DOI: 10.22092/vj.2017.109872.1287
شماره ۱۱۷ زمستان ۱۳۹۶
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی پایداری واکسن بروسلوز سویه (IRIBA) بعد از محلول کردن واکسن لیوفیلیزه

• **سجاد دوستداری (نویسنده مسئول)**
بخش کنترل کیفی واکسن‌های باکتریایی، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• **سید ابراهیم حسن نیا**
بخش کنترل کیفی واکسن‌های باکتریایی، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• **ابوالفضل خفري**
بخش کنترل کیفی واکسن‌های باکتریایی، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• **آناهیتا عمادی**
بخش کنترل کیفی واکسن‌های باکتریایی، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• **رامین باقری نژاد**
بخش تولید واکسن بروسلوز، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۶-۱۲-۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۰۶-۰۳-۱۳۹۶

Email: sajad.dostdari@yahoo.com

چکیده

بیماری بروسلوز یکی از مهم‌ترین بیماری مشترک بین انسان و دام محسوب می‌شود که در اغلب کشورهای منطقه مدیترانه و خاورمیانه از جمله ایران شایع می‌باشد، بهترین راه برای مقابله با این بیماری واکسیناسیون دام‌ها می‌باشد، هدف از انجام این مطالعه بررسی کیفیت واکسن IRIBA بعد از محلول کردن واکسن لیوفیلیزه می‌باشد، در این مطالعه از واکسن بروسلوز سویه IRIBA شش ویال به عنوان نمونه آماری انتخاب شد، پس از محلول‌سازی با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد در دماهای چهار، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، سپس در زمان‌های صفر، یک، چهار و ۱۲ ساعت پس از محلول‌سازی مطابق با الزامات (OIE 2016) میزان جرم زنده باکتری بررسی شد. برای اندازه‌گیری رطوبت از دستگاه کارال فیشر استفاده شد، نتایج پژوهش نشان داد که میانگین رطوبت برای سه ویال واکسن انتخاب شده به عنوان نمونه آماری برابر با ۲/۴۹ درصد بود و هم‌چنین میزان افت جرم زنده واکسن IRIBA برای سوسپانسیون نگهداری شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در یک، چهار و ۱۲ ساعت بعد از محلول‌سازی به ترتیب برابر است با ۱۲/۳۷، ۱۴/۲۹ و ۱۸/۱۳ درصد، برای سوسپانسیون نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵/۸۳، ۲۰/۰۶ و ۲۵/۰۵ درصد و برای سوسپانسیون نگهداری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۲۲/۹، ۲۶/۹۷ و ۵۵/۴۱ درصد بود. با توجه به نتایج پژوهش، واکسن IRIBA بعد از محلول‌سازی به مدت ۱۲ ساعت در دمای چهار، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد از نظر میزان جرم زنده واکسن منطبق با الزامات OIE 2016 (10-34×10^9 cfu/dose) است و پایدار می‌باشد.

کلمات کلیدی: واکسن، بروسلوز، پایداری، ایریبا

Veterinary Researches & Biological Products No 117 pp: 85-91

A study of the thermal stability of Brucellosis IRIBA strain vaccine after reconstitute

By: Dostari, S., (Corresponding Author) Dept. of Bacterial vaccines Quality Control. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Karaj, Iran. Hasannya, E., Dept. of Bacterial vaccines Quality Control. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Karaj, Iran. Khafari, A., Dept. of Bacterial vaccines Quality Control. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Karaj, Iran. Emadi, A., Dept. of Bacterial vaccines Quality Control. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Karaj, Iran. and Bagheri Nejad, R., Dept. of Brucella Vaccine Production. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2017-03-06 **Accepted: 2017-05-27**

Email: sajad.dostdari@yahoo.com

Brucellosis is one of the most important zoonotic diseases, in most countries, including Mediterranean and Middle Eastern countries in the region, including Iran prevalent, animals vaccination is the best way to prevent Brucellosis. The purpose of this study was to evaluate the quality IRIBA vaccines after reconstitution of lyophilized vials vaccine. In this experimental study after reconstitution Six vials of Brucellosis IRIBA strain vaccine, In different temperature conditions 4°C, 25°C and 37°C were put, and at zero time, one hour, four hours and 12 hours, accordance with OIE 2016 requirment live bacteria in vaccine (viable count test) was examined, Fisher was used For measuring the moisture content of the device Caral, The results of this study showed average moisture content for 3 vials of vaccine selected as a statistical sample is equal to 2/49 percent, and also the loss of live IRIBA vaccines for the suspension is placed at 4 ° C at one, four and 12 hours after the respectively is equal to 12.37%,14.29%,18.13%, and suspension is placed at 25 ° C, 15.83%, 20.06%, 25.05%, and suspension is placed at 37 ° C, 22.9%, 26,97% ,55.41%. According to these results, IRIBA Brucellosis vaccines can be stabled at least 12 hours after reconstitution at 4°C, 25°C and 37°C and conforming to the requirements of OIE 2016 (10-34 × 109 cfu/dose).

Key words: Vaccine, Brucellos, stability, IRIBA

مقدمه

بیماری بروسلوز یـك بیماری باکتریایی و مـشترك بـین انسان و دام است که اهمیت جهـاني دارد، عامـل این بیماری یك کوکوباسیل، غیرمتحرك گرم نمونه‌های درون سلولی است که طیف وسیعي از پـستانداران شـامل انسان، گاو، گوسـفند، بـز، خـوك، جونـدگان و پـستانداران دریائی را مبتلا می‌کند، در بیـشتر مواقـع عامـل بیماری دستگاه تولیدمثل حیوانات را مبتلا نموده و باعث کـاهش قدرت باروري در دام‌ها می‌شود (۳). این بیماری یکی از مهم‌تـرین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام محسوب شده و در اغلب کشورهای منطقـه مدیترانـه و خاورمیانـه از جملـه ایـران شـایع مـی‌باشد (۲). بیماری بروسلوز در گوسفند و بز در بسیاري از مناطق دنیا بخوبی مطالعه شده و اصول کلاسیك پیشگیری و کنتـرل آن بـر مبنـاي مراقبت از آلوده نشدن گله‌های سالم، محدودکردن میزان انتقال بیماری با شیوه‌های بهداشتی، واکسیناسـیون حیوانـات حسـاس و سرانجام استفاده از روش آزمایش و کشتار حیوانات ناقل مي‌باشد (۱۱). اهمیت اپیدمیولوژیك کانون‌های بروسلوز، تحت تاثیر گونه‌های بروسلایی است که به وسیله حیوانات هر منطقه، حمل مي‌گردد، به طوری که کانون بروسلوز گوسفند و بز، خطرناك‌ترین مخازن بیماری انسان را تشکیل می‌دهد، زیرا بیماری‌زاترین گونه‌های بروسلا ملی تنسیس، نزد این حیوانات، در چرخش و انتقال مي‌باشد (۱). خسارات اقتصادي بروسلوز عموماً به علت سقط جنین، جفـت‌ماندگی و به میزان کمتري تورم بیضه و اپیدیدیم و غدد ضمیمه جنسي و تورم مفاصل و بورس‌ها مـي‌باشـد(۷). هم‌چنـین ممکـن است گاهي به دنبال متریت حاد و در اثر جفت ماندگي حیوان تلف شود (۱۱). بیماری در انسان به تب مالت معروف بوده و از طریـق مصرف شیر خام و فرآورده‌های غیرپاستوریزه آن‌ها و یا تماس با ترشحات دام آلوده به انسان منتقل می‌شود (۸). امروزه کنترل بیماری بروسلوز بر سه اصل کشتن دام‌های آلوده، پاستوریزه کردن محصولات لبنی و واکسیناسیون استوار است، واکسیناسیون دام‌ها بر پایه تلقیح سویه‌های زنده ضعیف شده بروسلا آبورتوس IRIBA و بروسلا ملیتنسیس Rev.1 است (۱۲). واکسیناسیون در مبارزه علیه بروسلوز، نقشی اساسی دارد (۱۹). در حال حاضـر در ایـران برنامـه پیشگیری و کنتـرل بروسـلوز در گوسفند و بز، بر مبناي واکسیناسیون دام‌های جوان با واکسن دز کامل Rev.1 و واکسیناسیون

دام‌های بالغ بـا واکسن دز کاهیده Rev.1 می‌باشد و همچنین برنامـه پیشگیری و کنتـرل بروسـلوز در گاو و گوساله، بر مبناي واکسیناسیون دام‌های جوان با واکسن دز کامل IRIBA و واکسیناسیون دام‌های بالغ بـا واکسن دز کاهیده IRIBA مي‌باشد. واکسیناسیون گوسفندها از مهم‌ترین راه‌کارهای پیشگیری از این بیماری در این گونه میزباني مي‌باشد و واکسن Rev.1 از جمله بهترین و با ارزش‌ترین واکسن‌های موجود برای پیشگیری و کنترل بروسلوز گوسفند و بز می‌باشد (۴) که توسط سازمان‌های معتبر بین‌المللي از جمله WHO و OIE و FAO به رسمیت شناخته شده است (۱۸،۱۷،۱۶،۱۵). بر اساس بررسی‌های سرولوژیکی ذوقي و عبادي میزان شیوع بروسـلوز گوسـفند و بـز در کشور در اثناي سال‌های ۱۹۷۰ تا ۱۹۴۴ حدود ۱۴/۷ درصد گزارش شده است (۲۰). موثر بودن واکسن بروسلوز توسط محققین کشور و با همکاری سازمان بهداشت جهاني در شرایط اقلیمي ایران بر روی نژادهای گوسفند و بز ایراني به اثبات رسیده است، به طوری‌که از سال ۱۳۴۱ که تولید واکسن و واکسیناسیون در کشور آغاز شد، میزان شیوع بیماری از میزان ۴۵ درصد به ۱/۸ درصد تقلیل یافته است (۶).

مطالعات پایداری واکسن‌ها اهمیت قابل توجهی در اطمینان از کیفیت محصول در کلیه مراحل نگهداری و حین مصرف داشته و در نتیجه موفقیت برنامه‌های ایمن‌سازی در سرتاسر جهان دارد اگر چه مطالعاتی در زمینه بررسی میزان پایداری دمایی واکسن دیگر از جمله سرخک تولید شده با سویه C-AIK و MMR انجام شده است (۵،۱۳)، ولی در زمینه پایداری دمای واکسن بروسلوز بعد از محلول‌سازی اطلاعاتی منتشر نشده است و بیشتر تحقیقات صورت گرفته در زمینه پایداری واکسن‌های بروسلوز، به بررسی پایداری واکسن در حالت لیوفیلیز پرداخته است و اطلاعات کمی در مورد پایداری دمایی این واکسن‌ها پس از محلول کردن آن‌ها در دسترس است، با توجه به کمبود اطلاعات در مورد پایداری دمایی واکسن‌های بروسلوز و اینکه واکسن‌های بروسلوز IRIBA تک‌دزی تولید نمی‌شوند و در شریط فیلد، در بسیاری از مواقع واکسیناتور مجبور است برای تزریق واکسن از یک روستا به روستای دیگر منتقل شود و واکسن محلول شده را تزریق کند، مطالعه پایداری دمایی این فرآورده بعد از محلول کردن واکسن لازم و ضروری به نظر می‌رسد، از طرف دیگر با توجه به گستردگی کشور ایران و تنوع شرایط اقلیمی در شهرها و روستاهای مختلف، در صورت عدم رعایت زنجیره سرد، کارایی واکسن کاهش خواهد یافت لذا پایداری دمای این فرآورده در شرایط دمایی مختلف باید مورد مطالعه قرار گیرد که دماهای مختلفی که برای انجام این پژوهش در نظر گرفته شده است به همین دلیل است. بررسی دقیق میزان پایداری دمایی این واکسن، اطلاعات مفیدی را در مورد پایداری واکسن مصرفی در ایران به دست می‌دهد، هدف از انجام این مطالعه تهیه مدارکی دال بر چگونگی تغییر کیفیت واکسن بعد از محلول کردن واکسن لیوفیلیزه در شرایط دمای مختلف بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی شش ویال از واکسن IRIBA به عنوان نمونه آماری انتخاب شد، سه ویال برای بررسی رطوبت و ۳ ویال برای انجام سایر آزمایش‌ها استفاده شد، در این مطالعه تمامی آزمایش های کنترل کیفي شامل Viable germ, Purity, Dissociation (Roughness) و آزمایش‌های فیزیکوشیمیایی Appearance, Airtight ness, Moisture content, Solubility, Vacuum test انجام شد.

Dissociation test

برای انجام این آزمون از رنگ کریستال ویوله و محیط کشت بروسلا آگار استفاده شده در آزمون Viable germ استفاده شد، بعد از قرائت آزمون Viable germ، پرکنه‌های بروسلوز به وسیله رنگ کریستال ویوله برای تشخیص صاف یا خشن بودن باکتری مورد بررسی قرار گرفت، پرکنه صاف رنگ کریستال ویوله را به خود نمي‌گیرند و سفید متمایل به زرد (کرم) مي‌مانند و پراکنه‌های خشن رنگ کریستال ویوله را به خود مي‌گیرند و آبی می‌شوند. تعداد باکتری‌های که رنگ کریستال ویوله را به خود مي‌گیرند و خشن هستند باید بیشتر یا مساوی ۹۵ درصد باشند (۲۱).

Purity test

برای انجام این آزمون از محیط کشت بروسلا آگار و بلاد آگار ساخت کمپاني مرك آلمان استفاده شد، به این صورت که ۱ میلي‌لیتر PBS استریل به هر کدام از ویال‌های واکسن مورد نظر اضافه شد و بعد از ورتکس‌کردن تمام محتویات هر ویال بر روی محیط کشت بروسلا آگار و بلاد آگار به صورت چمني کشت داده شد، تمام نمونه‌ها در طي دوره مطالعه باید عاري از هر گونه آلودگی باکتریائی و قارچی باشند (۲۱).

Vacuum test

وجود خلاء با استفاده از یك سرنگ ۵ میلی‌لیتری حاوی ۵ میلی‌لیتر آب مقطر مورد بررسی قرار می‌گیرد، ویال واکسن باید دارای خلاء و مکش آب مقطر به داخل ویال باشد.

Appearance test

شکل ظاهري ویال واکسن و محتویات داخل آن به صورت چشمي مورد بررسی قرار گرفت. محتویات داخل ویال باید به صورت قرص سفید متمایل به زرد (کرم) باشد.

Solubility test

سوسپاسیون تهیه شده از واکسن به صورت چشمي مورد برسي قرار گرفت، مواد غیر محلول نباید در سوسپانسیون واکسن وجود داشته باشد

Moisture content test

برای اندازه‌گیری رطوبت از دستگاه کارال فیشر گلومتریك استفاده شد، این دستگاه رطوبت موجود در ویال واکسن را به کمك محلول کارل فیشر اندازه‌گیری می‌کند، در این روش به طور مستقیم توسط الکترود مولد تولید و پس از واکنش با آب نقطه پایانی توسط الکترود دابل – پلاتیني به طریق ولتامتری شناسایی و میزان آب فرآورده بر حسب PPM گزارش و محاسبه شد (۲۲).

Viable germ

برای انجام این آزمون از محیط کشت بروسلا آگار ساخت کمپانی

مرك آلمان استفاده شد، به این صورت که از نمونه‌های مورد نظر رقت سریالی تهیه شد و رقت‌های $۱۰^{۹}$ و $۱۰^{۸}$در محیط کشت بروسلا آگار به صورت جداگانه و چمنی در ۵ پلیت کشت داده شد و بعد از سه روز نتایج آزمون قرائت شد. میانگین تعداد باکتری موجود در هر دز واکسن باید بین (CFU/dose)$۱۰^{۹}$× ۳۴-۱۰باشد (۲۱).

در این مطالعه محلول‌سازی با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد انجام شد، سپس رقت‌سازی سریالی انجام شد، و از رقت‌های $۱۰^{۸}$ و $۱۰^{۹}$ برای شمارش تعداد جرم زنده واکسن استفاده شد، و هر یک از رقت‌ها بر روی پنج پلیت حاوی محیط کشت اختصاصی بروسلا آگار گشت داده شد، پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، لوله‌های حاوی رقت‌های $۱۰^{۸}$ و $۱۰^{۹}$ کاملاً شیک شد و سپس به سه قسمت مساوی تقسیم شد و هر قسمت در یکی از دماهای چهار، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. و در زمان‌های یک، چهار و ۱۲ ساعت بعد از محلول‌سازی، هر کدام از رقت‌های ۸-۱۰ و ۹-۱۰ مجدداً بر روی پنج پلیت حاوی محیط کشت اختصاصی بروسلا آگار گشت داده شد، پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت سه روز انکوبه شد، و بعد از سه روز نتایج آزمایش (شمارش تعداد کلنی‌ها و محاسبه آن‌ها) قرائت شد (۱۰).

نتایج

نتایج حاصل از پژوهش به کمك جدول، نمودار، دامنه تغییرات، میانه، میانگین، واریانس، هم‌بستگی و رگرسیون خطي مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفته در مطالعه حاضر از نظر تست Moisture content در رنج تعیین شده (OIE 2016) قرار داشت، میانگین مقدار رطوبت واکسن‌های لیوفیلیزه مورد نظر با استفاده از روش کارل فیشر، ۲/۴۹ درصد اندازه‌گیري شد.

با توجه به نتایج جدول یک، در طول مدت مطالعه میزان جرم واکسن نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد محدوده استاندارد ارائه شده توسط (esod/ufc) $۱۰^{۹}$ ×۴۳-۱۰ OIE 2016 قرار داشت.

با توجه به نتایج جدول دو، در طول مدت مطالعه میزان جرم واکسن نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در محدوده استاندارد ارائه شده توسط (esod/ufc) $۱۰^{۹}$ ×۴۳-۱۰ OIE 2016 قرار داشت.

جدول۱- پایداری واکسن IRIBA بعد از محلول کردن واکسن با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد و نگهداری شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد

زمان(ساعت)	مقدار استاندارد	۰	۱	۴	۱۲
میانگین جرم زنده سه ویال (cfu/dose)	$۱۰^{۹}$ × ۳۴- ۱۰ (cfu/dose)	$۱۰^{۹}$×۲۶/۰۲ (cfu/dose)	$۱۰^{۹}$ ×۲۲/۸ (cfu/dose)	$۱۰^{۹}$ × ۲۲/۳ (cfu/dose)	$۱۰^{۹}$ ×۲۱/۳ (cfu/dose)

جدول۲- پایداری واکسن IRIBA بعد از محلول کردن واکسن با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد و نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

زمان(ساعت)	مقدار استاندارد	۰	۱	۴	۱۲
میانگین جرم زنده سه ویال (cfu/dose)	$۱۰^{۹}$ × ۳۴- ۱۰ (cfu/dose)	$۱۰^{۹}$ × ۲۶/۰۲ (cfu/dose)	$۱۰^{۹}$ ×۲۱/۹ (cfu/dose)	$۱۰^{۹}$ ×۲۰/۸ (cfu/dose)	$۱۰^{۹}$ ×۱۹/۵ (cfu/dose)

جدول۳- پایداری واکسن IRIBA بعد از محلول کردن واکسن با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد و نگهداری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

زمان(ساعت)	مقدار استاندارد	۰	۱	۴	۱۲
میانگین جرم زنده سه ویال (cfu/dose)	$۱۰^{۹}$ × ۳۴- ۱۰ (cfu/dose)	$۱۰^{۹}$ × ۲۶/۰۲ (cfu/dose)	$۱۰^{۹}$×۲۰/۶ (cfu/dose)	$۱۰^{۹}$ ×۱۹ (cfu/dose)	$۱۰^{۹}$×۱۱/۶ (cfu/dose)

با توجه به نتایج جدول سه، در طول مدت مطالعه میزان جرم واکسن نگهداری شده در دمای ۷۳ درجه سانتیگراد در محدوده استاندارد ارائه شده توسط (esod/ufc) $۱۰^{۹}$ × ۴۳-۱۰ OIE 2016 قرار داشت.

با توجه به نتایج جدول چهار، دامنه تغییرات افت جرم زنده مربوط به واکسن IRIBA در طول مدت مطالعه، برای واکسن (سوسپانسیون) قرارداده شده در دمای چهار، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برابر است با (cfu/dose) $۴/۷۲\times۱۰^{۹}$، (cfu/dose) $۶/۵۲\times۱۰^{۹}$ و (cfu/dose) $۱۴/۴۲\times۱۰^{۹}$. هم‌چنین میزان افت جرم زنده این واکسن برای واکسن (سوسپانسیون) قرار داده شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در یک، چهار و ۱۲ ساعت بعد از محلول‌سازی به ترتیب برابر است با ۱۲/۳۷، ۱۴/۲۹ و ۱۸/۱۳ درصد، و هم‌بستگی بالا و معکوس (۰/۹۵ - درصد) بین این دو متغیر وجود داشت. برای واکسن (سوسپانسیون) قرار داده شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵/۸۳، ۲۰/۰۶ و ۲۵/۰۵ درصد و هم‌بستگی بالا و معکوس (۰/۷۷ درصد) بین این دو متغیر وجود داشت، و برای

جدول٤- مقایسه تغییرات جرم واکسن IRIBA بعد از محلول کردن واکسن با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد و نگهداری شده در دما و زمان های مختلف

دمای سوسپانسیون	دامنه تغییرات	میانگین	هم‌بستگی	میانه	واریانس	میزان کاهش تیتر در یک ساعت اول نسبت به زمان صفر	میزان کاهش تیتر در چهار ساعت اول نسبت به زمان صفر	میزان کاهش تیتر در ۱۲ ساعت اول نسبت به زمان صفر
سوسپانسیون نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد	$۴/۷۲\times۱۰^{۹}$ (cfu/dose)	$۲۳/۱۰\times۱۰^{۹}$ (cfu/dose)	۰/۹۵	۲۲/۰۵	۴/۱۶	۱۲/۳۷ درصد	۱۴/۲۹ درصد	۱۸/۱۳ درصد
سوسپانسیون نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد	$۶/۵۲\times۱۰^{۹}$ (cfu/dose)	$۲۲/۰۵\times۱۰^{۹}$ (cfu/dose)	۰/۷۷	۲۱/۳۵	۷/۹۴	۱۵/۸۳ درصد	۲۰/۰۶ درصد	۲۵/۰۵ درصد
سوسپانسیون نگهداری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد	$۱۴/۴۲\times۱۰^{۹}$ (cfu/dose)	$۱۹/۳\times۱۰^{۹}$ (cfu/dose)	۰/۷۵	۱۹/۸	۳۵/۴	۲۲/۹ درصد	۲۶/۹۷ درصد	۵۵/۴۱ درصد

جدول ۵- نتایج رگرسیون مربوط به میزان جرم زنده واکسن IRIBA محلول شده با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد در دماها و زمان‌های مختلف

دمای سوسپانسیون	ضریب رگرسیون چندگانه	ضریب رگرسیون تعدیل شده	خطای استاندارد	سطح معناداری	Significance
سوسپانسیون نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد	۰/۷۵۶	۰/۳۵۷	۴/۳۵	۰/۰۱	۰/۲۴۳
سوسپانسیون نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد	۰/۷۷۸	۰/۴۱۰	۴/۱۷	۰/۰۱	۰/۲۲۱
سوسپانسیون نگهداری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد	۰/۹۵۱	۰/۸۵۷	۲/۰۴	۰/۰۱	۰/۰۴۸

واکسن (سوسپانسیون) قرار داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۲۲/۹، ۲۶/۹۷ و ۵۵/۴۱ درصد و هم‌بستگی بالا و معکوس (۰/۷۵ - درصد) بین این دو متغیر وجود داشت.

با توجه به جدول پنج، نتایج حاصل از رگرسیون بین میزان جرم زنده واکسن (محلول شده) نگهداری شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد p = ۰/۲۴۳ را نشان داد که در سطح معناداری یک درصد ارتباط معناداری بین دو متغیر مذکور وجود داشت.

با توجه به جدول پنج، نتایج حاصل از رگرسیون بین میزان جرم زنده واکسن (محلول‌شده) نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد p = ۰/۲۲۱ را نشان داد که در سطح معناداری یک درصد ارتباط معناداری بین دو متغیر مذکور وجود داشت.

با توجه به جدول پنج، نتایج حاصل از رگرسیون بین میزان جرم زنده واکسن (محلول شده) نگهداری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد p =۰/۰۴۸ را نشان داد که در سطح معناداری یک درصد ارتباط معناداری بین دو متغیر مذکور وجود داشت.

نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفته در مطالعه حاضر از نظر تست Dissociation در رنج تعیین شده (OIE 2016) قرار داشت و تمامی پرکنه‌های باکتری بروسلوز در طول مدت مطالعه صد درصد صاف بودند.

نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفته در مطالعه حاضر از نظر تست Purity در رنج تعیین شده (OIE 2016) قرار داشت و تمامی نمونه‌ها در طول مدت مطالعه عاری از هرگونه آلودگی باکتریایی و قارچی بودند.

نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفته در مطالعه حاضر از نظر تست Vacuum در رنج تعیین شده (OIE 2016) قرار داشت و تمامی ویال‌های مورد مطالعه دارای خلاء بودند.

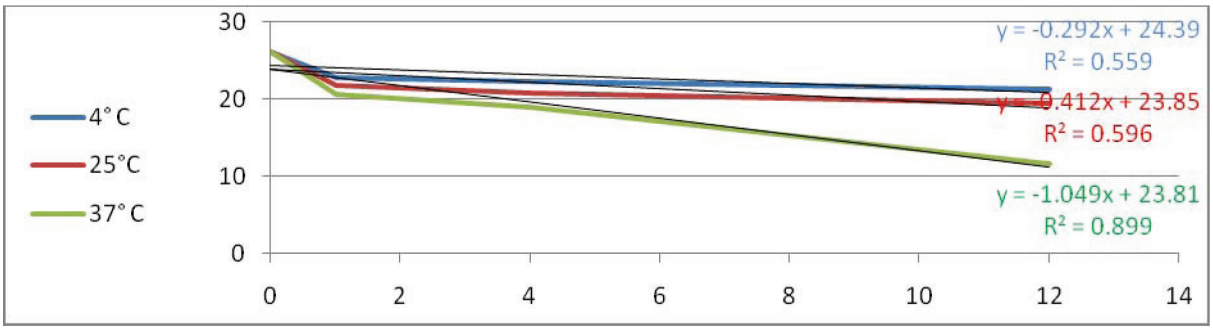
نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفته در مطالعه حاضر از نظر تست Appearance در رنج تعیین شده (OIE 2016) قرار داشت.

بحث

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که واکسن‌های IRIBA بعد از محلول‌سازی با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد و نگهداری در دمای‌های چهار، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت پایدار بود، با توجه به اینکه کمترین مقدار افت جرم زنده واکسن مربوط به واکسن (سوسپانسیون) قرار داده شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد بود، توصیه می‌شود که در فیلد برای جلوگیری از کاهش سریع جرم زنده واکسن بعد از محلول‌سازی، سوسپانسیون واکسن در کنار یخ نگهداری شود، و هم‌چنین بیشترین مقدار افت جرم زنده واکسن مربوط به واکسن (سوسپانسیون) قرار داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود، به طوری که بعد از گذشت ۱۲ ساعت ۵۵/۴۱ درصد از جرم واکسن IRIBA کاهش یافت، لذا توصیه می‌شود که واکسن در این دما نگهداری نشود. شایسته‌پور و همکاران در پژوهش خود به این نتیجه رسیده‌اند که وقتی واکسن سرخک تولید شده با سویهC-AIK محلول شده در دماهای چهار، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود کاهش تیتر واکسن به ترتیب ۰۵/، ۱/ و ۰/۲ CCID50 Log10 در ساعت بود (۱۳)، که نتایج این پژوهش با نتایج پژوهش حاضر که نشان‌دهنده افزایش افت جرم زنده واکسن با افزایش دما است همسو است. همچنین سلیمانی در پژوهش خود تحت عنوان مطالعه پایداری سویه AIK-C سرخک، سویه RS-12 اوریون و سویه Takahashi سرخجه در واکسن MMR به این نتیجه رسید که با قرار دادن واکسن به مدت هفت روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میانگین افت برابر با ۰/۳۷۵، ۰/۳۷۳ و ۰/۲۱۰ (Log۱۰) به ترتیب برای سرخک، اوریون و سرخجه از واکسن MMR حاصل شد (۱۴).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج استخراج شده از پژوهش، جهت جلوگیری از کاهش مقدار جرم زنده واکسن و کاهش کیفیت واکسیناسیون بعد از محلول کردن ویال واکسن لیوفیلیزه، بلافاصله واکسن مصرف شود هر چند واکسن IRIBA بعد از محلول‌سازی به مدت ۱۲ ساعت در دمای چهار، ۲۵ و۳۷ درجه سانتی‌گراد از نظر جرم زنده واکسن منطبق با الزامات منطبق با الزامات (cfu/dose ۱۰^۹ ×۳۴-۱۰) (OIE 2016) بود و در مدت زمان و دمای مذکور پایداری بود ولی کاهش مقدار جرم زنده واکسن در چهار درجه سانتی‌گراد به مراتب کمتر از ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد



نمودار ۱- رگرسیون خطی مربوط به واکسن IRIBA محلول شده با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد در دماها و زمان‌های مختلف

بود لذا توصیه می‌شود که همکاران واکسیناتور در سازمان دامپزشکی ویال‌ها واکسن را بعد از محلول‌سازی در کنار یخ نگهداری کنند و واکسن محلول‌شده را در همان روز تزریق کنند و از تزریق واکسن در روز بعد از محلول‌سازی خودداری نمایند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مورد حمایت قرار گرفته است. با سپاس فراوان از تمام همکاران گرامی در موسسه رازی به ویژه همکاران مدیریت کنترل کیفی و بخش تولید واکسن بروسلوز که در این پژوهش ما را یاری کردند.

منابع مورد استفاده

1. Asghari Ghadi, Mehdi. 2011.Study the effectiveness of the vaccine FdRev.1 in sheep Semnan province in 2011. 4 th National Iranian congress of Brucellosis, Trhran. Iran. 13-15 December 2011. pp 8-9.

2. Aldomy, F., Alkhawaldeh, M. and Younis, I.B., 2009. Immune responses of goats (Shami breed) to vaccination with a full, reduced and conjunctival dose of brucevac (*Brucella melitensis* Rev. 1) vaccine. *Pak. Vet. J,* 29, pp.149-153.

3. Cutler, S.J., Whatmore, A.M. and Commander, N.J., 2005. Brucellosis–new aspects of an old disease. *Journal of applied microbiology,* 98(6), pp.1270-1281.

4. Dostdari, S. Hassannia, E. khafri, A. Anahita, E. Alamiyan,S. Bagherinejad, R. Baggeri, S. 2015. Stability Study of Rev.1 Reduc dose Brucellosis Vaccine Produced by Razi Institute in Iran. 19th Iranian Veterinary Congress. Tehran. Iran. 25-27 April 2015. PP 1.

5. Hasannia, E., Soleimani, S., Alamian, S., Behrozikhah, A., Emadi, A. and Dostdari, S., 2015. Stability study of IRIBA brucellosis full-dose and reduced-dose vaccine produced by Razi Institute in Iran. *Archives of Razi Institute,* 70(1), pp.37-44

6. Jones, L.M., Entessar, F. and Ardalan, A.1964.. Comparison of living vaccine in producing immunity against natural Brucella melitensis infection in sheeps and goats in Iran. *Computational and Mathematical Organization Theory* Vol.74 ,No 1.

7. Hirsh, D.C. and Zee, Y.C., 1999. Veterinary Microbiology. USA, Black well science. Pp. 115-249

8. Khorasgani, R., M. Esmaeili, M.R. Pourkarim, A.R. Mankhian and T.Z. Salehi, 2008. Antibrucella antibodies in blood donors in Boushehr. *Iran Comparative Clinical Pathol*., 17: 267-269

9. Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E. and Gorvel, J.P., 2005. Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current opinion in microbiology,* 8(1), pp.60-66.

10. Simmons, M.M., Stack, M.J., Konold, T. and Webster, K., 2009. OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals.

11. Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. and Constable, P.D., 2007. Diseases associated with helminth parasites. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, pp.1541-1563.

12. Ragan VE. 2002. The animal and plant health inspection service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. *Vet Microbiol.;* 90(1-4): 11-8.

13. Shayestehpour, M., Shafyi, A., Taqavian, M., Esna-ashari, F., Mohammadi, A. and Shahbazi, R., 2012. A study of the thermal stability of measles vaccine produced by AIK-C strain. *Arak Medical University Journal,* 15(4), pp.26-33.

14. Soleimani, S., 2016. Stability Study of Measles AIK-C Strain, Mumps RS-12 Strain and Rubella Takahashi Strain in MMR Vaccine. *Archives of Razi Institute*, 71(1), pp.21-28.

15. Geneva, J.F.W., 1986. Expert committee on brucellosis (sixth report). Geneva: World Health Organization.

16. Joint, F.A.O., 1970. WHO Expert Committee on Brucellosis (1971). Fifth report, pp.71-72.

17. Cosivi, O. and Corbel, M.J., 1998. WHO consultation on the development of new/improved brucellosis vaccines. *Biologicals*, 26(4), pp.361-363.

18. World Health Organization, 1977. Requirements for *Brucella melitensis* strain Rev 1 vaccine (live for veterinary use). WHO Tech. Rep. Ser, 610, pp.85-97.

19. World Health Organization, 1997. Fact sheet N173. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

20. Zowghi, E. and Ebadi, A., 1985. Serological investigations on brucellosis in cattle, sheep and goats in Iran. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* (France).

21. OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (2016), 7th edn, world organization for animal health. Chapter 2.4.3.

22. The Offical compendia of standard, U.S. Pharmacopoeia, the standard of quality (2012). USB 35, NF30- Water Determination(921).