mahadevan M, Michaels S. Evaluation of microporous tangential-flow filtration in the production of Diphtheria and Pertussis vaccines. Pharmaceutical technology. 1992;16(9):102.-
9-Besnard L, Fabre V, Fettig M, Gousseinov E, Kawakami Y, Laroudie N, et al. Clarification of vaccines: An overview of filter based technology trends and best practices. Biotechnology advances. 2016;34(1):1-13.
10-Sundaran B, Palaniappan C, Rao YUB, Boopathy R, Bhau LNR. Tangential flow filtration technology applicable to large scale recovery of diphtheria toxin. Journal of bioscience and bioengineering. 2002;94(2):93-8
11-Ulmer JB, Valley U, Rappuoli R. Vaccine manufacturing: challenges and solutions. Nature biotechnology. 2006;24(11):1377-83.
12-Zanders ED. Commercial Aspects of Drug Development. The Science and Business of Drug Discovery: Springer; 2011. p. 305-28.



www.SID.ir

Archive of SID

# Comparison of the Diphtheria Toxin Separation Methods on Standard Vaccine Strain Using Separator and Filter Presses to Improve the Quality & Quantity of the Final Product

**Ardeshir Faramarzi[1], Mojtaba Noofeli[2*], Azadeh Tofighi[3], Fereshteh Shahcheraghi[4]**

*1-Master of Razi Vaccine and Serum Research Institute.*
*2-Associate Professor of Razi Vaccine and Serum Research Institute.*
*3-Assistant Professor of Microbiology.*
*4-Professor of Microbiology.*

*1,2-Department of Human Vaccines Research & Production; Razi Vaccine and Serum Research Institute; Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO); Karaj, Iran.*
*3-Department of Microbiology, Science Faculty, Zanjan Azad University, Zanjan, Iran.*
*4-Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Tehran, Iran.*

**Corresponding author:*
*Mojtaba Noofeli; Department of Human Vaccines Research & Production; Razi Vaccine and Serum Research Institute; Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO); Karaj, Iran.*
*Tel:+989198386718*
*Email: noofeli1234@yahoo.com*

## Abstract

**Background & Aim:** The aim of this research was based on increasing of the quantity, quality and effectiveness of this vaccine, protection of personnel and cost-benefit of production. In this regard two diphtheria toxin separation methods (Separator and Filter press) were compared.

**Methods:** *Corynebacterium diphtheria* (PW-8/CN-2000) was cultivated in 350L fermentor and half of the cultivation toxin clarified by Seitz filter press method and diatomaceous earth as filter aid and the rest was clarified by separator. Three sterile samples (50 mL) of each three produced batches were assessed by minimum lethal dose (MLD), specific toxicity test (STT), toxin flocculation titer (Lf, Kf – Ramon flocculation test) and SDS–PAGE. Other parameters like time consumption for toxin clarification with specific volume, quantity, product clarification, volume and clarification of product in two methods compared.

**Results:** The results confirmed that the separator clarification method was more advantageous to filter press. Also, volume and transparency of the final product after clarification by separator were better than Filter press method. In addition, the separation time and costs used in the separator method were much less than Filter press method.

**Conclusion:** In conclusion, use of separator clarification method was suitable alternative to current filter press method in terms of quantity and quality of diphtheria vaccine production.

**Keywords:** *Corynebacterium Diphtheria*, Vaccine, Toxin Separation, Separator, Filter Press.

►*Please cite this paper as:*
*Noofeli M, Faramarzi A, Tofighi A, Shahcheraghi F. Comparison of the Diphtheria Toxin Separation Methods on Standard Vaccine Strain Using Separator and Filter Presses to Improve the Quality & Quantity of the Final Product. Jundishapur Sci Med J 2020; 18(6):459-470*

**Received: Apr 18, 2019** **Revised: July 23, 2019** **Accepted: July 30, 2019**


www.SID.ir