Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۶ بهار ۱۳۹۴
DOI:10.22034/vj.2015.100912

تولید آزمایشگاهی واکسن توکسوئید– باکترین پنج ظرفیتی کلستریدیائی و مقایسهٔ 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: دی‌ماه ۹۲

Emali: r.pilehchian@rvsri.ac.ir

چکیده

کلستریدیوم ها باکتری های بی هوازی گرم مثبت هاگ دار بوده و نقش مهمی در ایجاد بیماری های انسان و دام دارند. در این پژوهش سه گروه واکسن شامل، واکسن پنج ظرفیتی باکترین (کشت فرمله) تولید شـده در شیشه های بیسـت لیتری و جذب شده روی یاور هیدروکسید آلمینیوم، واکسن پنج ظرفیتی باکترین تولید شده در فرمانتور تحقیقاتی و جذب شده روی هیدروکسید آلمینیوم و گروه سوم واکسن پنج ظرفیتی کشـت توکسوئید-باکترین (واکسـن اولترافیلتری) تولید شـده در فرمانتور تحقیقاتی و جذب شده روی یاور هیدروکسید آلمینیوم در سطح آزمایشگاهی تولید و بررسی شد. کلیه آزمون های بیضرری، عدم وجود سـمیت غیر عادی و توان ایمنی زائی، برای هر یک از سـه نوع واکسـن انجام شد. نتایج نشان داد که هر سه نوع واکسن کارآئی داشته و قابل استفاده اند ولی واکسن توکسوئید-باکترین تولید شده به وسیلهٔ فرمانتور و اولترافیلتر، بهترین انتخاب برای تولید انبوه است.

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

www.SID.ir

Archive of SID

● 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 Shoshtary, 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, Ultrafiltartion

مقدمه

باکتـری هـای بی هوازی به دو گروه تقسـیم می شـوند، باکتری‌های بی هوازی بدون هاگ که در تولید بعضی بیماری ها و عفونت های انسان و دام اهمیت دارند و باکتری های بی هوازی هاگ دار که مهمترین جنس آن کلستریدیوم اسـت. تاکنون بیش از ۱۱۸ گونه کلستریدیوم شناسائی شده که در طبیعت و همچنین در دستگاه گوارش انسان و دام زندگی می کنند، از ایـن تعداد حدود ۱۵ گونه برای انسـان و دام بیمـاری‌زا بوده و چنانچه شـرایط زندگی و رشـد آنها در بـدن موجود زنده و حسـاس فراهم گردد بسرعت تکثیر شده و با ترشح توکسین بیماری های خطرناک و کشنده ای ایجاد می کنند. برخی از بیماری های مهم کلسـتریدیائی در انسان عبارتند از مسـمومیت غذایی، گازگانگران، عفونت رحم و سقط جنین که به وسیله کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ A، پیگبل که به وسیله کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B و آنتریت نکروتیک که به وسـیله کلسـتریدیوم پرفرینجنز تیپ C ایجاد می شـوند. در بیماری های دامی کلسـتریدیوم پرفرینجنز تیپ B در اسـهال عفونی بره های نوزاد، انتریت نکروتیک کره اسـب و آنتروتوکسمی گوسـفند و بز در ایران، کلسـتریدیوم پرفرینجنز تیپ C در آنتروتوکسمی گوسفند، آنتریت نکر وتیک بچه خوک و آنتروتوکسمی گوساله، کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D در ایجاد آنتروتوکسمی بره و گوسفند بالغ، کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ E در آنتروتوکسـمی گاو، کلسـتریدیوم شووآی در شاربن علامتی گاو، کلسـتریدیوم سـپتیکوم در براکسی گوسـفند و کلستریدیوم نووآی در بروز قانقاریای عفونی کبد گوسـفند و بز دخالت دارند(۶، ۷، ۱۱، ۱۵، ۱۷، ۱۸).

بیماری‌های ناشـی از باکتری های بی هوازی نه تنها به طور مسـتقیم و غیر مسـتقیم باعـث مرگ و میر در دام می شـوند، بلکـه باعث کاهش رشـد و تولید فرآورده‌های دامی نیز مـی گردند. این بیماری های در اغلب دامداری‌هـای ایران وجود داشـته و موجـب تلفات سـنگین در گله های گوسـفند و بز می گردد. اگرچه رعایت نکات بهداشـتی همانند جلوگیری از پر خوری شـیر در بره ها، جلوگیـری از پرخوری علوفه تازه و یخ زده در هنـگام تعلیف دام در مـزارع و خوراندن قرص های ضـد کرم های کبدی به گوسـفند ان جوان، توسـط دامداران می تواند نقـش مهمی در کاهش بیماری های ناشـی از باکتری های بی هوازی در دامداری ها داشـته باشد، ولی براسـاس اسـتانداردهای موجود، واکسیناسـیون برای پیشـگیری از بیماری های کلسـتریدیائی ضروری بوده و اسـتفاده از واکسن بهترین راه مقابله با بیماری‌های کلستریدیائی است (۱۸، ۱۹).

واکسـن‌های کلسـتریدیائی رایج به طور معمول به صـورت باکترین (سوسپانسـیون کشـت فرمله)، توکسوئید یا توکسـوئید-باکترین (مخلوط چند توکسـوئید و کشت فرمله) ساخته می شوند (۹).در استانداردهای بین المللی میزان آنتی بادی محافظت کننده در برابر توکسـین اپسیلون برابر یا بیشـتر از ۵ IU/ml و برای توکسـین بتا برابر یا بیشتر از ۱۰ IU/ml مطرح شـده است، بنابراین تکثیر کلستریدیوم ها و تولید توکسین و تبدیل آن به توکسـوئید و تولید واکسن ایمنی زای حاوی حداقل میزان آنتی بادی های محافظت کننده بالا، بسیار سودمند بوده و باید مورد توجه قرارگیرد(۸).

واکسن های کلستریدیائی متنوعی در کشورهای مختلف تولید و به بازار عرضه میگردد همانند: Besorvax (محصول ماداگاسکار، شامل کلستریدیوم

www.SID.ir

Archive of SID

سپتیکوم و شووآی)، Barvac ۸ (محصول بهرینگ، حاوی توکسوئیدهای کلستریدیوم شووآی، سپتیکوم، همولیتیکوم، نووآی، سوردلی، پرفرینجنز تیپ های 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 به عنوان اولین واکسن کلستریدیائی تولید شده در ایران در سال ۱۳۱۴ به بازار وارد شد، سپس واکسن چند ظرفیتی آنتروتوکسمی گوسفند و بز در سال ۱۳۲۳ تولید گردید و با شناسایی تدریجی بیماری های ناشی از باکتری های بی هوازی دام و ارتقاء روش تولید، سایر واکسن های بی هوازی مورد نیاز کشور نیز در موسسه رازی تولید گردید، در حال حاضر واکسن باکترین چهار ظرفیتی آنتروتوکسمی گوسفند و بز، حاوی واکسن اسهال عفونی بره های نوزاد (کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B)، واکسن استراک یا آنتروتوکسمی گوسفند های 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 می شود (۱۳ و ۴-۱). با توجه به اینکه مصرف واکسن های چند ظرفیتی باکترین و تک ظرفیتی، پر هزینه بوده و مستلزم تزریقات متعدد و صرف وقت و انرژی زیادی است، بنابراین پژوهشی در زمینهٔ تولید واکسن توکسوئیدی چند ظرفیتی بسیار ضروری به نظر می رسید. بدین منظور می بایست ابتدا توکسین های 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 توکسین ها و فرمولاسیون مناسب، واکسن چند ظرفیتی مطابق استاندارد های بین المللی تولید و کنترل شود.

مواد و روش‌ها

۱- محیط های کشت عمومی و کنترلی: بویون مغذی، محیط کشت جگر،liver infusion broth (براث مغذی، پپتون، 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: پپتون، Na2HPO4، نمک NaCl ، سیستئین 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، پپتون، Na_2HPO_4، نمک NaCl ، سیستئین 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: پپتون، Na_2HPO_4، نمک NaCl، سیستئین 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 B (CN804)

۶- ایجاد شرایط بی هوازی: در مراحل آماده سازی سوش، از دستگاه آنوکسومات کمپانی Mart هلند واجد کپسول گاز حاوی،H۲ ۱۰ درصد،CO۲ ۱۰ درصد و N۲ ۸۰ درصد و جار بی هوازی مخصوص آنوکسومات، برای ایجاد شرایط بی هوازی مطلق استفاده گردید.

۷- آماده سازی سویه ها برای تلقیح: هر یک از سویه های کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ‌هایB, C, D کلستریدیوم سپتیکوم و کلستریدیوم نووآی فریزدرای شده، به طور جداگانه با استفاده از بویون مغذی از آمپول لیوفلیزه برداشت وبه لوله آزمایش حاوی محیط جگر انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در جار بی هوازی آنوکسومات در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس به ارلن ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۴۰۰ میلی لیتر محیط کشت جگر منتقل و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در جار بی هوازی آنوکسومات در ۳۷ درجه سانتی گراد 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 شیشه ای

از ظروف شیشه ای پیرکس بیست لیتری برای این منظور استفاده شد .۱۶ لیتر محیط های کشت موضوع بند ۱ به طور جداگانه به ظروف شیشه ای بیست لیتری منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی گراد استریل و pH آن روی ۷/۵ تنظیم شد .پس از نمونه گیری و انجام کنترل های استریلیتی ۸۰۰ میلی لیتر سوسپانسیون فعال در هر ظرف شیشه ای تلقیح شده و تکثیر باکتری بمدت ۲۴، ۴۸، و۷۲ ساعت (ب ترتیب بترتیب برای کلستریدیوم پرفرینجنز، کلستریدیوم سپتیکوم و کلستریدیوم نووآی) در ۳۷ درجه سانتی گراد بدون تنظیم pH در شرایط ساکن صورت پذیرفته و پس از پایان دورهٔ 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 نسبت۰/۶ درصد، فرآیند دتوکسیفیکاسیون آغاز گردید. در ادامه pH روی ۷ تنظیم شده وسوسپانسیون فرمله شده بمدت ۱۰ روز در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفته و سپس برای ۲ ماه در سردخانه ۸-۴ سانتی گراد 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 پریستالیتک جهت انتقال مواد مورد تلقیح به درون محفظه فرمانتور، استفاده شد. ۸ لیتر از محیط های کشت موضوع بند های ۲، ۳ و۴ به درون محفظه فرمانتور انتقال یافته و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی گراد استریل می گردید، 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 می شد و در پایان این دوره نمونه کشت غیر فرمله برداشت و برای سایر فعالیت ها 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 شیشه ای ۱۰

www.SID.ir

Archive of SID

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

دتوکسیفیکاسیون

برای دتوکسیفیکاسیون، بر اساس فارماکوپهٔ 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 ماندهٔ 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 ماندهٔ 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 موش‌ها، 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 مرحلهٔ میکروفیلتراسیون و مدول kD100 در مرحلهٔ 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 تیپ‌های C, B و D کلستریدیوم پرفرینجنز، کلستریدیوم سپتیکوم وکلستریدیوم 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 آلمینیوم، گروه دوم شامل واکسن پنج ظرفیتی باکترین تولید شده در فرمانتور تحقیقاتی دوازده لیتری و جذب شده روی هیدروکسید آلمینیوم و گروه سوم شامل واکسن پنج ظرفیتی توکسوئید-باکترین تولید شده در فرمانتور تحقیقاتی دوازده لیتری و جذب شده روی یاور هیدروکسید آلمینیوم بود. در تکرار های مختلف هر گروه، میزان درصد مادهٔ فعال موجود در واکسن، متغیر بود. در همه موارد از کشت فرملهٔ کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B وکلستریدیوم نووآی و از توکسوئید کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ‌های C و D وکلستریدیم سپتیکوم استفاده گردید. در واکسن اولترافیلترشده از توکسوئید و کشت فرمله استفاده گردید. برای انتخاب بهترین واکسن، همهٔ 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 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 ml ۲ به هر یک از ۲ سر خوکچه هندی ۳۰۰ تا ۴۰۰ گرمی و ml ۰/۵ 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 اشتهائی، 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 فارماکوپهٔ 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 mg/ml ۰/ ۳۳، توکسین بتا mg/ml ۰/۴، آنتی توکسین استاندارد اپسیلون (IU/ml ۱) 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 مجددا 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 لولهٔ آزمایش در هر لوله ۰/۴ میلی لیتر توکسین و به ترتیب ml ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ آنتی توکسین استانداردِ افزوده و حجم مخلوط در هر لوله با سرم فیزیولوژی به ml ۲ رسید (این ۵ محلول به نام تست توکسین شناخته می شوند). ۵ لولهٔ دیگر نیز با شرائط 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 ml ۰/۵ تزریق شد و حیوانات ۷۲ ساعت تحت نظر قرار گرفتند.

۶- آزمون بی ضرری(safety): از هر مورد ml ۵ 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 اشتهائی، عدم تعادل در هنگام حرکت، خواب آلودگی و تب به مدت دو هفته ارزیابی شد.

نتایج

در مرحلهٔ آماده سازی سوش، تمامی آزمون های کنترل استریلیتی موفقیت آمیز بود و این نتایج در مشاهدات میکروسکوپی نیز تائید شد. پس از انجام فرآیند دتوکسیفیکاسیون، بررسی حیوانات آزمایشگاهی در آزمون عدم وجود سمیت غیرعادی(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.

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

جدول۲- واکسن پنج ظرفیتی باکترین جذب شده روی هیدروکسید آلومینیوم ۱/۵٪ تولید شده در شیشه‌های بیست لیتری بدون تنظیم pH (تکرار دوم).

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

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).

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 د رجداول ۳ و ۴ 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).

ترکیب واکسن	شکل داروئی	درصد	ماده فعال	عیار ماده فعال(IU)
کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B	باکترین	۷/۵	β	۷/۵
کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C	باکترین	۷/۵	β	۷/۵
کلستریدیوم پرفرینجنز تیپD	باکترین	۴۵	ε	۳
کلستریدیوم سپتیکوم	باکترین	۱۵	α	۲MLD/ml
کلستریدیوم نووآی	باکترین	۱۵	α	س۴/۵
هیدروکسید آلمینیوم	-	۱۰	-	-

www.SID.ir

Archive of SID

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 داروئی	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 سپتیکوم	باکترین	۱۰	α	۲ MLD/ml
کلستریدیوم نووآی	باکترین	۱۰	α	۳
هیدروکسید آلمینیوم	-	۱۰	-	-

نتایج واکسن آزمایشی گروه سوم

در گروه سوم واکسن پنج ظرفیتی توکسوئید-باکترین تولید شده در فرمانتور و جذب شده روی یاور هیدروکسید آلمینیوم، 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 آلمینیوم)، 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.

جدول۵- 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 داروئی	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 سپتیکوم	توکسوئید	۴	α	۲MLD/ml (Resiste)
کلستریدیوم نووآی	باکترین	۴	α	۲
هیدروکسید آلومینیوم	-	۱۰	-	-
سرم فیزیولوژی	-	۷۰/۶	-	-
فرم آلدهید	-	۰/۴	-	-

جدول۶- 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 داروئی	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 سپتیکوم	توکسوئید	۵	α	۳MLD/ml (Resiste)
کلستریدیوم نووآی	باکترین	۵	α	۳/۵
هیدروکسید آلومینیوم	-	۱۰	-	-
سرم فیزیولوژی	-	۶۳/۶	-	-
فرم آلدهید	-	۰/۴	-	-

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۷- 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 داروئی	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 نووآی	باکترین	۷	α	۵
هیدروکسید آلومینیوم	-	۱۰	-	-
سرم فیزیولوژی	-	۵۳/۶	-	-
فرم آلدهید	-	۰/۴	-	-

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

نوع واکسن	عیار پادتن های اپسیلون و بتا					
	قبل از تزریق		دو هفته پس از تزریق اول		دو هفته پس از تزریق دوم	
توکسوئید-باکترین	بتا	اپسیلون	بتا	اپسیلون	بتا	اپسیلون
تکرار اول	۰/۵	۰/۳	۴/۲	۱/۳	۱۴	۳
تکرار دوم	۰/۵	۰/۳	۴/۲	۲	۱۶	۴
تکرار سوم	۰/۵	۰/۳	۵	۲/۵	۱۷	۶

بحث

استفاده از واکسن بهترین راه مقابله با بیماری های کلستریدیائی است، واکسن های رایج معمولا به صورت باکترین یا توکسوئید یا توکسوئید- باکترین ساخته می شوند به این ترتیب که با افزودن فرمالدهید به سوسپانسیون فعال باکتریائی به نسبت ۶/. درصد، باکتری غیر فعال شده و توکسین به توکسوئید تبدیل می شود. توکسوئید، توکسینی است که به صورت غیر قابل برگشت دناتوره شده است، بنابراین قابلیت کشندگی خود را از دست داده ولی قابلیت ایمنی زائی خود را حفظ کرده است. واکسن های کلستریدیائی رایج معمولا 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 ویا نوترکیب در موسسات واکسن سازی دنیا تولید می شوند (۸، ۱۶، ۱۷) که به دلائل تجاری اطلاعات دقیق آنها در مقالات بین ا لمللی منتشر نمی شود، لذا در این پژوهش تلاش شد که با تکیه بر اطلاعات، دانش، تجارب گران بها و مقالات منتشر شدهٔ 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 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 کشت‌های استاندارد و کشته شدهٔ کلستریدیوم سپتیکوم، شوآی، سوردلی، نووآی و پرفرینجنز تیپ D و C همراه با یاور محلول در آب (StimugenTM) 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، آنتروتوکسمی و انتریت بکار می رود. تولید صنعتی آنتروتوکسمی 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 بره‌های نوزاد، استراک، آنتروتوکسمی گوسفند و براکسی است. همچنین واکسن باکترین قانقرایای کبد گوسفند نیز در این بخش

www.SID.ir

Archive of SID

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 وقلوه 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 هیدروکسیدآلمینیوم ترسیب گردید (۱۰).

براساس 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 مشاهدهٔ 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 مقایسهٔ سه گروه واکسن تولیدی در این پژوهش مشخص گردید که اگرچه واکسن کلستریدیائی پنج ظرفیتی باکترین کارآئی 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 آلمینیوم، قادر خواهد بود که دام را در مقابل بیماری های کلستریدیائی ایمن کند.

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 Blck disease of sheep in Iran, Comprative 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., Plehchian Langroudi R., Mossawi 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 enterotoxemia and its use as a combination vaccine with live attenuated sheep pox virus against enterotoxemia 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 adjuoant 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 Langroudi 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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.

www.SID.ir