مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم شماره سی و یکم - تابستان ۱۳۹۷

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بهینه سازی ترسیب توکسوئید دیفتری به‌منظور ارتقاء واکسن به‌وسیله آمونیوم-سولفات فوق اشباع

میثم اکرمی[۱]، مجتبی نوفلی*[۲]، میترا السادات طباطبایی[۱]

۱ . گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، تحقیقات کشاورزی، سازمان آموزش و پژوهش و توسعه (AREEO) ،کرج، ایران

چکیده

سابقه و هدف: کورینه باکتریوم دیفتریه باکتری هوازی و بی‌هوازی اختیاری است. مهم‌ترین گونه از خانواده کورینه باکتریاها، عامل بیماری دیفتری است که به‌وسیله توکسین خود، بیماری دیفتری را ایجاد می‌کند. آمونیم‌سولفات نمکی معدنی است که از آن برای ترسیب و خالص‌سازی پروتئین ها استفاده می‌شود که با افزایش مقدار نمک حلالیت پروتئینی کم شده و پروتئین‌ها به‌واسطه قطعه‌های هیدروفوب خود، به‌هم پیوسته و رسوب می‌کنند. واکسن دیفتری از طریق تخلیص و ترسیب توکسوئید باکتری دیفتری تهیه می‌شود که از جمله روش‌های ترسیب، استفاده از آمونیوم‌سولفات به‌صورت نمک خشک و یا تهیه محلول فوق اشباع از آن است.

مواد و روش‌ها: کشت باکتری دیفتری در شرایط بهینه و مغذی سبب افزایش تولید توکسین توسط باکتری می‌شود و بعد از غیرفعال‌سازی توکسین و تبدیل آن به توکسوئید در صنایع تولید واکسن مورد استفاده قرار می‌گیرد. کلیه محیط‌های کشت باید حداقل به‌مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شوند. به‌منظور ترسیب توکسوئید باکتری از محلول فوق اشباع ۴/۳۲ مولار آمونیوم با درصدهای مختلف سولفات استفاده شد. نتایج به‌دست آمده از این روش با *SDS PAGE* و *Lf TEST (Lateral flow test)* مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: استفاده از آمونیوم‌سولفات فوق اشباع۴/۳۲ مولار به‌جای استفاده از نمک خشک آمونیوم‌سولفات که در روش سنتی (WHO TRS, No.980) که قبل در صنایع واکسن‌سازی مورد استفاده قرار می‌گرفت، باعث حذف مرحله طولانی مدت دیالیز شده و از طرفی هدر رفت محصول نهایی (توکسوئید) را به‌صورت کامل محسوس کاهش داده و هم‌چنین باعث حذف ناخالصی‌های ناخواسته از محصول نهایی شده و محصول نهایی خالص‌تر را در مقیاس بیش‌تر در اختیار قرار داده است.

نتیجه‌گیری: از آنجایی‌که هدف در صنایع تولید واکسن، دست‌یابی به مقدار حداکثری توکسوئید از این باکتری است لذا استفاده از آمونیوم‌سولفات فوق اشباع ۴/۳۲ مولار برای ترسیب توکسوئید دیفتری به‌جای استفاده از نمک خشک آمونیوم-سولفات باعث کاهش هدر رفت محصول نهایی و حذف مرحله زمان بر و غیر اقتصادی دیالیز شده و از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه‌تر خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: واکسن، دیفتری، ترسیب، توکسوئید، آمونیوم‌سولفات

نویسنده مسئول :
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
پست الکترونیکی:noofeli1234@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۳

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

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. کورینه باکتریوم‌ها شامل دو گروه بیماری‌زا و غیربیماری‌زا هستند. گروه غیربیماری‌زا را تحت عنوان دیفتروئیدها می‌شناسند که به‌صورت فلور نرمال در بینی، گلو، دستگاه تنفسی وجود دارند. مهم‌ترین گونه از خانواده کورینه باکتریاها، عامل بیماری دیفتری است. این باکتری باسیل گرم مثبت، کاتالاز مثبت، چماقی شکل و به شکل حروف چینی دیده می‌شود (۵،۱). ظاهری دندانه‌دار و تسبیح مانند دارد. هوازی و یا بی‌هوازی اختیاری است و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد (حداقل ۲۰ و حداکثر ۴۰ درجه) رشد می‌کند. آمونیم‌سولفات نمکی معدنی است که از آن برای ترسیب و خالص‌سازی پروتئین‌ها استفاده می‌شود که با افزایش مقدار نمک حلالیت پروتئینی کم شده و پروتئین‌ها به‌واسطه قطعه‌های هیدروفوب خود به‌هم پیوسته و رسوب می‌کنند (۲،۱۴). در واقع با افزایش غلظت نمک آمونیوم‌سولفات، پروتئین دیفتری در درصدهای خاصی کم‌ترین و بیش‌ترین رسوب را دارند که اساس جداسازی پروتئین محسوب می‌گردد (۲۱،۴). تست Lf در واقع تست ای برای تشخیص حضور و یا عدم حضور آنتی‌ژن در نمونه (توکسوئید) خالص شده است که در اصل مواجهه کردن آنتی‌بادی استاندارد با آنتی‌ژن است (۲۰،۸). تست Kf هم‌زمان با تست Lf ارزیابی می‌شود. در واقع Kf مدت زمانی است که به‌طول می‌انجامد تا لوله‌ها با نسبت‌های مختلف حاوی آنتی‌ژن اولین فولیکولاسیون (کلوئید) را نشان دهند. این زمان مدت زمانی است که برهم‌کنش ضدآنتی‌بادی با آنتی‌بادی را برای هر لوله نشان می‌دهد. از آنجایی‌که ترسیب واکسن دیفتری در روش‌های سنتی با استفاده از آمونیوم‌سولفات خشک زمان‌بر، پر هزینه و با هدر رفت محصول همواره همراه بوده است، لذا نیاز به طراحی روشی جدید و بدون اشکال‌های روش‌های گذشته، بیش از پیش احساس شد که هدفی برای استفاده از آمونیوم‌سولفات فوق اشباع به‌جای استفاده از نمک خشک آمونیوم‌سولفات برای ترسیب توکسوئید باکتری دیفتری در طرح انجام گرفته است (۱۷،۹).

روش کار

به‌منظور کشت باکتری، ابتدا سویه باکتریایی واکسن دیفتری از بخش واکسن‌های باکتریایی انسانی مؤسسه رازی تحویل گرفته شد. سپس باکتری در محیط مغذی لوفلر کشت داده شد و سپس کلنی‌ها به محیط Steiner با حجم ۱۵۰ میلی‌لیتر انتقال داده شد. بعد از رشد نسبی باکتری در محیط Steiner با حجم ۱۵۰ میلی‌لیتر کلنی ها را به حجم ۲ لیتر از همان محیط وارد کرده و کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت انکوبه کردن محیط کشت باکتری، توکسین از محیط کشت جداسازی و غیرفعال گردید. در نهایت کلنی‌ها به فرمانتور ۳۵۰ لیتری منتقل شد و مراحل تغلیظ بر روی آن‌ها انجام گرفت که این فرآیند باعث شد توکسین تهیه شده به حجم ۳۰ لیتر تغلیظ و کاهش یابد (۲۲). سپس توکسین با فرمالدهید غیرفعال شده و تبدیل به توکسوئید شد سپس Crude Antigen از محلول حاوی توکسین و محیط کشت جداسازی شده و برای مرحله ترسیب فرستاده شد. ۱ لیتر توکسوئید تغلیظ شده از بخش تولید واکسن‌های باکتریایی انسانی (DTP) مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد و این حجم در ۱۰ لوله به‌طور مساوی تقسیم شد (هر لوله ۱۰۰ میلی‌لیتر) و با افزودن محلول فوق اشباع آمونیوم‌سولفات ۴/۳۲ مولار به‌صورت مایع، با درصدهای مختلف (۰ تا ۵۰ درصد) به هر کدام از ۱۰ لوله اضافه گردید (هر لوله با درصد خاص از آمونیوم-سولفات) و ترسیب به‌صورت OVER NIGHT در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (۹،۴). مایع رویی یا سوپرناتانت حاصل از اضافه شدن درصدهای مختلف

Archive of SID
www.SID.ir

آمونیوم‌سولفات، ابتدا توسط تست Lf و سپس توسط ژل ۱۰ درصد آکریل آمید SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۳). پس از ترسیب توکسوئید به‌وسیله درصدهای مختلف آمونیوم‌سولفات فوق اشباع، تست Lf و Kf بر روی لوله‌های مورد آزمایش انجام گرفت، به این ترتیب که محلول آنتی‌بادی با نسبت‌های ۰ تا ۹۰ درصد رقیق‌سازی شد، تعداد ۱۰ لوله با نسبت‌های مختلف آنتی‌بادی تهیه شده و سپس ۱ میلی‌لیتر آنتی‌بادی (۰ تا ۹۰ درصد) به همراه ۱ میلی‌لیتر نمونه توکسوئید ترسیب شده با آمونیوم‌سولفات فوق اشباع ۴/۳۲ مولار (لوله‌هایی که دارای ترسیب بیش‌تر و هم‌چنین داری جذب بالا در دستگاه اسپکتوفتومتر بودند) به هرکدام از لوله‌های اضافه شد و حجم کلی هر کدام از لوله‌ها با سرم فیزیولوژی به ۱۰ میلی‌لیتر افزایش یافت، سپس لوله‌ها در هر دقیقه مورد بررسی قرار گرفتند (۱۳،۱۲). بررسی لوله‌ها در یک محیط به‌طورکامل تاریک مانند باکس و یا جعبه‌ای سیاه رنگ که تنها یک لامپ در آن تعبیه شده صورت گرفت. اولین لوله‌ای که در آن فولیکولاسیون (کلوئید) تشکیل شد به‌عنوان لوله دارای Lf بالا و به‌عبارت بهتر نمونه دارای بیش‌تر آنتی‌ژن یا پروتئین توکسوئید مشخص شد (۲۴،۱۰). ۱۰ میکرولیتر از لوله‌های حاوی توکسوئید ترسیب شده با درصدهای مختلف از آمونیوم‌سولفات نمونه تهیه شد و ۱۰ میکرولیتر نیز به آن‌ها سمپل بافر اضافه شد تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شود، سپس نمونه‌ها به چاهک‌های ژل آماده شده ۱۰ درصد آکریل آمید SDS-PAGE اضافه شد و به‌مدت ۱/۵ ساعت با ولتاژ ۱۱۰ ولت الکتروفورز انجام گرفت. ژل الکتروفورز شده با کوماسی‌بلو رنگ‌آمیزی شد و نتایج آن مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

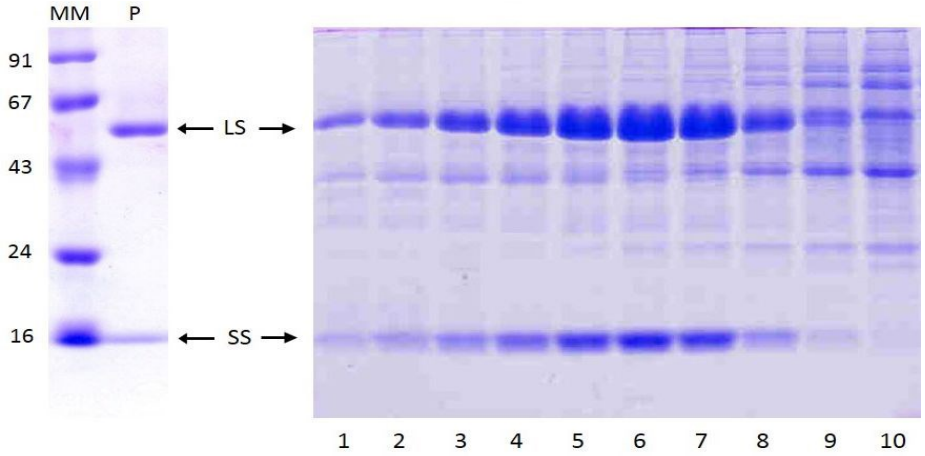
هدف در صنایع تولید واکسن، حفظ حداکثری محصول نهایی است. لذا بهینه‌سازی روش تولید محصول در حوزه تحقیق و توسعه از موارد مهم بشمار می‌رود. ترسیب توکسوئید دیفتری و تک مرحله‌ای نمودن آن نیز از اهمیت زیادی در تولید برخوردار است. در این تحقیق از محلول آمونیوم‌سولفات فوق اشباع ۴/۳۲ مولار به‌جای پودر خشک آن، استفاده گردید (جدول ۱) و نتایج بیان‌گر این مطلب است که در محلول آمونیوم‌سولفات ۴۰ درصد، مایع رویی یا سوپرناتانت توکسوئید دیفتری، بیش‌ترین فعالیت Lf و کوتاه‌ترین زمان Kf را دارا است و در SDS-PAGE نیز کم‌ترین پروتئین‌های ناخواسته را دارد.

جدول ۱- ترسیب توکسوئید با درصدهای مختلف آمونیوم‌سولفات و تست LF و KF انجام شده از این درصدها

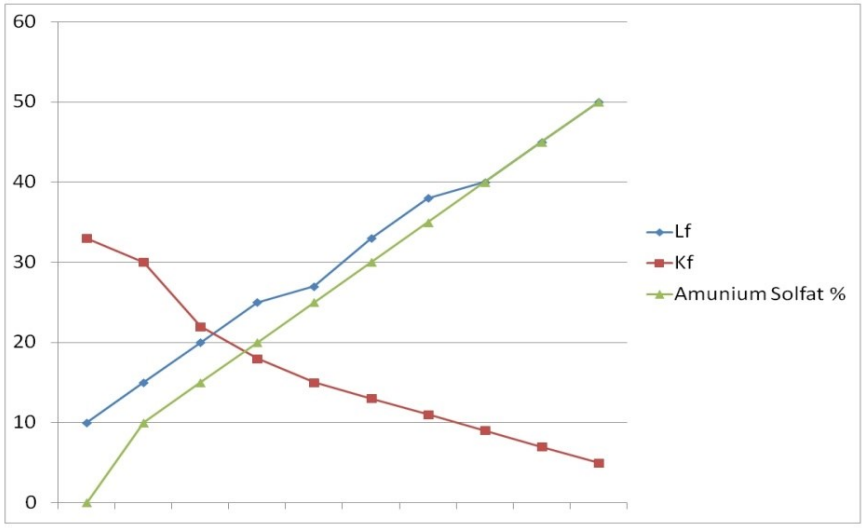
شماره آزمایش	درصد آمونیوم-سولفات (%)	Lf/ml	Kf (min)
۱	۰	۱۰*۲۵	۳۳
۲	۱۰	۱۵*۲۵	۳۰
۳	۱۵	۲۵*۲۵	۲۲
۴	۲۰	۲۷*۲۵	۱۸
۵	۲۵	۳۰*۲۵	۱۵
۶	۳۰	۳۵*۲۵	۱۳
۷	۳۵	۴۰*۲۵	۱۱
۸	۴۰	۴۵*۲۵	۹
۹	۴۵	۵۰*۲۵	۷
۱۰	۵۰	۵۵*۲۵	۵

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- ترسیب توکسوئید با درصدهای مختلف آمونیوم‌سولفات و تست SDS-PAGE انجام شده از این درصدها. عنوان هر کدام از چاهک‌ها به‌ترتیب: MM: مارکر – P: کنترل مثبت (توکسوئید خاص) - چاهک شماره ۱: آمونیوم‌سولفات ۰ درصد – چاهک شماره ۲: آمونیوم‌سولفات ۵ درصد – چاهک شماره ۳: آمونیوم‌سولفات ۱۰ درصد – چاهک شماره ۴: آمونیوم‌سولفات ۲۰ درصد – چاهک شماره ۵: آمونیوم‌سولفات ۳۰ درصد – چاهک شماره ۶: آمونیوم‌سولفات ۴۰ درصد – چاهک شماره ۷: آمونیوم‌سولفات ۴۵ درصد – چاهک شماره ۸: آمونیوم‌سولفات ۵۰ درصد – چاهک شماره ۹: آمونیوم‌سولفات ۶۰ درصد – چاهک شماره ۱۰: آمونیوم‌سولفات ۷۰ درصد.



نمودار ۱ - نمودار تست Kf و Lf بعد از ترسیب با غلظت‌های مختلف از آمونیوم‌سولفات

بحث

در سال‌های اخیر تلاش‌های بسیاری برای بهبود روش‌های تخلیص و ترسیب توکسوئید دیفتری و افزایش راندمان واکسن و کاهش هزینه‌ها صورت گرفته است، در سال ۲۰۱۱، Fernando Fratelli و همکاران از mPEG (polymer methoxypolyethylene glycol) برای تخلیص توکسوئید دیفتری استفاده کردند (۷)، هم‌چنین در سال ۲۰۱۵، Chandani Payal و همکاران از اولترا فیلتر (UF) برای تخلیص توکسوئید استفاده کردند (۱۵)، اما در هر دو مطالعه انجام گرفته ترسیب توکسوئید دیفتری به‌روش WHO TRS , No. 980 و با استفاده از نمک خشک آمونیوم‌سولفات بوده است. با توجه به‌روش توصیه شده سازمان بهداشت جهانی در WHO

www.SID.ir

Technical Report Series (TRS) , No. 980 که در قبل برای ترسیب توکسوئید دیفتری مورد استفاده قرار می گرفت و اساس آن استفاده از آمونیوم‌سولفات به‌صورت پودر خشک و اضافه کردن آن در چندین مرحله است، میزان هدر رفت محصول نهایی به‌دلیل آلودگی پودر خشک نمک آمونیوم‌سولفات، اشباع آنی توکسوئید و عدم انحلال کامل نمک در توکسوئید، زمان‌بر بودن فرآیند ترسیب با نمک خشک، نگه‌داری به مراتب سخت‌تر پودر خشک نمک آمونیوم‌سولفات و هم‌چنین عدم صرفه اقتصادی هزینه‌های ترسیب و نیاز به مرحله دیالیز در روش توصیه شده سازمان بهداشت جهانی (WHO TRS , No. 980)، هدفی برای طراحی روش جدید برای ترسیب توکسوئید دیفتری شد که در مطالعه جاری مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج آن مشهود است. هدر رفت محصول در این روش (استفاده از آمونیوم سولفات فوق اشباع ۴/۳۲ مولار به جای استفاده از پودر خشک آمونیوم‌سولفات) تا ۲۵ درصد کاهش یافت و از لحاظ اقتصادی نیز مقرون به‌صرفه‌تر بود، از آنجا که این روش بر خلاف روش سنتی گذشته به‌صورت تک مرحله‌ای انجام می‌شود، ۴۸ ساعت صرفه‌جویی در زمان انجام می‌گیرد و از طرفی مرحله دیالیز که خود در ۷۲ ساعت و به‌منظور حذف نمک‌های اضافی انجام می‌گرفت به‌طور کامل حذف شد و این روش بدون نیاز به مرحله دیالیز می‌تواند ترسیب توکسوئید را انجام دهد.

نتایج بیان‌گر آن است که روش طراحی شده برای ترسیب توکسوئید دیفتری از جوانب بسیاری قابل بسط است که می‌توان به‌صرفه اقتصادی و کاهش هزینه‌ها، آلودگی کم‌تر محصول نهایی، Lf بالاتر و فلوکولاسیون (Kf) در زمان کوتاه‌تر، حذف کلی مرحله دیالیز که به‌منظور حذف نمک‌های اضافی از محصول نهایی مورد استفاده قرار می گرفت و در نهایت صرفه‌جویی در زمان اشاره کرد (۴،۲۱). در مقیاس صنعتی با توجه به حجم عظیم توکسوئید و میزان محصول نهایی به‌منظور تولید واکسن دیفتری، کوتاه شدن مراحل ترسیب، حذف مراحل اضافی، کاهش هدر رفت نمک آمونیوم‌سولفات و در نهایت محصول نهایی بیش‌تر و خالص‌تر یکی از اهداف اصلی برای تولید واکسن پایدارتر در تمامی مراکز تحقیقاتی واکسن در جهان است. این تحقیق قابلیت استفاده برای تولید توکسوئید دیفتری در مقیاس صنعتی را دارد و از بسیاری جهت‌های اقتصادی، روش‌های تولیدی و تحقیقاتی مقرون به‌صرفه‌تر است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از آمونیوم‌سولفات فوق اشباع ۴/۳۲ مولار مایع به‌جای استفاده از پودر خشک آمونیوم سولفات به‌منظور ترسیب توکسوئید دیفتری با هدف ارتقاء کیفیت واکسن، علاوه بر صرفه اقتصادی و زمانی می‌تواند روشی جدید برای ترسیب توکسوئید دیفتری در فاز صنعتی و حجم بالا نیز باشد، زیرا هدر رفت محصول نهایی، عدم آلودگی توکسوئید در مراحل ترسیب و هزینه‌های تولید توکسوئید که در روش‌های قبل در چندین مرحله زمان بر انجام می‌گرفت در این روش به حداقل ممکن کاهش یافته و کیفیت واکسن با توجه به کوتاه شدن مراحل ترسیب، حذف مراحل اضافی، تک مرحله‌ای شدن مرحله اضافه کردن نمک آمونیوم‌سولفات و در نهایت حذف مرحله دیالیز، نیز افزایش می‌یابد.

سپاسگزاری

با تشکر و قدردانی فراوان از:

دکتر رسول مدنی مدیریت بخش پروتئومیکس و بیوشیمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی

دکتر علی نظری مسئول آزمایشگاه پروتئومیکس مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی

Archive of SID

www.SID.ir

سرکار خانم مهندس مائده سمیعانی کارشناس آزمایشگاه
پروتئومیکس مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی

مهندس فرامرز عمادی آذر کارشناس بخش توبرکولین
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی

جناب آقای اسمعلی هاشم‌پور

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1- Bennett, M. J. and G. Fujii. "The crystal structure of diphtheria toxin." 1992;Nature 357(6375): 216.

2- Brgles, M., Prebeg, P., Kurtović, T., Ranić, J., Marchetti-Deschmann, M., Allmaier, G., & Halassy, B. Optimization of tetanus toxoid ammonium sulfate precipitation process using response surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2016; *46*(7), 695-703.

3- Chung, Y. J., Lee, J. A., Jung, M. Y., Lee, S. M., Kim, T. Y., Choe, Y. K., & Kim, I. H. Optimization of diphtheria toxin production by Corynebacterium diphtheriae using a casein-based medium in a fermenter. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 2016; *21*(4), 537-543.

4- Collier, R. "Diphtheria toxin: structure and function of a cytocidal protein." ADP-ribosylating toxins and G proteins: 1990; 3-19.

5- Dhar, D., Rakshit, P., Tahlan, A. K., Ghoshal, M., Kumbhare, F., Kashyap, T., & Gupta, R. K. World Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015.

6- Forgac, M. "Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps." Physiological reviews. 1989; 69(3): 765-796.

7- Fratelli, F., Abrahão-Neto, J., Caricati, A. T. P., Borges, M. M., Guidolin, R., & Caricati, C. P. An alternative method for purifying and detoxifying diphtheria toxin. *Toxicon*, 2011; *57*(7), 1093-1100.

8- Gill, D. M. and L. L. Dinius. "Observations on the structure of diphtheria toxin." Journal of Biological Chemistry. 1971; 246(5): 1485-1491.

9- Kurokawa, M., et al. "ON THE ANTIGENICITY OF DIPHTHERIA TOXOID. PART II. PRELIMINARY REPORT ON THE IMMUNIZING POTENCY OF DIPHTHERIA TOXOID FRACTIONS ISOLATED AT LOWER AMMONIUM SULFATE CONCENTRATION." The Japanese Medical Journal1951; 4(4): 233-238.

10- Linggood, F., et al. "The toxoiding of purified diphtheria toxin." British journal of experimental pathology1963; 44(2): 177.

11- MØYNER, K. and G. CHRISTIANSEN. "Comparison of gel filtration and ammonium sulphate precipitation in the purification of diphtheria toxin and toxoid." APMIS 1984; 92(1-6): 17-23.

12- Muni, C., Mani, K. R., & Subashkumar, R. Large scale recovery of tetanus toxin and toxoid from fermentation broth by microporous tangential flow filtration. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*, 2013; *4*(2), 28-37.

13- Northrop, J. H. "Purification and crystallization of diphtheria antitoxin." The Journal of general physiology 1942; 25(3): 465-485.

14- Pappenheimer Jr, A. "Diphtheria toxin." Annual review of biochemistry1977; 46(1): 69-94.

Archive of SID

www.SID.ir

15- Payal, C., & Kashyap, T. Production, Optimization of Detoxification and Ammonium Sulphate Precipitation of Ultrafiltered Tetanus Toxin. *Recent Research in Science and Technology*,2015; *3*(11).

16- Pina, L. M., Bassily, E., Machmer, A., Hou, V., & Reinhardt, A. Safety and immunogenicity of a quadrivalent meningococcal polysaccharide diphtheria toxoid conjugate vaccine in infants and toddlers: three multicenter phase III studies. *The Pediatric infectious disease journal*, 2012; *31*(11), 1173-1183.

17- Pope, C. and M. F. Stevens. "The purification of diphtheria toxin and the isolation of crystalline toxin-protein." British journal of experimental pathology 1958; 39(2): 139.

18- Relyveld, E. H., Bizzini, B., & Gupta, R. K. Rational approaches to reduce adverse reactions in man to vaccines containing tetanus and diphtheria toxoids. *Vaccine*, 1998*;16*(9-10), 1016-1023.

19- Stojićević, I., Dimitrijević, L., Dovezenski, N., Živković, I., Petrušić, V., Marinković, E., ... & Stojanović, M. Tetanus toxoid purification: Chromatographic procedures as an alternative to ammonium-sulphate precipitation. *Journal of Chromatography B*, 2011; *879*(23), 2213-2219.

20- Sundaran, B., Rao, Y. U. B., & Boopathy, R. Process optimization for enhanced production of diphtheria toxin by submerged cultivation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2001; *91*(2), 123-128.

21- Tchorbanov, A. I., Dimitrov, J. D., & Vassilev, T. L. Molecular composition of diphtheria toxoid produced using semi-synthetic and meat extract-based broths. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004;*20*(2), 211-217.

22- Vancetto, M. D. C., Oliveira, J. M. D., Prado, S. M. A., Fratelli, F., & Higash, H. G. Tetanus toxoid purification: A case study. *Nature biotechnology*, 1997; *15*(8), 807-808.

23- Vose, J. R., Fahim, R. E., Jackson, G. E., Tan, L. U., Herbert, A., Boux, L., ... & Klein, M. H. *U.S. Patent No. 6,399,076*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. 2002.

24- Zakikhany, K., & Efstratiou, A. Diphtheria in Europe: current problems and new challenges. *Future microbiology*, 2012*; 7*(5), 595-607.

Archive of SID

www.SID.ir