

## پژوهش در تهیه واکسن پلی والان کلاسترییدیایی توکسوئید خالص و مقایسه آن با واکسن پلی والان باکترین

رضا پیله چیان لنگرودی\* - محسن موسوی شوشتری  
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی  
بخش تحقیق و تولید واکسنهای بیهوازی - ۴۵۷۰۰۳۸  
r.pilehchian@rvsri.com

### چکیده :

در این پژوهش سه گروه واکسن تهیه شد. گروه اول واکسن پلی والان باکترین تولید شده در شیشه و جذب شده روی ژل (آلومینیوم هیدروکسید). گروه دوم واکسن پلی والان باکترین تولید شده در فرمانتور و جذب شده روی ژل (آلومینیوم هیدروکسید). گروه سوم واکسن باکترین و توکسوئید پلی والان تولید شده در فرمانتور و جذب شده روی ژل (آلومینیوم هیدروکسید) بنابر این مجموعاً ۳ نوع واکسن پلی والان کلاسترییدیایی تولید شده. به این صورت که یک نوع از این واکسن ها در شیشه های ۲۰ لیتری و سه نوع دیگر در فرمانتور تحقیقاتی ۱۲ لیتری تولید گردید. کلیه آزمایش های Freedom from abnormal toxicity, safety و potency برای هر یک از ۳ نوع واکسن فوق الذکر انجام گرفت و نتایج حاکی از آن است کلیه واکسن های فوق الذکر کارائی داشته و قابل استفاده هستند ولی واکسن توکسوئید تولید شده در فرمانتور و اولترافیلتر، بهترین نتیجه را می دهد.

### مقدمه :

بیماری های ناشی از کلاسترییدیومها در اغلب دامداری های ایران وجود داشته که موجب تلفات در گوسفند و بز می گردد. برای پیشگیری بیماریهای مذکور واکسن برای هر یک به تنهایی موجب اشکالاتی برای واکسیناتورها می گردد. مصرف جداگانه واکسن های بیهوازی که به منظور پیشگیری از چندین بیماری به کار می رود مستلزم چند تزریق، رفت و آمد مکرر و صرف هزینه ای زیاد است. اگر بتوان چنین واکسنی تولید کرد که شامل چند واکسن باشد بسیار مطلوب است. بدین منظور در درجه اول باید آنتی ژن های (زهرابه ها) بسیار قوی تولید کرد که این امر با فرمانتور و ایجاد تغییرات در محیط و شرایط رشد باکتری انجام پذیر است. سپس با تغلیظ و تخلیص زهرابه ها و در نهایت با تنظیم فرمول واکسن چند گانه از نظر در صد ترکیبی هر یک از واکسن ها، واکسن چند گانه تولید میگردد. موضوع مهم این است که واکسن چند گانه مطابق استاندارد های بین المللی تولید و کنترل شود.

در این طرح سعی بر این بوده است که به روش مناسب تصفیه و رسیدن به توکسوئید خالص دست یافته و واکسن حاصله را از نظر قابلیت ایمنی زائی با واکسن پلی والان باکتری مقایسه نماییم 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 گردد، و نهایتاً بتوان با روش ساده تری از ضایعات حاصله از این بیماری جلوگیری نموده و به تولید بیشتر فرآورده های دامی خصوصاً گوشت کمک نمود.

### مواد و روشها :

- ۱- محیطهای کشت: ۱-۱- برای کلاسترییدیوم پرفرینجنز تیپ B : پپتون - NaCl - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - سیستئین هیدروکلراید - عصاره مخمر - گلوکز - T.V و DI.W : ۱-۲ - برای کلاسترییدیوم پرفرینجنز تیپ C : پپتون - NaCl - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - گلوکز - محلول T.V - DI.W : ۱-۳ - برای کلاسترییدیوم پرفرینجنز تیپ D : پپتون - NaCl - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - دکستروز - محلول DI.W. T.V : ۱-۴ - برای کلاسترییدیوم سپتیوم : پپتون - NaCl - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - سیستئین هیدروکلراید - گلوکز - DI.W. : ۱-۵ - برای کلاسترییدیوم نوآی : پپتون - NaCl - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - سیستئین هیدروکلراید - پودر جگر - DI.W.

### ۲- سوشهای باکتریایی

C.P.D ( CN 409) : C.P.B ( CN 228) : C.P.C ( CN 301) : Clostridium septicum ( CN 913)  
Clostridium Novoei type B ( CN 804)

- ۳- ظرف شیشه ای : ۱- ۳- ظروف شیشه ای پیرکس ۰۲ لیتری
- ۴- دستگاه آنوکسومات برای ایجاد شرایط بیهوازی.
- ۵- فرمانتور : فرمانتور تحقیقاتی ۱۲ لیتری ساخت سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران مجهز به همزن در کف محفظه و پمپ پرستالیتیک جهت انتقال مواد مورد تلقیح به درون محفظه فرمانتور.
- ۶- اولترا فیلتر: از سیستم اولترا فیلتراسیون مینی سارتوکون ساحت کارخانه سارتریوس ومدولها ی ۰/۲ میکرون و ۱۰۰ کیلودالتون جهت استحصال توکسوئید استفاده گردید.
- ۷- روش کشت در ظروف شیشه ای:  
الف- روش استریل : ۱۶ لیتر از هریک از محیطهای کشت موضوع بند ۱ را به ظرف شیشه ای ۰۲ لیتری منتقل کرده و در شرایط ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ °C استریل نموده و pH را به ۷/۵ میرسانیم.
- ب- آماده سازی سوش برای تلقیح : سوش های مختلف کلاسترییدیوم فریزداری شده با استفاده از بویون مغزی از آمپول برداشت شده و به لوله آزمایش حاوی محیط جگر انتقال داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در جار بی هوازی ۳۷ °C اینکوبه میگردد. پس از طی این دوره به ارلن ۰۰۵ میلی لیتری حاوی ۴۰۰ محیط جگر، پاساژ داده شده و مجدداً به

۳۷ °C اینکوبه گردیده و پس از این مدت آماده تلقیح است. کنترل استریلیتی در کلیه موارد فوق با استفاده از بویون مغذی ژلوز مغذی و مشاهده مستقیم با میکروسکوپ صورت می‌گرفت.

ج- تلقیح: در گرمخانه ۳۷ °C با استفاده از پبیت و در مجاورت شعله به هر شیشه ۲۰ لیتری حاوی ۱۶ لیتر محیط کشت استریل ۱۰٪ سوسپانسیون فعال باکتری افزوده می‌شود.

د- کشت و برداشت: کشت باکتری بمدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ °C و در شرایط ساکن بدون تنظیم pH و بدون بهم خوردن صورت پذیرفته و pH پس از طی این مدت به حدود ۶ تا ۶/۵ سقوط میکند. در این هنگام با افزودن فرم آلدهید به میزان ۶ در هزار عملیات دتوکسیفیکاسیون آغاز می‌گردد. با افزودن سود سوزآور pH روی ۷ تنظیم می‌شود نمونه گیری از کشت فعال باکتری صورت گرفته و نمونه جهت انجام آزمایش MLD استفاده می‌گردد.

ه- دتوکسیفیکاسیون: سوسپانسیون فرمله شده بمدت ۱۰ روز در گرمخانه ۳۷ °C قرار گرفته و سپس برای مدت ۲ ماه به سردخانه ۴-۸ °C منتقل می‌گردد تا دتوکسیفیکاسیون کامل شود.

۸- روش کشت در فرمانتور

الف- روش استریل: ۸ لیتر از هر یک از محیط‌های کشت موضوع بند ۱ را به درون محفظه فرمانتور انتقال داده، سپس استریل آن در داخل فرمانتور به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ °C صورت گرفته و پس از گذشت این دوره و رسیدن به ۳۷ °C، نمونه گیری صورت می‌گرفت. در هنگام استریل سرعت دوران بهم زن RPM ۵۰ بوده و در هنگام نمونه گیری بهم زن خاموش می‌شد از این نمونه جهت کنترل استریلیتی محیط کشت فرمانتور استفاده می‌شود.

ب- آماده سازی سوش برای تلقیح: سوش‌های مختلف کلسترییدیوم فریزد رای شده با استفاده از بویون مغذی از آمپول برداشت شده و به لوله آزمایش حاوی محیط جگر انتقال داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در جار بی هوازی ۳۷ °C اینکوبه می‌گردد. پس از طی این دوره به ارلن ۰۰۵ میلی لیتری حاوی ۴۰۰ محیط جگر، پاساژ داده شده و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در جار بی هوازی ۳۷ °C کشت داده شده و پس از این مدت آماده تلقیح است. کنترل استریلیتی در کلیه موارد فوق با استفاده از بویون مغذی ژلوز مغذی و مشاهده مستقیم با میکروسکوپ صورت می‌گرفت.

ج- تلقیح: با استفاده از پمپ پریستالتیک بدرون محفظه فرمانتور صورت می‌گرفت در این هنگام بهم زن خاموش نگاه داشته می‌شد.

د- کشت و برداشت: دوره کشت پس از تلقیح حداکثر ۱۲ ساعت بطول میانجامید و در ششمین ساعت و همچنین در پایان این دوره کشت غیر فرمله برداشت شده، برای سایر فعالیتها در نظر گرفته می‌شود، و فرم آلدهید به میزان ۶ در هزار افزوده می‌شود. pH در تمامی مراحل کشت ثابت نگهداری می‌شود.

ه- دتوکسیفیکاسیون سوسپانسیون برای مدت ۵ روز در داخل فرمانتور مراحل انکوباسیون و دتوکسیفیکاسیون را طی کرده پس از آن به ظروف شیشه ای ۱۰ لیتری انتقال داده شده و برای مدت ۲ ماه در سردخانه ۴-۸ °C نگهداری می‌گردد.

۹- استحصال توکسوئید به روش اولترا فیلتراسیون: ۱-۹- میکرو فیلتراسیون (مدول ۰/۲ میکرون)

۲-۹- اولترافیلتراسیون (مدول ۱۰۰ کیلو دالتون)

۱۰- فرمولاسیون واکسینا: در صدهای مختلف از تیپهای مختلف باکتری کلستریید بوم پرفرینجنز و کلستریید بوم سپتیوکوم و کلستریید بوم نووآی برای تهیه واکسن در نظر گرفته شد. در همه این واکسینا آنا کالچر کلسترییدیوم پرفرینجنز تیپ B و کلسترییدیوم نووآی و از توکسوئید کلسترییدیوم پرفرینجنز تیپهای C و D و کلسترییدیوم سپتیوکوم استفاده گردید. ولی در مورد واکسن اولترا فیلتری از توکسوئید و آناکالچر استفاده گردید.

۱۱- MLD

۱۲- آزمايش Freedom from Abnormal toxicity

۱۳- آزمايش بي ضرري (safety test)

۱۴- توان ایمنی زائی (potency)

نتایج:

نتایج در جداول ۱ تا ۷ دیده می‌شود

عیار پادتنهای اپسیلون و بتا در سرم خون گوسفندان تزریق شده با بهترین واکسن (واکسن نوع سوم تکرار اول تا سوم از مخلوط واکسن توکسوئیدی باکترین جذب شده روی ژل آلومینیوم هیدروکسید ۱،۵٪ تولید شده در فرمانتور همراه با

تنظیم pH) در جدول ۸ مشاهده می‌گردد.

بحث:

تولید فرآورده های بیولوژیک جدید و مؤثرتر در سطح کشور دارای ارزش صادراتی بوده واز ابزارهای مؤثر در درآمد ارزی کشور است. جمعیت گوسفند و بز کشور که سالانه در حدود ۱۲۰ میلیون دز واکسن های بیهوازی دریافت می‌دارد، با تجویز این واکسن مؤثر نه تنها در مقابل این بیماری ها مصون می‌گردد بلکه ایجاد این مصونیت به طور یکجا

صورت می گیرد. بنابراین می توان این واکسن چند گانه کلسترییدیائی را پس از تولید آزمایشگاهی به تولید انبوه رساند و در سطح کشور مصرف نمود. تا کنون بیماری های ناشی از باکتری های بیهوازی دامها در ایران شناسائی شده است (۱). این بیماری ها عبارتند از اسهال عفونی بره های نوزاد، استراک گوسفند های بالغ، قلوه نرمی یا آنتروتوکسمی بره و گوسفند های بالغ، براکسی گوسفند های بالغ و غانفرایای عفونی کبد گوسفند. با توجه به اینکه تزریق جداگانه واکسن برای هر یک از این بیماری ها در دامداری ها کاری مشکل و غیر عملی است بنابراین بایستی یک واکسن چند تائی موثر با استانداردهای بین المللی تهیه و توزیع گردد. در حال حاضر واکسن چند تائی بشکل آناکالچر با استفاده از فرمانتورهای بزرگ و رعایت استانداردهای بین المللی تهیه و توزیع می گردد که رضایت بخش در دامداری ها می باشد. بخش تحقیق و تولید واکسن های بیهوازی موسسه رازی واکسن سه تائی اسهال عفونی بره های نوزاد، استراک و آنتروتوکسمی گوسفند (۲) و واکسن غانفرایای کبد گوسفند را تهیه و تولید نموده است (۳). از سال ۱۳۶۸ واکسن پلی والان آنتروتوکسمی و براکسی گوسفند و واکسن شاربن علامتی گاو (۴) در فرمانتورهای بزرگ ساخت ایران، ساخت، تهیه و تولید گردیده است. برای مبارزه با این بیماری ها، اولین بار پژوهشگران موسسه ولکام انگلستان واکسن چند تائی کلسترییدیائی تهیه و به بازار عرضه نمودند (۵). سپس موسسات دیگر اروپائی و آمریکائی و واکسن های کلسترییدیائی مشابهی تولید نمودند (۶). در این طرح پژوهشی کوشش به عمل آمده است که یک واکسن چند تائی کلسترییدیائی (۵ واکسن در یک واکسن) بشکل آناکالچر توکسوئید تهیه و عیار واکسن های آزمایشی در دام های هدف بر طبق استانداردهای بین المللی ارزیابی و مقایسه گردند. واکسن های تهیه شده جداگانه بشکل آناکالچر توکسوئید به نسبت های مورد نظر مخلوط و با آلومینیوم هیدروکسید (ژل) ترسیب گردید (۷) واکسن های کلسترییدیائی آناکالچر و توکسوئید جداگانه به دام های آزمایشگاهی و گوسفند از نظر بی ضرری و موثر بودن تزریق و عیار واکسن ها طبق استانداردهای بین المللی ارزیابی و مقایسه گردیده اند. در این تحقیق مشخص گردید که عیار واکسن کلسترییدیائی چند تائی آناکالچر توکسوئید، قوی تر از واکسن آناکالچر بوده است. واکسن کلسترییدیائی چند تائی آناکالچر نیز کارائی خوبی از نظر استانداردهای بین المللی دارد (۸) با توجه باینکه وجود فرمانتورهای بزرگ ساخت ایران و با استفاده از اولترافیلتر تهیه و تولید واکسن های کلسترییدیائی توکسوئیدی را امکان پذیر نماید، تولید انبوه واکسن پلی والان کلسترییدیائی به روش توکسوئید می تواند در آینده در مبارزه با بیماری های ناشی از باکتری های بیهوازی (کلسترییدیوم ها) در دامداری های کشور نیز مفید و موثر باشد. با نتایج حاصله از این طرح پژوهشی پیشنهاد می گردد که لوازم ضروری مانند اولترافیلترهای بزرگ (cross-flow) با استفاده از فرمانتورهای بزرگ برای تولید انبوه واکسن های چند تائی تهیه و مورد استفاده قرار گیرد. واکسن چند تائی که به شکل توکسوئید و همراه با یاور آلومینیوم هیدروکسید (ژل) تولید گردیده باشد می تواند دام ها را بر ضد بیماری های فوق الذکر حمایت نماید. شایان ذکر است که علاوه بر تزریق واکسن، رعایت نکات بهداشتی توسط دامداران می تواند نقش مهمی در کاهش بیماری های ناشی از باکتری های بیهوازی در دامداری ها داشته باشد. دستورات مهم بهداشتی عبارتند از: جلوگیری از پر خوری شیر در بره ها، جلوگیری از پر خوری علوفه در هنگام تغلیف دام ها در مزارع، جلوگیری از تغلیف علوفه یخ زده در مزارع، خوراندن قرص های ضد کرم های کبد در گوسفند های جوان. تولید این واکسن در راستای افزایش سطح بهداشت دام و تولید بیشتر فرآورده ای دام پزشکی می باشد. بیماری های ناشی از باکتری های بیهوازی به طور مستقیم و غیر مستقیم نه تنها باعث مرگ و میر در جمعیت دامی کشور بخصوص گوسفند و بز می گردند بلکه باعث کاهش رشد و تولید فرآورده های دامی می گردند. پیشگیری از این بیماریها با واکسنی موثر بطوریکجا از هر جهت اقتصادی بوده و از سویی دیگر مرتبط با برنامه توسعه کشور در زمینه دام پزشکی و دامپروری می باشند.

#### مراجع

- 1) M. Ardehali, H. Darakhshan and M. Moosavi. (1984). The existence and present situation of clostridia diseases of domestic animals in Iran. Arch. Inst. Razi, 34, 35-27-32
- 2) M. Ardehali and H. Darakhshan. (1976). Production and standardization of polyvalent Clostridium perfringens vaccine in Iran. Develop. Biol. Standard. vol. 32 pp. 31-34
- 3) M. Ardehali, M. Moosawi and R. Pilehchian. (1992). Mass production of Clostridium oedematiens vaccine against Black disease of sheep. Arch. Inst. Razi, 42, 43, 85-89
- 4) Pilehchian, M. Moosawi, A. Farzan, M. Ardehali (2002). Large scale cultivation of Clostridium chauvoei (Blackleg) vaccine by fermenter. The 3<sup>rd</sup> International IRAN and RUSSIA Conference Agriculture and Natural Resources. September 18-20 (2002) pp 150-151
- 5) M. Sterne, I. Batty, H. Thomson, and J. M. Robertson. (1962). Immunization of sheep with multicomponent Clostridial vaccines. Veterinary Record 74, 909
- 6) P. D. Walker (1992). Bacterial vaccines old and new, veterinary and medical. Vaccine, Vol. 10, Issue 14, 977
- 7) T. R. Hepple (1967). Aluminium hydroxide as an adjuvant for Clostridial vaccines. Immunobiol. Standard. Vol. 6, 173-180
- 8) British Pharmacopei (Veterinary) 1985. Clostridial vaccines, Her majestys stationery office, London.

### جدول:

۱- واکسن نوع اول: واکسن پلی والان باکترین جذب شده روی آلومینیوم هیدروکسید ۱,۵٪ . تولید شده در شیشه های ۲۰ لیتری ( بن بن ) بدون تنظیم pH .

۱-۱- تکرار اول جدول-۱  
ترکیب واکسن

عیار ماده فعال (IU)	ماده فعال	درصد	شکل دارویی	ترکیب واکسن
۷/۵	$\beta$	۱۰	آناکالچر	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B
۷/۵	$\beta$	۱۰	آناکالچر	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C
۵	$\epsilon$	۴۰	آناکالچر	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D
غیر فعال	$\alpha$	۱۰	آناکالچر	کلستریدیوم سپتیکوم
۵	$\alpha$	۲۰	آناکالچر	کلستریدیوم نوآی
-	-	۱۰	-	آلومینیوم هیدروکسید (ژل)

۱-۲- تکرار دوم: جدول-۲  
ترکیب واکسن

عیار ماده فعال (IU)	ماده فعال	درصد	شکل دارویی	ترکیب واکسن
۷/۵	$\beta$	۱۰	آناکالچر	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B
۷/۵	$\beta$	۱۰	آناکالچر	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C
۶	$\epsilon$	۵۰	آناکالچر	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D
۲ MLD	$\alpha$	۲۰	آناکالچر	کلستریدیوم سپتیکوم
۴	$\alpha$	۱۰	آناکالچر	کلستریدیوم نوآی
-	-	۱۰	-	آلومینیوم هیدروکسید (ژل)

۲ - واکسن نوع دوم: واکسن پلی والان باکترین جذب شده روی ژل ( آلومینیوم هیدروکسید ) ۱,۵٪ . تولید شده در فرماتور همراه با تنظیم pH .

۲-۱- تکرار اول: جدول-۳  
ترکیب واکسن

عیار ماده فعال (IU)	ماده فعال	درصد	شکل دارویی	ترکیب واکسن
۷/۵	$\beta$	۷/۵	آناکالچر	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B
۷/۵	$\beta$	۷/۵	آناکالچر	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C
۳	$\epsilon$	۴۵	آناکالچر	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D
۲ MLD	$\alpha$	۱۵	آناکالچر	کلستریدیوم سپتیکوم
۴/۵	$\alpha$	۱۵	آناکالچر	کلستریدیوم نوآی
-	-	۱۰	-	آلومینیوم هیدروکسید (ژل)

۲-۲- تکرار دوم: جدول-۴  
ترکیب واکسن

عیار ماده فعال (IU)	ماده فعال	درصد	شکل دارویی	ترکیب واکسن
۱۰	$\beta$	۱۰	آناکالچر	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B
۱۰	$\beta$	۱۰	آناکالچر	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C
۵	$\epsilon$	۵۰	آناکالچر	کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D
۲ MLD	$\alpha$	۱۰	آناکالچر	کلستریدیوم سپتیکوم
۳	$\alpha$	۱۰	آناکالچر	کلستریدیوم نوآی
-	-	۱۰	-	آلومینیوم هیدروکسید (ژل)

۳ - واکسن نوع سوم: واکسن پلی والان آنا کالچر و توکسوئیدی جذب شده روی ژل ( آلومینیوم هیدروکسید ) ۱,۵٪ . تولید شده در فرماتور همراه با تنظیم pH و تغلیظ و تخلیص شده به وسیله سیستم اولترافیلتراسیون .



Surf and download all data from SID.ir: [www.SID.ir](http://www.SID.ir)

Translate via STRS.ir: [www.STRS.ir](http://www.STRS.ir)

Follow our scientific posts via our Blog: [www.sid.ir/blog](http://www.sid.ir/blog)

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: [www.sid.ir/workshop](http://www.sid.ir/workshop)