مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۲، دوره ۶۸، شماره ۳، ۳۰۴-۲۹۷
Original Article
Journal of Veterinary Research. 68,3: 297-304, 2013

تولید واکسن براکسی با استفاده از محیط کشت غنی شده و فرمانتور

رضا پیله چیان لنگرودی* احمد رضا جباری
بخش تحقیق و تولید واکسن های بی هوازی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج - ایران

(دریافت مقاله: ۲۱ اسفند ماه ۱۳۹۱ ، پذیرش نهایی: ۱۸ خرداد ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینهٔ مطالعه: واکسن براکسی عبارتست ازکشت سویه مناسبی از کلستریدیوم سپتیکوم در یک محیط مایع و یا فیلترات آن کشت و یا مشتقات آن که به نحوی غیرفعال شده وسمیت آن از بین رفته ولی ایمنی زائی آن برقرار مانده باشد. **هدف:** تولید واکسن براکسی با استفاده از محیط کشت غنی شده در فرمانتور. **روش کار:** دو محیط کشت مرسوم و غنی شده برای کشت کلستریدیوم سپتیکوم سویهٔ CN913 در ظروف شیشه ای ۱۰ لیتری و در فرمانتور در نظر گرفته شد و هر محیط کشت سه نوبت در هریک از شرایط مورد بررسی قرار گرفت و مجموعاً برای ۱۲ سوسپانسیون باکتریائی به دست آمده کلیه روش های استاندارد تعیین عدم وجود سمیت غیر عادی، توان ایمنی زائی، بی ضرری و MLD انجام شد. **نتایج:** پس از مقایسه داده ها مشخص گردید که کشت باکتری کلستریدیوم سپتیکوم در محیط کشت غنی شدهٔ بکار رفته در فرمانتور بهترین نتیجه را می دهد زیرا بالاترین توان ایمنی زائی در این شرائط مشاهده شد. استاندارد های بین المللی ۲/۵IU/mL را برای توکسین آلفای کلستریدیوم سپتیکوم تعیین کرده اند ولی در این پژوهش ۴IU/mL بدست آمد. **نتیجه‌گیری نهایی:** استفاده از محیط کشت غنی شده در فرمانتور برای تولید واکسن براکسی بسیار مناسب است.

واژه‌های کلیدی: واکسن براکسی، کلستریدیوم سپتیکوم، محیط کشت غنی شده، فرمانتور

مقدمه

گونه سپتیکوم از جنس کلستریدیوم، خانواده باسیلاسه، از گروه باکتری های گرم مثبت ها گدار بی هوازی بطول ۳ تا ۵ و قطر ۰/۵μ است که بصورت استوانه کشیده یا منحنی و در کشت های کهنه بصورت باسیلی، سیگارت، دوکی و لیموئی نیز مشاهده می شود (۲،۲۵،۲۶) این باکتری دارای چهار توکسین است که عبارتند از: آلفا که یک آنزیم همولیتیک است، بتا که یک آنزیم DNase است، گاما که یک آنزیم هیالورونیداز است و دلتا که با نام سپتیکولایزین نیز شناخته می شود (۲۳).

آلفا توکسین با وزن ملکولی ۴۸ kDa (۳) همولیتیک وکشنده بوده و می تواند بدلیل ایجاد نکروز باعث مرگ بافتی گردد. آلفا توکسین دارای فعالیت همولیتیک معادل ۲x۱۰U/min/mg و LD_{50} در حدود ۱۰μg/kg وزن بدن موش است (۱۰). آلفا توکسین یک توکسین منفذ ساز و متعلق به خانوادهٔ منحصر به فرد شبه آئرولیزین های منفذ ساز است، مکان و ساختارهای ترانس ممبران این توکسین هنوز به خوبی مشخص نشده است (۱۶)، ولی به نظر می رسد که برای اولیگومریزه شدن در شرائط آزمایشگاه غشاء های مقاوم به شوینده ها را هدف قرار داده و آنها را اتولیز می کند. آلفا توکسین به صورت پروتوکسین غیرفعال ترشح شده و توسط آنزیم های پروتئولیتیک سطح سلولی همانند فورین فعال می شود (۱۱).

کلستریدیوم سپتیکوم می تواند سال های زیادی بدون فعالیت در خاک باقی بماند. این باکتری در روده انسان و لوله های تناسلی جنس ماده نیز یافت شده است. این باکتری بطور طبیعی در روده حیوانات وجود دارد و چراگاه آلوده می تواند منشاء این میکروارگانیسم باشد. شیوع بیماری در مزارعی که به تازگی خاکبرداری شده باشند، مبین این نکته است که جابجائی خاک می تواند باکتری را فعال کند. باکتری با خاک بلعیده شده و در لوله گوارش حیوان از دیواره لوله گوارش عبور کرده و به جریان خون وارد و از آن طریق در عضلات و سایر بافت ها مستقر می گردد (۱۴،۲۳).

کلستریدیوم سپتیکوم از عوامل نادر گازگانگرن آتروماتیک و انتروکولیت نکروتیک است. در اکثر موارد عفونت های کلستریدیوم سپتیکوم با بدخیمی، بویژه بدخیمی هماتولوژیک یا سرطان کولون همراه است (۲۰،۱۵،۱۳،۶). این باکتری عامل براکسی گوسفند و شاربن علامتی خوک است (۸)، واکسیناسیون جهت مقابله با بیماری کاملاً ضروری است. هم اکنون در سطح دنیا این واکسن به اشکال مختلف تولید و به بازار عرضه می گردد که برخی از آنها عبارتند از: Besorvax (محصول ماداگاسکار، واکسن توام شامل کلستریدیوم سپتیکوم و کلستریدیوم شووآی)، Barvac 8 (محصول بهرینگ، از توکسوئیدهای کلستریدیوم شووآی، سپتیکوم، همولیتیکوم، نووآی، سوردلی و پرفرینجنز تیپ های D,C تشکیل شده است)، Ultra choice 7 (محصول فایزر، حاوی کلستریدیوم نووآی، شووآی، سپتیکوم، سوردلی و پرفرینجنز تیپ های C ,D است)، *Clostridium septicum* vaccine (محصول اوندرستپورت آفریقای جنوبی، حاوی کشت فرمله شدهٔ کلستریدیوم سپتیکوم است که روی ژل آلومینیم هیدروکسید جذب شده است) و واکسن چهار ظرفیتی انتروتوکسمی (محصول موسسه رازی که در داخل کشور مصرف می گردد و حاوی سوسپانسیون های کشت فرمله شده کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ های B، C، D و کلستریدیوم سپتیکوم است) (۱).

با توجه به اینکه در دو دهه گذشته سه ظرفیت از واکسن انتروتوکسمی چهار ظرفیتی موسسه رازی، (باکتری کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ های B، C، D) در فرمانتور تولید می شد، لذا کاملاً ضروری

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۳۴۵۰۲۷۲۰-۰۲۶ نمابر: ۳۴۵۵۲۱۹۴-۰۲۶ Email: r.pilehchian@rvsri.ac.ir

بود که این پژوهش انجام شده و باکتری کلستریدیوم سپتیکوم به عنوان چهارمین ظرفیت این واکسن به رشد در فرمانتور سازش داده شود.

مواد و روش‌کار

کلیه تجربیات برای دو روش کشت در ظروف شیشه‌ای پیرکس ۱۰لیتری و کشت در فرمانتور تکرار شدند.

مواد استفاده شده: سویه واکسینال کلستریدیوم سپتیکوم (*C.septicum* CN913)، محیط کشت مرسوم و محیط کشت غنی شده، بویون مغذی، محیط کشت جگر، (liver infusion broth) براث مغذی، پیتون، نمک، عصاره جگر چرخ شده و جوشانیده گوساله، آب دیونیزه، تهیه شده از موسسه رازی.

محیط کشت شماره۱ (محیط کشت مرسوم): شامل پیتون، نمک، سیستین هیدروکلراید، آب دیونیزه تا حجم ۸ L با pH نهائی ۷/۴ و گلوکز ۵۰٪ با غلظت نهائی ۱٪ که فرآیند استریل آن جداگانه صورت گرفته و همراه با سویه واکسینال تلقیح می‌گردید.

محیط کشت شماره ۲ (محیط کشت غنی شده): شامل تریپتون، پپتون، کازئین هیدرولیزات، عصاره مخمر، عصاره گوشت، Na_2HPO_4، سیستئین هیدروکلراید، pH نهائی ۷/۴ و گلوکز ۵۰٪ با غلظت نهائی ۱٪ که فرآیند استریل آن جداگانه صورت گرفته و همراه با سویه واکسینال تلقیح می‌گردید.

ایجاد شرایط بی هوازی: در مراحل آماده سازی سویه واکسینال، از دستگاه آنوکسومات کمپانی Mart هلند، واجد کپسول گاز حاوی، ۱۰٪H2، ۱۰٪CO2 و ۸۰٪N2 و جار بی هوازی مخصوص آنوکسومات، برای ایجاد شرایط بی هوازی مطلق استفاده گردید.

آماده سازی باکتری برای تلقیح: سویه واکسینال کلستریدیوم سپتیکوم فریزدرای شده با استفاده از بویون مغذی از آمپول لیوفلیزه برداشته و به لوله آزمایش حاوی محیط جگر انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در جار بی هوازی آنوکسومات در ۳۷°C اینکوبه گردید. سپس به ارلن ۵۰۰mL حاوی ۴۰۰mL محیط کشت جگر، انتقال یافته و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در جار بی هوازی آنوکسومات در ۳۷°C اینکوبه گردید. کنترل استریلیتی در کلیه موارد فوق با استفاده از بویون مغذی، ژلوز مغذی و مشاهده مستقیم با میکروسکوپ نوری صورت گرفت.

کشت در ظروف شیشه‌ای پیرکس ۱۰ لیتری: در این مرحله از ظروف شیشه ای پیرکس ۱۰ لیتری مجهز به لوله‌های خمیده روی درب ظرف، که تبادل هوا را جهت ممانعت از ایجاد شرایط هوازی و ایجاد آلودگی به حداقل می‌رساند، استفاده شد.

روش استریل: ۸L از محیط های کشت شماره۱ و۲ به طور جداگانه به ظروف شیشه‌ای ۱۰ لیتری منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱°C استریل و pH آن روی ۷/۵ تنظیم شد.

۸۰۰ mL سوسپانسیون فعال در هر ظرف شیشه ای ۱۰ لیتری حاوی محیط کشت استریل، تلقیح شده و تکثیر باکتری بمدت ۴۸ ساعت در ۳۷°C بدون تنظیم pH و در شرایط ساکن صورت پذیرفته و پس از ۴۸ ساعت pH به حدود ۶ تا ۶/۵ سقوط می‌کرد. در این مرحله نمونه سوسپانسیون فعال باکتری جهت انجام آزمون MLD برداشت می‌گردید. سپس با افزودن فرم آلدهید به نسبت شش در هزار، فرآیند دتوکسیفیکاسیون آغاز می‌گردید. در ادامه pH روی ۷ تنظیم شده وسوسپانسیون فرمله شده بمدت ۱۰ روز در گرمخانه ۳۷°C قرار گرفته و سپس برای ۲ ماه در سردخانه ۸-۴°C قرار داده میشد.

کشت در فرمانتور: در این مرحله از فرمانتور تحقیقاتی ۱۲ لیتری ساخت ایران مجهز به همزن در کف محفظه و پمپ پریستالیتک جهت انتقال مواد مورد تلقیح به درون محفظه فرمانتور، استفاده شد.

روش استریل: ۸L از محیط های کشت شمارهٔ ۱و۲ را به درون محفظه فرمانتور انتقال یافته و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱°C استریل می‌گردید، سپس مراحل خنک کردن فرمانتور آغاز و از محیط کشت نمونه گرفته می‌شد. طی فرآیند استریل محیط کشت، سرعت همزن ۵۰ دور در دقیقه بوده و در هنگام نمونه‌گیری همزن خاموش می‌شد از این نمونه جهت کنترل استریلیتی محیط کشت فرمانتور استفاده شد.

آماده سازی سویه واکسینال برای تلقیح: مشابه روش کشت در ظروف شیشه‌ای ۱۰ لیتری انجام گردید.

کشت و برداشت: سوسپانسیون فعال با استفاده از پمپ پریستالتیک به درون محفظه فرمانتور تلقیح و در این هنگام همزن خاموش نگاه داشته می‌شد. تکثیر باکتری پس از تلقیح در یک دوره دوازده ساعته انجام می‌شد و در ششمین ساعت و همچنین در پایان این دوره نمونه کشت غیر فرمله برداشت شده و برای سایر فعالیت‌ها در نظر گرفته می‌شد. فرم آلدهید با نسبت شش در هزار به سوسپانسیون فعال افزوده شده و فرآیند دتوکسیفیکاسیون آغاز می‌گردید و پس از ۵ روز انکوباسیون و دتوکسیفیکاسیون در داخل فرمانتور، سوسپانسیون فرمله شده به ظروف شیشه‌ای ۱۰ لیتری انتقال داده شده و به مدت ۲ ماه در سردخانه ۸-۴°C نگهداری می‌شد.

هریک از محیط های کشت شماره ۱ و شماره ۲ سه نوبت در ظروف شیشه‌ای ۱۰ لیتری و سه نوبت در فرمانتور کشت داده شدند بنابراین دوازده نوبت کشت صورت گرفته و کلیه آزمون‌ها برای تمامی ۱۲ نوبت کشت، تکرار شدند.

آزمون‌های کنترلی: ۱- آزمون حداقل دز کشنده (MLD) Minimum lethal dose: توان توکسین زائی باکتری در زمان های مختلف دورهٔ کشت (کشت‌های ۶ ساعته، ۱۲ ساعته، ۲۴ ساعته و ۴۸ ساعته برای ظروف شیشه‌ای ۱۰ لیتری و کشت‌های ۶ ساعته و ۱۲ ساعته برای فرمانتور) با استفاده از رقت‌های مناسب و تزریق داخل سیاهرگی هر رقت به دو موش آزمایشگاهی ۱۸ تا ۲۲ گرمی و مشاهده مرگ موش‌ها طی ۴۸ ساعت صورت گرفت.

۲- آزمون عدم وجود سمیت غیر عادی (from Abnormal toxicity Freedom): از هر نمونه کشت باکتریایی که بالاترین میزان MLD را نشان داده بودند، ۲mL به هر یک از ۲ سر خوکچه هندی ۳۰۰ تا ۴۰۰ گرمی و ۵mL/. به هر یک از ۵ سر موش ۱۸ تا ۲۲ گرمی تزریق و واکنش های موضعی و سیستمیک حیوانات (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. براساس استاندارد فارماکوپه اروپا، ده سر خرگوش سالم ۳ تا ۶ ماهه مورد تزریق زیر پوستی ۲mL سوسپانسیون دتوکسیفیکه قرار گرفتند و ۲۱ روز بعد تزریق دوم با همان دز صورت پذیرفته و ۱۴ روز پس از تزریق دوم، حیوانات خونگیری شده و سرم خون تجمیع، و توان ایمنی زائی ارزیابی شد.

۴- آزمون بی ضرری: (safety) سوسپانسیون های به دست آمده از ۱۲ مورد از بهترین محیط کشت انتخاب شده و از هر مورد ۵mL آن به صورت زیر پوستی به هر یک از دو راس گوسفند سالم تزریق و واکنش های موضعی و عمومی به مدت دو هفته ارزیابی شد.

نتایج

نتیجه آزمون MLD: محیط های کشت شماره ۱ (مرسوم) و شماره ۲ (غنی شده) هر یک سه نوبت در ظروف شیشه ای ۱۰ لیتری و سه نوبت نیز در فرمانتور مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاصل از ۳۶ آزمون MLD برای تمامی ۱۲ نوبت کشت، مندرج در جدول ۱ و تصویر ۱ نشان می دهندکه بالاترین میزان MLD، برای ظروف شیشه ای ۱۰ لیتری در کشت غنی شدهٔ ۴۸ ساعته، و برای فرمانتور در کشت غنی شدهٔ ۱۲ ساعته بدست آمده است. آزمون عدم وجود سمیت غیر عادی بر اساس فارماکوپه اروپا انجام شد و با توجه به عدم وجود مرگ و میر در حیوانات آزمایشگاهی تحت تزریق سوسپانسیون دتوکسیفیکه شده، نتایج این آزمون در خصوص محیط های کشت مرسوم و غنی شده در جدول ۲، نشان می دهد که در همهٔ موارد فرآیند دتوکسیفیکاسیون با موفقیت کامل صورت گرفته است.

کلیه موارد سوسپانسیون کشت های غنی شدهٔ ۴۸ ساعتهٔ ظروف شیشه ای ۱۰ لیتری و سوسپانسیون کشت های غنی شدهٔ ۱۲ ساعته فرمانتور، (در مجموع ۱۲ مورد) به عنوان بهترین سوسپانسیون ها در مرحله اول، انتخاب و توان ایمنی زائی آنها ارزیابی شد. نتایج آزمون توان ایمنی زائی در جدول ۳ و تصویر ۲ مشاهده می گردد.

نتایج تزریق زیر پوستی ۵mL از هر یک از ۱۲ مورد بهترین سوسپانسیون انتخاب شده، به هر یک از دو راس گوسفند سالم (در مجموع ۲۴ راس گوسفند)، در جدول ۴ مشاهده می گردد. ارزیابی واکنش های موضعی و عمومی به مدت دو هفته، هیچگونه ضایعهٔ جلدی، موضعی یا سیستمیک را نشان نداد.

در مجموع مقایسه داده ها نشان داد که کشت باکتری کلستریدیوم سپتیکوم در فرمانتور و با استفاده از محیط کشت غنی شده در دوازدهمین ساعت دوره رشد، بهترین نتیجه را می دهد.

بحث

بررسی و تجزیه و تحلیل فرآیند رشد، نیازمند اندازه گیری کمی رشد است و از هر یک از ویژگی های توده حیاتی می توان برای اندازه گیری میزان رشد استفاده کرد. در این پژوهش از ویژگی توان توکسین زائی و توان ایمنی زائی برای اندازه‌گیری رشد باکتری استفاده شد. بررسی شرائط رشد و محتویات محیط کشت باکتری های جنس کلستریدیوم و گونهٔ سپتیکوم از دهه ۱۹۴۰ آغاز شده و تاکنون نیز ادامه دارد (۴،۵،۱۹).

در چهار دهه گذشته، سویه واکسینال کلستریدیوم سپتیکوم در موسسه رازی به منظور تولید واکسن علیه بیماری براکسی در ظروف شیشه ای کشت و تکثیر می شد، با توجه به نیازی که به افزایش میزان تولید واکسن های بی هوازی از جمله واکسن براکسی وجود داشت، بهینه سازی محیط و شرایط کشت باکتری ضروری به نظر می رسید، بدین لحاظ و با توجه به وجود تجهیزات مورد نیاز برای این کار در بخش تحقیق و تولید واکسن های بی هوازی تصمیم گرفته شد تا این باکتری به رشد در فرمانتور سازش داده شده و محیط کشت مناسب تری برای آن تعریف شود، به همین دلیل دو گروه آزمون انجام و درگروه اول کشت باکتری در ظرف شیشه‌ای ۱۰ لیتری و درگروه دوم کشت باکتری در فرمانتور مورد نظر قرار گرفت و سوسپانسیون های حاصل از این کشت ها با یکدیگر مقایسه شدند. برای اینکه این مقایسه بصورت رقمی نشان داده شود، از روش ارزیابی توان توکسین زائی در سوسپانسیون بهره گرفته شد. محیط های کشت مرسوم و غنی شده، هر کدام سه نوبت در ظرف شیشه‌ای ۱۰ لیتری و سه نوبت در فرمانتور کشت داده شده و در ساعات مختلف دوره رشد نمونه‌گیری صورت گرفته و آزمون MLD انجام شد، بدین ترتیب مجموعاً ۳۶ نمونه مورد آزمون MLD قرار گرفتند، با توجه به اینکه در محیط کشت بکار رفته برای رشد باکتری در ظرف شیشه‌ای ۱۰ لیتری، پپتون عامل اصلی تولید نیتروژن آزاد و نیتروژن پیوند شده محسوب می‌گردد، لذا خلوص پپتون تأثیر بسزائی در رشد باکتری دارد و عوامل دیگری که در فرمانتور نقش دارند، در اینجا وجود ندارند. همانگونه که در جدول ۱ و تصویر ۱ مشاهده می شود در مورد سوسپانسیون های ظروف شیشه‌ای ۱۰ لیتری بهترین نتایج در ۴۸ ساعت و در مورد فرمانتور بهترین نتایج در ۱۲ ساعت بدست آمد.

در ظروف شیشه‌ای، فرایند رشد باکتری حتی با وجود بهترین محیط کشت، به سمت عدم تعادل پیش میرود و باکتری ها طی رشد با تخمیر قند و تولید اسید استیک و اسید بوتریک و بوتانل و همچنین تولید گازهای دی اکسیدکربن و هیدروژن به نسبت تقریباً برابر، محیط را به سمت اسیدی شدن پیش می برند، حال آنکه pH مناسب برای رشد این باکتری در حدود

جدول ۱. نتایج آزمون MLD حاصل از سوسپانسیون کشت سویه واکسینال کلستریدیوم سپتیکوم در محیط‌های کشت مرسوم و غنی شده. [1] ظروف شیشه‌ای ۱۰لیتری. [*] این سوسپانسیون‌ها برای انجام سایر آزمون‌ها استفاده شدند.

MLD/mL		تکرار اول				تکرار دوم				تکرار سوم			
سوسپانسیون حاصل از محیط کشت		کشت ۶ ساعته	کشت ۱۲ ساعته	کشت ۲۴ ساعته	کشت ۴۸ ساعته	کشت ۶ ساعته	کشت ۱۲ ساعته	کشت ۲۴ ساعته	کشت ۴۸ ساعته	کشت ۶ ساعته	کشت ۱۲ ساعته	کشت ۲۴ ساعته	کشت ۴۸ ساعته
مرسوم در	شیشه[1]	۰	۰	۱۰۰	۲۰۰[*]	۰	۰	۱۰۰	۲۰۰[*]	۰	۰	۱۰۰	۲۰۰[*]
	فرمانتور	۱۰۰	۳۰۰[*]	-	-	۱۵۰	۳۰۰[*]	-	-	۱۰۰	۳۰۰[*]	-	-
غنی شده در	شیشه[1]	۰	۵۰	۲۰۰	۲۵۰[*]	۰	۵۰	۲۰۰	۲۵۰[*]	۰	۵۰	۲۰۰	۳۰۰[*]
	فرمانتور	۱۰۰	۴۰۰[*]	-	-	۱۵۰	۴۰۰[*]	-	-	۱۰۰	۴۰۰[*]	-	-

جدول ۲. نتایج آزمون عدم وجود سمیت غیر عادی حاصل از تزریق سوسپانسیون‌های دتوکسیفیکه شده سویه واکسینال کلستریدیوم سپتیکوم بدست آمده از محیط‌های کشت مرسوم و غنی شده. [1] [1] محیط کشت‌هائی که در جدول ۱ با * مشخص شده‌اند. [2] ظروف شیشه ای ۱۰ لیتری. [*] بروز هرگونه عوارض و مرگ در خوکچه‌ها تا ۱۰ روز پس از تزریق مورد بررسی و کنترل قرار گرفت. [**] بروز هرگونه عوارض و مرگ در موش‌ها تا ۵ روز پس از تزریق مورد بررسی و کنترل قرار گرفت.

عدم وجود سمیت غیر عادی		تکرار اول				تکرار دوم				تکرار سوم			
		۲ خوکچه برای هر مورد تزریق ۲mL		۵ موش برای هرمورد تزریق ۰/۵mL [**]		۲ خوکچه برای هر مورد تزریق ۲mL [*]		۵ موش برای هرمورد تزریق ۰/۵mL [**]		۲ خوکچه برای هر مورد تزریق ۲mL [*]		۵ موش برای هرمورد تزریق ۰/۵mL [**]	
سوسپانسیون حاصل از محیط کشت		زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده	زنده	مرده
مرسوم در	شیشه[2]	۲	۰	۵	۰	۲	۰	۵	۰	۲	۰	۵	۰
	فرمانتور	۲	۰	۵	۰	۲	۰	۵	۰	۲	۰	۵	۰
غنی شده در	شیشه[2]	۲	۰	۵	۰	۲	۰	۵	۰	۲	۰	۵	۰
	فرمانتور	۲	۰	۵	۰	۲	۰	۵	۰	۲	۰	۵	۰

جدول ۳. نتایج آزمون توان ایمنی زائی حاصل از سوسپانسیون دتوکسیفیکه شده کشت باکتری کلستریدیوم سپتیکوم در محیط‌های کشت مرسوم و غنی شده. [1] [1] محیط‌های کشتی که در جدول ۱ با * مشخص شده‌اند. [2] ظروف شیشه‌ای ۱۰ لیتری. - آزمون انجام نشد. [*] براساس ویرایش پنجم فارماکوپهٔ اروپا.

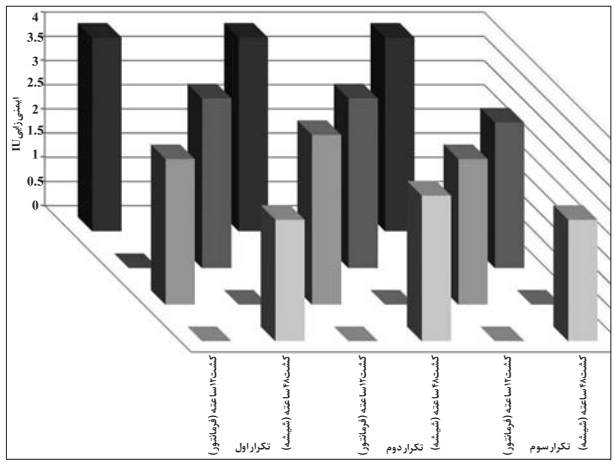
توان ایمنی زائی [*] (IU/mL)		تکرار اول		تکرار دوم		تکرار سوم	
سوسپانسیون حاصل از محیط کشت		کشت ۱۲ ساعته	کشت ۴۸ ساعته	کشت ۱۲ ساعته	کشت ۴۸ ساعته	کشت ۱۲ ساعته	کشت ۴۸ ساعته
مرسوم در	شیشه[2]	-	۲/۵۰	-	۳	-	۲/۵۰
	فرمانتور	۳	-	۳/۵۰	-	۳	-
غنی شده در	شیشه[2]	-	۳/۵۰	-	۳/۵۰	-	۳
	فرمانتور	۴	-	۴	-	۴	-

جدول ۴. نتایج آزمون بی ضرری حاصل از تزریق سوسپانسیون دتوکسیفیکه شده باکتری کلستریدیوم سپتیکوم بدست آمده از محیط‌های کشت مرسوم و غنی شده. [1] [1] محیط‌های کشتی که در جدول ۱ با * مشخص شده‌اند. [2] ظروف شیشه ای ۱۰ لیتری. - آزمون انجام نشد. [*] براساس ویرایش پنجم فارماکوپهٔ اروپا.

بی ضرری		تکرار اول		تکرار دوم		تکرار سوم	
		۲ رأس برای هر مورد [*] تزریق ۵mL		۲ رأس برای هر مورد [*] تزریق ۵mL		۲ رأس برای هر مورد [*] تزریق ۵mL	
سوسپانسیون حاصل از محیط کشت		کشت ۱۲ ساعته	کشت ۴۸ ساعته	کشت ۱۲ ساعته	کشت ۴۸ ساعته	کشت ۱۲ ساعته	کشت ۴۸ ساعته
مرسوم در	شیشه[2]	-	بدون عارضه	-	بدون عارضه	-	بدون عارضه
	فرمانتور	بدون عارضه	-	بدون عارضه	-	بدون عارضه	-
غنی شده در	شیشه[2]	-	بدون عارضه	-	بدون عارضه	-	بدون عارضه
	فرمانتور	بدون عارضه	-	بدون عارضه	-	بدون عارضه	-

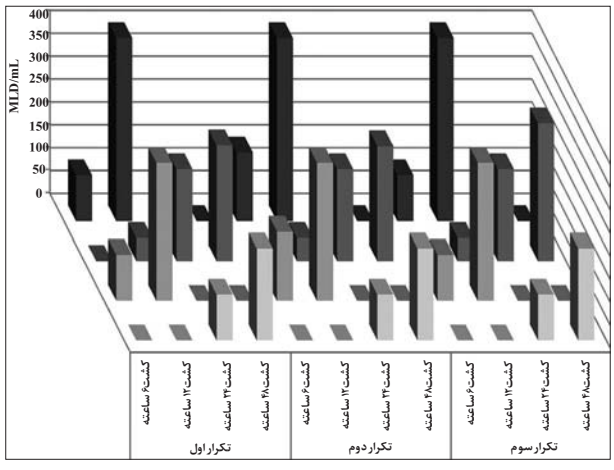
خنثی است، علاوه براین گازهایی که در حین رشد باکتری تولید می‌شود به عنوان متابولیت در محیط باقی مانده و خارج نمی‌شوند(۲۷). از طرف دیگر بدلیل اینکه محیط کشت حاوی باکتری در حال رشد در ظرف شیشه‌ای ۱۰ لیتری ساکن است، لذا تمامی نقاط آن از نظر حضور باکتری همگن نبوده و بنابراین متابولیت‌ها خارج نشده، باکتری از مواد غذائی موجود در محیط کشت بخوبی استفاده نکرده و نتیجتاً بخوبی رشد نمی‌کند و MLD بدست آمده این نکته را بخوبی نشان می‌دهد. برای اثبات این نکته تمامی موارد سوسپانسیون‌های ۴۸ ساعته ظروف شیشه‌ای ۱۰ لیتری و سوسپانسیون‌های ۱۲ ساعته فرمانتور، به عنوان بهترین شرایط و محیط کشت در مرحله اول انتخاب و برای آزمون‌های بعدی در نظر گرفته شدند.

Choman در سال ۱۹۶۹ از روش اندازه گیری MLD برای نشان توان توکسین زائی کلستریدیوم سپتیکوم استفاده کرده و مناسب ترین میزان MLD را بعد از ۲۴ ساعت بین ۵۰ تا ۱۰۰ و بعد از ۲۸ ساعت بین ۲۰۰MLD/mL-۱۰۰ گزارش کرده است (۷)، حال آنکه در پژوهش حاضر پس از ۱۲ ساعت در فرمانتور، MLD معادل ۴۰۰ MLD/mL به دست آمد. با توجه به اینکه کشت باکتریایی پس از ورود به مرحله رشد لگاریتمی به ندرت می‌تواند برای مدت طولانی در این مرحله باقی بماند و بدلیل تمام شدن مواد غذائی یا تجمع محصولات سمی حاصل از متابولیسم، سرعت رشد کاهش یافته و سرانجام متوقف خواهد شد(۲۴)، شرایط نامناسب ایجاد شده در محیط کشت در ظروف شیشه‌ای باعث می‌شود تا باکتری به



تصویر ۱. نمودار هیستوگرام سه بعدی آزمون MLD حاصل از سوسپانسیون کشت سویه واکسینال کلستریدیوم سپتیکوم در محیط های کشت مرسوم و غنی شده.

کشت مرسوم در شیشه ■ کشت مرسوم در فرمانتور ■
کشت غنی شده در شیشه ■ کشت غنی شده در فرمانتور ■



تصویر ۲. نمودار هیستو گرام سه بعدی توان ایمنی زائی حاصل از سوسپانسیون دتوکسیفیکه شده کشت سویه واکسینال کلستریدیوم سپتیکوم در محیط های کشت مرسوم و غنی شده.

کشت مرسوم در شیشه ■ کشت مرسوم در فرمانتور ■
کشت غنی شده در شیشه ■ کشت غنی شده در فرمانتور ■

حداکثر رشد و توکسین زائی خود نرسد، به همین دلیل پس از انتقال باکتری به فرمانتور و اعمال تغییر در شرایط رشد، نتیجه به روشنی بهبود یافت. برای تائید این نکته و همچنین تائید موارد MLD فوق الذکر و دست یابی به بهترین شرایط و محیط کشت، ارزیابی توان ایمنی زائی در نظر گرفته شد. Choman در ۱۹۶۹ روش چالش مستقیم (challenge Direct) را بکار برده است (۷)، در حالیکه Salvarani در سال ۲۰۱۰ در شرائط آزمایشگاهی از روش کشت سلولی استفاده کرده و با توجه به قابلیت آن برای نشان دادن مقادیر کم آلفا توکسین و آلفا آنتی توکسین، آن را موثرتر از روش استفاده از حیوانات آزمایشگاهی دانسته است (۲۱). ارزیابی توان ایمنی زائی واکسن دوظرفیتی گازگانگرن و شاربن علامتی، معمولاً به روش چالش مستقیم برای باکتری کلستریدیوم شووآی و روش تست خنثی سازی سرم برای کلستریدیوم سپتیکوم، انجام می شود. El-Helw در ۲۰۱۲ از روش الیزا برای ارزیابی ایمنی زائی این واکسن دوگانه استفاده کرد. او سه بچ واکسن را در خوکچهٔ هندی، خرگوش و گوسفند به کار گرفت و از آزمون های چالش، آگلوتیناسیون پلیت و الیزای غیر مستقیم برای کلستریدیوم شووآی و از آزمون های خنثی سازی سرم، هموالایزین و الیزای غیر مستقیم برای کلستریدیوم سپتیکوم استفاده کرد. نتایج نشان داد که آزمون الیزا در مقایسه با آزمون های آگلوتیناسیون پلیت، هموالایزین و چالش موفقیت آمیز بوده است (۸). با توجه به استانداردهای فارماکوپهٔ اروپا در پژوهش حاضر از روش تیتراسیون آنتی بادی با توکسین (آزمون توان ایمنی زائی) استفاده شد (۹)، ولی پیش از آن آزمون عدم وجود سمیت غیر عادی جهت تائید اینکه نمونه های مورد نظر مراحل دتوکسیفیکاسیون را بخوبی طی کرده باشند، انجام گردید و همانگونه که جدول ۲ نشان می دهد، نمونه های مورد نظر بخوبی دتوکسیفیکه شده بودند. جدول ۳ و تصویر ۲ نتایج آزمون توان ایمنی زائی را نشان می دهند و همانگونه که مشاهده می شود، بیشترین توان ایمنی زائی در سوسپانسیون کشت غنی شده بکار رفته در فرمانتور بدست آمد. استانداردهای بین المللی میزان ۲/۵IU/mL را برای توکسین آلفای کلستریدیوم سپتیکوم تعیین کرده اند ولی دراین پژوهش ۴IU/mL بدست آمد.

هم اکنون در ایران و در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، از روش کشت و تکثیر سویه واکسینال کلستریدیوم سپتیکوم در فرمانتور، برای تولید واکسن استفاده می شود و بدین ترتیب واکسن چهار ظرفیتی انتروتوکسمی به طور کامل با استفاده از فرمانتور تولید و به بازار عرضه می شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان تشکر صمیمانه خود را از جناب آقای دکتر محمود اردهالی عضو هیات علمی و کلیه کارشناسان بخش تحقیق و تولید واکسن های بی هوازی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی که در انجام این پژوهش همکاری نمودند ابراز می دارند.

References

1. Ardehali, M., Darakhshan, H., (1976) production and standardization of polyvalent *Clostridium perfringens* vaccine in iran. Dev Biol Standard. 32: 31-34.
2. Blood, D.C., Radostits, O.M. (1989) Veterinary Medicine. (3rd ed.). London: Bailliere Tindall. London, UK.
3. Ballard, J., Bryant, A., Stevens, D., Tweten, R.K.,

(1992) Purification and characterization of the lethal toxin (alpha-toxin) of *Clostridium septicum*. Infect Immun. 60: 784-790.

4. Ballentine, R., Tuck, G.M., Schneider, L.K., Ryan, F.J. (1944) An unidentified growth factor for a gas gangrene *Clostridium*. J Am Chem Soc. 66: 1990-91.
5. Bernheimer, A.W. (1944) Nutritional requirements and factors affecting the production of toxin of *Clostridium septicum*. J Exp Med. 80: 321-331.
6. Cohen, J., Powderly, W.G. (2010) Infectious Diseases, (3rd ed.) Mosby, Elsevier. London, UK.
7. Choman, B.R. (1969) Sequential growth of *Clostridium chauvoei*, *Clostridiums septicum* and *Clostridium Novyi* in the same medium. Am J Vet Res. 30:133-7.
8. El-Helw, H.A., El-Sergany, Elham, F., Taha, M.M., Abdella, Y.A., El-Sehemy, M.M., (2012) Comparison of ELISA with traditional methods used for evaluation of blackleg and gas gangrene vaccine. Nat Sci. 10: 137.
9. European pharmacopoeia (2008) *Clostridium septicum* Vaccine for Veterinary Use, (5th ed.) 01/2005: 0364, EDQM, Strasbourg, France.
10. Gadalla, M.S., Collee, J.G. (1968) The relationship of the neuraminidase of *Clostridium septicum* to the haemagglutinin and other soluble products of the organism. J Pathol Bacteriol. 96: 169-184.
11. Gordon, V.M., Benz, R., Fujii, K., Leppla, S.H., Tweten, R.K. (1997) *Clostridium septicum* alpha-toxin is proteolytically activated by furin. Infect Immun. 65: 4130-4.
12. Garcia, M.M., Mckay, K.A. (1969) On the Growth and survival of *Clostridium septicum* in soil. J appl Bact. 32: 362-370.
13. Katlic, M.R., Derkac, W.M., Coleman, W.S. (1981) *Clostridium septicum* infection and malignancy. Ann Surg.193: 361-364.
14. Knight, P.A., Tilleray, J.H., Queminet, J. (1990) In vitro tests for the Measurement of veterinary Clostridial toxins, toxoid and Antisera. I. Titration of *Clostridium septicum* toxins and Antitoxins in cell culture. Biologicals. 18: 181-189.
15. Mandell, G.L., Douglas, R.G., Bennett, J.E. (2010) Principles and Practice of Infectious Diseases, (7th ed.) Churchill Livingstone: Philadelphia, PA, USA.
16. Melton, J.A., Parker, M.W., Rossjohn, J., Buckley, T., Tweten, R.K. (2004) The Identification and Structure of the Membrane-spanning Domain of the *Clostridium septicum* Alpha Toxin. J Biol Chem. 279: 14315-14322.
17. Hang'ombea, M.B., Mukamotoa, M., Kohdaa, T., Sugimotob, N., Kozakia, S. (2004) Cytotoxicity of *Clostridium septicum* alpha-toxin: its oligomerization in detergent resistant membranes of mammalian cells, Microb Pathog. 37: 279-286.
18. Pilehchian Langroudi, R., Jabbari, A.R., Moosawi Shoshtari, M., (2012) Large scale production of Blackleg vaccine by fermenter and enriched culture medium in Iran. Arch Razi Inst. 67: 43-49.
19. Ryan, F.J., Schneider, L.K., Ballentine R. (1947) The Growth of *Clostridium septicum* and Its Inhibition. J Bacteriol. 53: 417-434.
20. Reiter, J.R., Plumbley, J.A., Rouse, E.A. (2000) The role of *Clostridium septicum* in paraneoplastic sepis. Arch Pathol Lab Med. 124: 353-356.
21. Salvarani, F.M., Lobato1, Z.I.P., Assis, R.A., Lima, C.G.R.D., Silva, R.O.S., Pires P.S., et al. (2010) In vitro evaluation of *Clostridium septicum* alpha toxoid. Arq Bras Med Vet Zootec. 62: 778-783.
22. Smith, L.D.S. (1975) The pathogenic anaerobic bacteria. (15th ed.) Charles C thomas, publisher, Springfield. Chicago, USA.
23. Sterne, M., Batty, I. (1975) pathogenic Clostridia. (1st ed.). Butterworth-Heinemann. London-Boston, USA.
24. Stanier, R.Y., Ligraham, J.L., Wheelis, M. L., Painter, P.R. (1995) General Microbiology (5th ed.) Macmillan Education. London, UK.
25. Stevens, D.L., Musher, D.M., Watson, D.A. (1990) Spontaneous, nontraumatic gangrene due to *Clostridium septicum*. Rev Infect Dis. 2: 286-96.
26. Wilson, L.M., Macfarlane, G.T. (1996) Cytotoxicity, adhesion and invasion of *Clostridium septicum* in cultured human epithelial cells (CACO-2, HEp-2): pathological significance of swarm cell differenti-

ation. Anaerobe. 2: 71-79.
27. Walker, P.D., Foster, W.H. (1981) Bacterial Vaccine Production. Essay in Applied Microbiology. (1st ed.). John Wiley & Sons. New York, USA.

Production of Braxy vaccine by fermenter and enriched culture media

Pilehchian Langroudi, R.*, Jabbari, A.R.

Department of Anaerobic Vaccine Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj-Iran

(Received 18 March 2013 , Accepted 29 June 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Braxy vaccine, a culture of a suitable strain or strains of *Clostridium septicum* in a fluid medium, its filtrate or derivatives, will be inactivated so that it produces its immunogenic activity without toxicity. **OBJECTIVES:** Production of *C. septicum* vaccine (Braxy vaccine) using enriched culture media in fermenter. **METHODS:** Conventional and enriched culture media were used for growing *C. septicum* (CN913) vaccinal strain in both 10 liter glass bottle and fermenter, in a triplicate manner. All twelve experiments were inspected to ensure compliance with the requirements of the vaccine international standards for minimum lethal dose (MLD), sterility, freedom of abnormal toxicity, safety and potency tests. **RESULTS:** Results showed that the culture of *C. septicum* in fermenter using enriched culture media is the best. Based on international standards, 2.5IU/mL was determined for *C. septicum* alpha toxin potency test, but in this study 4IU/mL was obtained. **CONCLUSIONS:** Using enriched culture media in fermenter is suitable for braxy vaccine production.

Key words: braxy, *Clostridium septicum*, enriched culture media, fermenter

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Results of MLD tests for *C. septicum* cultures in conventional and enriched culture medium. (1)10 liter glass vessels. (*)Adequate amounts of these suspensions were used for other tests.

Table 2. Results of freedom from abnormal toxicity tests for *C. septicum* cultures in conventional and enriched culture medium[1]. (1)In Table 1 this culture medium is marked by *. (2)10 liter glass vessels. (*)Side effects and mortality of guinea pigs were controlled up to 10 days after injection. (**) Side effects and mortality of mice were controlled up to 5 days after injection.

Table 3. Results of potency tests of *C. septicum* cultures in conventional and enriched culture medium[1]. (1)In Table 1 this culture medium is marked by *. (2)10 liter glass vessels. -Test was not done. (*)Based on European pharmacopoeia 5th edition.

Table 4. Results of safety tests of *C. septicum* detoxified suspensions obtained from conventional and enriched culture medium[1]. (1)In Table 1 this culture medium is marked by *. (2)10 liter glass vessels. -Test was not done. (*)Based on European pharmacopoeia 5th edition.

Figure 1. Histogram of MLD tests of *C. septicum* cultures in conventional and enriched culture medium.

Figure 2. Histogram of potency tests of detoxified *C. septicum* cultures in conventional and enriched culture medium.

***Corresponding author's email: r.pilehchian@rvsri.ac.ir, Tel: 026-34502720, Fax: 026-34552194**