DOI: 10.22092/VJ.2021.352685.1801
شماره ۱۳۴ بهار ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

ارزیابی پایداری واکسن Rev.1 بعد از محلول‌سازی واکسن لیوفیلیزه تولید شده در موسسه رازی

• **سجاد دوستداری**
گروه میکروبشناسی و ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.
• **تقی زهرایی صالحی (نویسنده مسئول)**
گروه میکروبشناسی و ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.
• **ابوالفضل خفري**
بخش کنترل کیفی واکسن های باکتریایی، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
• **رامک یحیی رعیت**
گروه میکروبشناسی و ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.
• **سعید عالمیان**
بخش تولید واکسن بروسلوز، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۰۵-۰۹-۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: ۱۶-۱۰-۱۳۹۹
Email: tsalehi@ut.ac.ir

چکیده

بروسلوز يكي از مهمترين بيماريهاي مشترك بين انسان و دام است كه با تب در انسان و سقط جنين در دام همراه است. پیشگیری از بروسلوز در انسان، بر پایه واکسیناسیون دام‌ها استوار است. بهترین راه برای مبارزه با بیماری بروسلوز در دام، واکسیناسیون است و واکسن Rev.1 موثرترین واکسن براي پيشگيري و كنترل بروسلوز در گوسفند و بز است. از آنجا که یکی از مباحث بسیار مهم در مورد فرآورده‌های بیولوژیک اطمینان از کیفیت محصول در کلیه مراحل از جمله در زمان نگهداری و حین مصرف است، همچنین با توجه به شرایط فیلد و پروسه تزریق واکسن ارزیابی پایداری واکسن Rev.1 بعد از محلول‌سازی واکسن لیوفیلیزه ضروری است.مطالعه حاضر با هدف بررسی پایداری واکسن Rev.1 بعد از محلول‌سازی انجام شد. بدین منظور، از سه بچ متوالی واکسن Rev.1 نمونه‌برداري بصورت تصادفي انجام شد، رقت‌سازی سریالی با سرم فیزیولوژی انجام شد و جرم زنده واکسن بدست آمد. سپس واکسن محلول شده در دماهای چهار، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در زمان‌های یک، چهار، هشت، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت بعد از محلول‌سازی، میزان جرم زنده واکسن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج پژوهش نشان داد که واکسن Rev.1 بعد از محلول‌سازی ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، ۱۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد از نظر میزان جرم زنده واکسن منطبق با الزامات OIE 2019 بود، با توجه به اینکه با گذشت زمان بعد از محلول‌سازی تیتر واکسن روند کاهشی دارد، توصیه می‌شود در سریعترین زمان ممکن واکسن محلول شده مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: پایداری واکسن، بروسلوز، واکسن Rev.1

Veterinary Researches & Biological Products No 134 pp: 82-91

Evaluation of Rev.1 vaccine stability aftere solubilization lyophilized vaccine produced in Razi Institute

By: Dostdari, S., *Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Zahraei Salehi, T., (Corresponding Author) Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Khafri, A., Department of Bacterial vaccines Quality Control. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Karaj, Iran. Yahyaraeyat,, R., Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. and Alamian, S., Department of Brucella Vaccine Production. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organisation (AREEO), Karaj, Iran.*

Email: tsalehi@ut.ac.ir

Received: 2020-11-25 **Accepted: 2021-01-05**

Brucellosis is one of the important zoonotic diseases, that causes fever in human and abortion in animals. Prevention of Brucellosis in humans is based on the vaccination of animals. Vaccination is the best way to prevent brucellosis in livestock. Rev.1 vaccine is one of the most effective vaccines to prevent and control brucellosis in sheep and goat. Since one of the most important topics in biological products make ensure the quality of the product at all stages, including during storage and consumption. Also,according to the field conditions and the vaccine injection process,evaluation of Rev.1 vaccine stability after solubilization lyophilized vaccine is necessary. the present study was conducted to evaluation stability of Rev.1 vaccine after solublizathion. To do this, samples were collected randomly from three consecutive batches of Rev.1 vaccine. Serial dilution were prepared with physiological saline, and the live mass of the Rev.1 vaccine was obtained. After that dissolved vaccine was kept in different temperature conditions at 4°C, 25°C and 37°C, Afterword four, eight, 12, 18 and 24 hours after solublizing the vaccine, the live mass of the Rev.1 vaccine was analyzed. The results showed that Rev.1 vaccine after being solublized was congurous with OIE 2019 criteria when maintained 24 hours at 4°C, 18 hours at 25° C and 12 hours at 37° C. Therefore It is recommended to use the vaccine after solublizing procsee as soon as possible to prevent the reduction in the titer of Rev.1 vaccine and loose of time.

Key words: Stabibity of vaccine, Brucellosis, Rev.1 Vaccine

مقدمه

بروسلوز يكي از بيماري‌هاي مشترك بين انسان و دام است كه با تب در انسان و سقط جنين در دام همراه است (۱، ۱۱). عامل اين بيماري، يک كوكوباسيل گرم منفي داخل سلولي اختياری به نام بروسلا است (۱۰). جنس بروسلا واجد ۶ گونه كلاسيک، بروسلا ملی‌تنسيس، بروسلا سوئيس، بروسلا آبورتوس، بروسلا نئوتومه، بروسلا اوويس و بروسلا كنيس و چند گونه غير كلاسيک مي‌باشد (۱۸). چهار گونه بروسلا ملی‌تنسيس، بروسلا آبورتوس، بروسلا سوئيس و بروسلا كنيس نقش زئونوتيكي داشته و قابل انتقال به انسان مي‌باشند (۱۴). در حال حاضر تنها دو گونه بروسلا ملی‌تنسيس و بروسلا آبورتوس در ايران شايع هستند (۲۷). بروسلا ملی تنسيس عامل ايجاد تب مالت در نشخوارکنندگان كوچک است (۲۲). بروسلوز از نظر بهداشت عمومی اهميت زيادی دارد و بروز بيماری در انسان سبب خسارات اقتصادی فراوان از جمله غيرفعال شدن نيروی كار در جامعه و صرف هزينه‌های زياد جهت درمان می‌گردد. برای مقابله با اين بيماری در انسان، واكسن موثری وجود ندارد. از اين رو پيشگيری از بروسلوز در انسان، بر پايه واكسيناسيون دام‌ها استوار است و كنترل عفونت در دام‌ها می‌تواند به كاهش بروز اين بيماری در انسان منجر گردد (۵).

بهترين راه برای مبارزه با بروسلوز در دام، واكسيناسيون است. در ايران جهت واكسيناسيون دام‌ها، واكسن‌های متعددی به كار گرفته می شود، از واكسن IRIBA برای واكسيناسيون گاو و گوساله و از واكسن Rev.1 برای واكسيناسيون گوسفند و بز استفاده می‌شود. واكسن Rev.1 موثرترين واكسن براي پيشگيري و كنترل بروسلوز در گوسفند و بز است، كه توسط سازمان‌هاي معتبر بين‌المللی به رسميت شناخته شده است (۲۲،۲۳،۲۴،۲۵). توسعه و توليد واكسن Rev.1 برای نخستين بار در سال ۱۹۵۳ گزارش شد (۱۳). در توليد واكسن Rev.1از سويه ضعيف شده بروسلا ملی تنسيس

استفاده شده است (۸) که محافظت خوبی در برابر سقط جنین ناشی از بروسلا ملی تنسیس در گوسفند و بز ایجاد می‌کند (۱۵). موثر بودن واکسن Rev.1 توسط محققین کشور و با همکاري سازمان جهاني بهداشت دام در شرایط اقلیمي ایران بر روي نژادهاي گوسفند و بز ایراني به اثبات رسیده است (۱۷).

پایداری واکسن‌ها اهمیت قابل توجهی در اطمینان از کیفیت محصول و در نتیجه موفقیت برنامه‌های ایمن‌سازی در سرتاسر جهان دارد. برای پایداری واکسن Rev.1 از ترکیبات مختلف پایدار کننده استفاده می‌شود. ترکیبات کازئین ۲/۵٪، ساکاروز ۵٪ و سدیم گلوتامات۱٪ به عنوان بهترین ترکیب پایدارکننده واکسن Rev.1 توسط نابیلا و همکاران معرفی شد (۱۶). بهروزی خواه و همکاران، از سه فرمولاسیون مختلف به عنوان پایدار کننده واکسن Rev.1 استفاده کردند، فرمولاسیون اول شامل ساکاروز ۵٪ و اسکیم میلک ۷٫۵٪، فرمولاسیون دوم شامل ساکارز ۵٪، سدیم گلوتامات ۱٫۵٪ و ژلاتین ۱٫۵٪ و فرمولاسیون سوم شامل کازئین۷٪، ژلاتین ۱٫۵٪ و سدیم گلوتامات ۱٫۵٪ بود (۱).

یکی از مباحث بسیار مهم در مورد فرآورده‌های بیولوژیک اطمینان از کیفیت محصول در زمان نگهداری و حین مصرف است که نتیجه آن موفقیت برنامه‌های ایمن‌سازی را در پی خواهد داشت، بدین منظور، کیفیت واکسن Rev.1 بعد از محلول‌سازی و در حین مصرف مورد بررسی قرار گرفت. در زمینه پایداری واکسن بروسلوز سویه Rev.1 بعد از محلول‌سازی، اطلاعاتی منتشر نشده است و بیشتر تحقیقات صورت گرفته در زمینه پایداری واکسن بروسلوز، به بررسی پایداری واکسن در حالت لیوفیلیزه پرداخته است از جمله پایداری واکسن لیوفیلیزه IRIBA ۲۴ ماه گزارش شد (۱۲). پایداری واکسن لیوفیلیزه Rev.1 دز کاهیده ۱۱ ماه گزارش شد (۶). تمامي نمونه واکسن‌های لیوفیلیزه بررسي شده در زمان تحویل از موسسه رازي واجد جرم زنده در حد استاندارد تعیین شده بودند (۶). لذا اطلاعات محدودی در مورد پایداری واکسن بروسلوز پس از محلول‌سازی در دسترس است.

با توجه به کمبود اطلاعات در مورد پایداری واکسن Rev.1 بعد از محلول‌سازی و همچنین با توجه به شریط حاکم در فیلد که در بسیاری از مواقع واکسیناتور مجبور است برای تزریق واکسن از یک روستا به روستای دیگر منتقل شود و واکسن محلول شده را تلقیح نماید، مطالعه پایداری واکسن Rev.1 بعد از محلول‌سازی لازم و ضروری به نظر می‌رسد، از طرف دیگر با توجه به گستردگی و تنوع شرایط اقلیمی کشور، در صورت عدم رعایت زنجیره سرد اثربخشی واکسن کاهش خواهد یافت لذا پایداری این فرآورده در شرایط دمایی مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. هدف از انجام این مطالعه تهیه مدارکی دال بر چگونگی تغییر کیفیت واکسن بعد از محلول‌سازی واکسن لیوفیلیزه در شرایط دمای مختلف بود.

مواد و روش کار

در مطالعه حاضر سه بچ متوالی از از واکسن Rev.1 به عنوان نمونه آماری انتخاب شد، جهت اطمینان از منطبق بودن واکسن Rev.1 با استاندارد بین‌المللی، تمامی آزمایش‌های کنترل کیفي شامل Viable germ, Purity, Identity, Dissociation و آزمایش‌های فیزیکوشیمیایی Appearance, Moisture content, Solubility, Vacuum انجام شد.

Dissociation Test

در این آزمون از رنگ کریستال ویوله و واکسن Rev.1 کشت داده شده در محیط کشت بروسلا آگار ساخت شرکت BD (امریکا) استفاده شد. بدین منظور، پنج روز بعد از کشت واکسن در محیط کشت بروسلا آگار و قابل رویت بودن پرگنه‌های آن، با استفاده از رنگ کریستال ویوله پرگنه‌ها رنگ‌آمیزی شدند. پرگنه صاف بروسلا رنگ کریستال ویوله را جذب نمي‌کنند در نتیجه سفید خواهند ماند ولی پرگنه‌های خشن رنگ کریستال ویوله را جذب مي‌کنند و آبی می‌شوند. تعداد پرگنه‌های صاف واکسن Rev.1 باید بیشتر یا مساوی ۹۵ درصد باشد (۱۹).

Purity Test

برای انجام این آزمون از محیط کشت بروسلا آگار ساخت شرکت BD (امریکا) و بلاد آگار ساخت شرکت Merck (آلمان) استفاده شد، در این آزمون یک میلي‌لیتر PBS استریل به هر یک از ویال‌های واکسن Rev.1 اضافه شد و بعد از مخلوط کردن تمام محتویات 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 (۱۹).

Vacuum Test

وجود خلاء با استفاده از یك سرنگ پنج میلی‌لیتری حاوی آب مقطر مورد بررسی قرار گرفت، ویال واکسن باید دارای خلاء باشد. بعد از وارد کردن نیدل سرنگ در درپوش پلاستیکی واکسن، با توجه به به وجود خلاء در ویال محتویات داخل سرنگ باید خودبخود داخل ویال تخلیه شود که نشان‌دهنده وجود خلاء در ویال است.

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 کرم باشد.

Solubility Test

سوسپاسیون تهیه شده از واکسن به صورت چشمي مورد بررسي 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 Test

برای انجام این آزمون از محیط کشت بروسلا آگار ساخت شرکت BD استفاده شد، بدین منظور، از نمونه‌های مورد نظر رقت سریالی تهیه شد و از رقت 10^{-8} در محیط کشت بروسلا آگار به صورت چمنی در پنج پلیت کشت داده شد و بعد از پنج روز نتایج آزمون قرائت شد. میانگین تعداد باکتری موجود در هر دز واکسن باید بین $1-4\times10^{9}$ cfu/dose باشد (۱۹).

Identity Test

براي انجام اين تست از محيط كشت بروسلا آگار حاوي پني سيلين ۳ ميكروگرم در ميلی ليترو استرپتومايسين۲/۵ ميكروگرم در ميلی ليتر استفاده شد، از واكسن Rev.1 سوسپانسيون تهيه و در پليت‌هاي بروسلا آگار حاوي پني سيلين و استرپتومايسين بصورت چمني كشت داده شد، نتايج آزمايش بعد از پنج روز قرائت شد پرگنه Rev.1 در محيط كشت پني‌سيلين نبايد رشد كند و در محيط كشت حاوي استرپتومايسين بايد رشد كند (۱۹).

در این مطالعه، رقت‌سازی سریالی با سرم فیزیولوژیک انجام شد و جرم زنده واکسن بدست آمد. پس از آن واکسن محلول شده در دماهای چهار، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در زمان‌های یک، چهار، هشت، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت بعد از محلول‌سازی، میزان جرم زنده واکسن، با کشت سوسپانسیون واکسن بر روی محیط کشت بروسلا آگار و قرائت نتایج بعد از پنج روز مورد تحلیل قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از جدول، نمودار، میانه، میانگین،انحراف معیار، واریانس، هم بستگی و رگرسیون خطي استفاده شد.

نتایج

با توجه به نتایج جدول یک، میزان رطوبت سه بچ با استفاده از دستگاه کارل فیشر گلومتریك که رطوبت موجود در ویال واکسن را به کمك محلول کارل فیشر اندازه‌گیری می‌کند در محدوده استاندارد ارائه شده قرار داشت.

با توجه به نتایج جدول دو، میزان جرم واکسن نگهداری شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در مدت ۲۴ ساعت در محدوده استاندارد ($1-4\times10^{9}$ cfu/dose) قرار داشت.

با توجه به نتایج جدول سه، میزان جرم واکسن نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مدت ۱۸ ساعت در محدوده استاندارد ($1-4\times10^{9}$ cfu/dose) قرار داشت.

با توجه به نتایج جدول چهار، میزان جرم واکسن نگهداری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مدت ۱۲ ساعت در محدوده استاندارد ($1-4\times10^{9}$ cfu/dose) قرار داشت.

با توجه به نتایج جدول پنج، همبستگی بالا و معکوسی بین میزان جرم

جدول ۱- میزان رطوبت واکسن Rev.1.

میزان رطوبت	میزان استاندارد	میانگین رطوبت
میزان رطوبت بچ A	٪۱-۴	٪۱,۸۹
میزان رطوبت بچ B	٪۱-۴	٪۲,۹۹
میزان رطوبت بچ C	٪۱-۴	٪۳,۵۲

جدول ۲- پایداری واکسن Rev.1 بعد از محلول سازی واکسن و نگهداری در دمای چهار درجه سانتی گراد.

زمان (ساعت)	استاندارد	صفر	یک	چهار	هشت	۱۲	۱۸	۲۴
میانگین جرم زنده بچ A (cfu/dose)	$1-4\times10^{9}$	$2,55\times10^{9}$	$2,45\times10^{9}$	$2,4\times10^{9}$	$2,1\times10^{9}$	$1,95\times10^{9}$	$1,75\times10^{9}$	$1,3\times10^{9}$
میانگین جرم زنده بچ B (cfu/dose)	$1-4\times10^{9}$	$2,35\times10^{9}$	$2,3\times10^{9}$	$2,1\times10^{9}$	2×10^{9}	2×10^{9}	$1,6\times10^{9}$	$1,1\times10^{9}$
میانگین جرم زنده بچ C (cfu/dose)	$1-4\times10^{9}$	$2,2\times10^{9}$	$2,2\times10^{9}$	2×10^{9}	2×10^{9}	$1,7\times10^{9}$	$1,55\times10^{9}$	1×10^{9}

جدول ۳- پایداری واکسن Rev.1 بعد از محلول سازی واکسن و نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد.

زمان (ساعت)	استاندارد	صفر	یک	چهار	هشت	۱۲	۱۸	۲۴
میانگین جرم زنده بچ A (cfu/dose)	۱-۴×۱۰^۹	۲,۵۵×۱۰^۹	۲,۴×۱۰^۹	۲,۳×۱۰^۹	۲×۱۰^۹	۱,۸۵×۱۰^۹	۱,۵×۱۰^۹	۰,۹۵×۱۰^۹
میانگین جرم زنده بچ B (cfu/dose)	۱-۴×۱۰^۹	۲,۳۵×۱۰^۹	۲,۲×۱۰^۹	۲,۰۵×۱۰^۹	۱,۷۵×۱۰^۹	۱,۷×۱۰^۹	۱,۴×۱۰^۹	۰,۸×۱۰^۹
میانگین جرم زنده بچ C (cfu/dose)	۱-۴×۱۰^۹	۲,۲×۱۰^۹	۲,۱×۱۰^۹	۱,۹×۱۰^۹	۱,۸×۱۰^۹	۱,۵×۱۰^۹	۱,۳×۱۰^۹	۰,۷۵×۱۰^۹

جدول ۴- پایداری واکسن Rev.1 بعد از محلول سازی واکسن و نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد.

زمان (ساعت)	استاندارد	صفر	یک	چهار	هشت	۱۲	۱۸	۲۴
میانگین جرم زنده بچ A (cfu/dose)	۱-۴×۱۰^۹	۲,۵۵×۱۰^۹	۲,۳×۱۰^۹	۱,۹×۱۰^۹	۱,۸۵×۱۰^۹	۱,۲×۱۰^۹	۰,۹×۱۰^۹	۰,۷۵×۱۰^۹
میانگین جرم زنده بچ B (cfu/dose)	۱-۴×۱۰^۹	۲,۳۵×۱۰^۹	۲,۱×۱۰^۹	۱,۷۵×۱۰^۹	۱,۴۵×۱۰^۹	۱,۱×۱۰^۹	۰,۷۵×۱۰^۹	۰,۶×۱۰^۹
میانگین جرم زنده بچ C (cfu/dose)	۱-۴×۱۰^۹	۲,۲×۱۰^۹	۲,۰×۱۰^۹	۱,۷×۱۰^۹	۱,۴×۱۰^۹	۱,۰۵×۱۰^۹	۰,۸×۱۰^۹	۰,۷×۱۰^۹

جدول ۵ -مقایسه تغییرات جرم واکسن Rev.1 بعد از محلول سازی واکسن و نگهداری در دمای چهار درجه سانتیگراد.

شماره نمونه	میانه	میانگین	همبستگی	انحراف معیار	واریانس	کاهش تیتر ۱ ساعت	کاهش تیتر ۴ ساعت	کاهش تیتر ۸ ساعت	کاهش تیتر ۱۲ ساعت	کاهش تیتر ۱۸ ساعت	کاهش تیتر ۲۴ ساعت
A	۲,۱	۲,۰۷	-۰,۹۹	۰,۴۴۶	۰,۱۹۹	٪۳,۹۲	٪۵,۸۸	٪ ۱۷,۶۴	٪ ۲۳,۵۲	٪ ۳۱,۳۷	٪۵۶,۸۶
B	۲	۱,۹۲	-۰,۹۶	۰,۴۳۷	۰,۱۹۱	٪۲,۱۲	٪ ۱۰,۶۳	٪ ۱۴,۸۶	٪ ۱۴,۸۹	٪ ۳۱,۹۱	٪ ۵۳,۱۹
C	۲	۱,۸	-۰,۹۷	۰,۴۳	۰,۱۸۵	صفر	٪ ۹,۰۹	٪ ۹,۰۹	٪ ۲۲,۷۳	٪ ۲۹,۵۴	٪ ۵۴,۵۴

زنده واکسن و زمان بعد از محلول‌سازی وجود دارد، همچنین قرار دادن سوسپانسیون واکسن در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت باعث افت تیتر بیش از ۵۰ درصد سوسپانسیون شد.

با توجه به نتایج جدول شش، همبستگی بالا و معکوسی بین میزان جرم زنده واکسن و زمان بعد از محلول‌سازی وجود دارد، همچنین قرار دادن سوسپانسیون واکسن در دمای ۲۵درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت باعث افت تیتر بیش از ۶۰ درصد سوسپانسیون شد.

با توجه به نتایج جدول هفت، همبستگی بالا و معکوسی بین میزان جرم زنده واکسن و زمان بعد از محلول‌سازی وجود دارد، همچنین قرار دادن سوسپانسیون واکسن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت باعث افت تیتر بیش از ۷۰ درصد سوسپانسیون شد.

تمامی نمونه‌ها، از نظر آزمون Dissociation منطبق با الزامات OIE 2019بودند. تمامی پرگنه‌ها صاف بودند.

تمامی نمونه‌ها، از نظر آزمون Purity منطبق با الزامات OIE 2019 بودند. تمامی نمونه‌ها عاری از هرگونه آلودگی باکتریایی و قارچی بودند.

تمامی نمونه‌ها، از نظر آزمون Vacuum منطبق با الزامات OIE 2019بودند. تمامی نمونه‌ها دارای خلاء بودند.

تمامی نمونه‌ها، از نظر آزمون Identity منطبق با الزامات OIE 2019 بودند. تمامی نمونه‌ها در محیط کشت بروسلا آگار حاوی استروپتومایسین دارای رشد و در محیط کشت حاوی پنی سیلین فاقد رشد بودند.

تمامی نمونه‌ها، از نظر آزمون Appearance منطبق با الزامات OIE 2019 بودند. قرص لیوفیلیزه سفید متمایل به کرم در تمامی ویال‌ها وجود داشت.

تمامی نمونه‌ها، از نظر آزمون Solubility منطبق با الزامات OIE 2019 بودند. مواد غیر محلول در واکسن مشاهده نشد.تمامی تست‌های لازم برای واکسن Rev.1 که در OIE 2019 برای کنترل بچ‌های تولید واکسن Rev.1 مشخص شده است انجام شد و نتایج نشان داد که واکسن Rev.1 تمامی استانداردهای لازم از نظر OIE 2019 را دارد.

بحث و نتیجه‌گیری

بروسلوز در بسیاری از کشورهای پرورش دهنده گوسفند و بز در سراسر جهان دیده می‌شود (۴). کشورهای مختلف با توجه به شیوع این بیماری استراتژی‌های مختلفی را اتخاذ می‌کنند، استراتژی اکثر کشورهای اتحادیه اروپا برای مبارزه با بروسلوز، اجرای برنامه‌های مدیریت طولانی مدت با ترکیب واکسیناسیون، آزمایش سرولوژی و حذف دام‌های آلوده است (۳). در کشور ما استراتژی اصلی مبارزه با بروسلوز، واکسیناسیون است که سالانه بیش از ۲۵ میلیون دز واکسن بروسلوز برای واکسینه کردن دام‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. اطمینان از کیفیت واکسن حین مصرف می‌تواند تضمین کننده موفقیت مبارزه با این بیماری باشد.

انجام مطالعات پایداری در شرایط مشابه به شرایط مصرف فرآورده در بعضی از واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته پزشکی و دامپزشکی انجام شده است، از جمله شایسته پور و همکاران در پژوهش خود واکسن

جدول۶ - مقایسه تغییرات جرم واکسن Rev.1 بعد از محلول سازی واکسن و نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

شماره نمونه	میانه	میانگین	همبستگی	انحراف معیار	واریانس	کاهش تیتر ۱ ساعت	کاهش تیتر ۴ ساعت	کاهش تیتر ۸ ساعت	کاهش تیتر ۱۲ ساعت	کاهش تیتر ۱۸ ساعت	کاهش تیتر ۲۴ ساعت
A	۲	۱,۹۳	-۰,۹۹	۰,۵۶۲	۰,۳۱۶	٪۵,۸۸	٪۹,۸	٪۲۱,۵۶	٪ ۲۷,۴۵	٪۴۱,۱۷	٪۶۲,۷۴
B	۱,۷۵	۱,۷۵	-۰,۹۸	۰,۵۲۹	۰,۲۸	٪۶,۳۸	٪۱۲,۷۶	٪ ۲۵,۵۳	٪۲۷,۶۵	٪۴۰,۴۲	٪۶۵,۹۵
C	۱,۸	۱,۶۵	-۰,۹۸	۰,۵۰۷	۰,۲۵۷	٪۴,۵۴	٪۱۳,۶۳	٪۱۸,۱۸	٪ ۳۱,۸۱	٪۴۰,۹	٪۶۵,۹

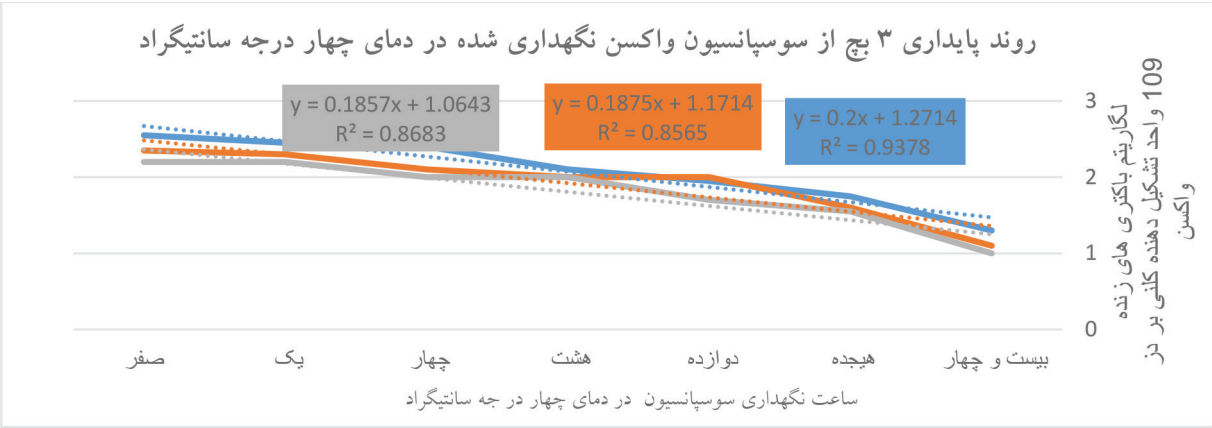
جدول ۷ -مقایسه تغییرات جرم واکسن Rev.1 بعد از محلول سازی واکسن و نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

شماره نمونه	میانه	میانگین	همبستگی	انحراف معیار	واریانس	کاهش تیتر ۱ ساعت	کاهش تیتر ۴ ساعت	کاهش تیتر ۸ ساعت	کاهش تیتر ۱۲ ساعت	کاهش تیتر ۱۸ ساعت	کاهش تیتر ۲۴ ساعت
A	۱,۸۵	۱,۶۳	-۰,۹۶	۰,۶۹۶	۰,۴۸۴	٪۹,۸	٪۲۵,۴۹	٪ ۲۷,۴۵	٪ ۵۲,۹۴	٪ ۶۴,۷	٪۷۰,۵۸
B	۱,۴۵	۱,۴۴	-۰,۹۷	۰,۶۶۵	۰,۴۴۲	٪۱۰,۶۳	٪۲۵,۵۳	٪ ۳۸,۲۹	٪ ۵۳,۱۹	٪۶۸,۰۸	٪۷۴,۴۶
C	۱,۴	۱,۴	-۰,۹۶	۰,۵۸۶	۰,۳۴۳	٪۹,۰۹	٪۲۲,۷	٪۳۶,۳۶	٪ ۵۲,۲۷	٪ ۶۳,۶۳	٪۶۸,۱۸

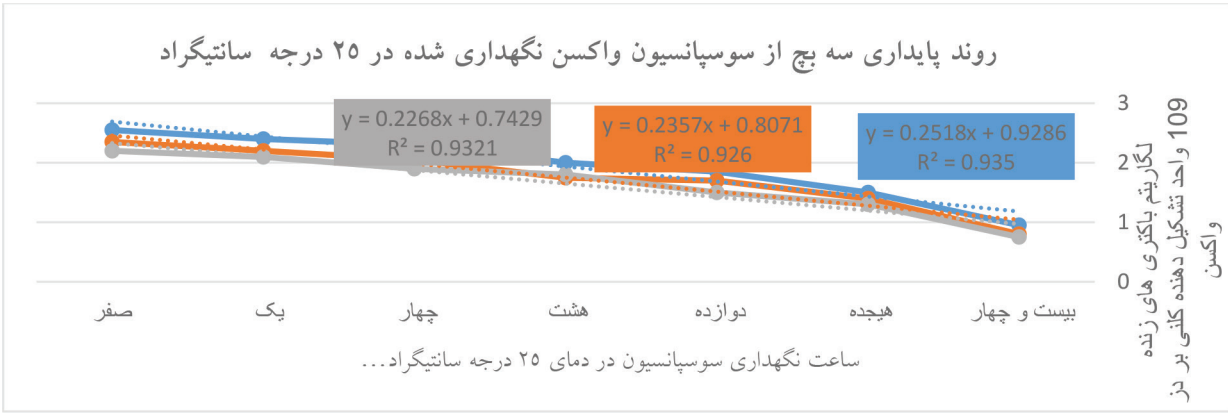
سرخک را بعد از محلول‌سازی در دماهای چهار، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادند، این امر نشان‌دهنده اهمیت بررسی پایداری واکسن‌ها در دماهای مختلف بعد از محلول‌سازی است. نتایج این پژوهش نشان داد که قرار دادن واکسن سرخک محلول شده در دماهای چهار، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد باعث کاهش تیتر واکسن به ترتیب ۰،۰۵، ۰،۱ و ۰،۲ (۱۰ Log ۵۰ CCID) خواهد شد این نتایج نشان‌دهنده افت تیتر بیشتر واکسن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد است (۲۰).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که واکسن Rev.1 بعد از محلول سازی با سرم فیزیولوژی و نگهداری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت پایدار، و الزامات OIE 2019 را در مورد میزان جرم زنده واکسن دارا بود. همچنین کمترین افت تیتر بعد از محلول‌سازی مربوط به نمونه‌های قرار داده شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد بود، دوستداری و همکاران در پژوهش خود تحت عنوان بررسی پایداری واکسن بروسلوز سویه IRIBA بعد از محلول کردن واکسن لیوفیلیزه، به این نتیجه رسیدند که واکسن IRIBA به مدت ۱۲ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد پایدار است و کمترین میزان افت تیتر واکسن بعد از محلول‌سازی، مربوط به دمای چهار درجه سانتی‌گراد است که با یافته‌های پژوهش حاضر همسو است (۷). میانگین افت تیتر سوسپانسیون نگهداری شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در زمان ۱۲ ساعت ۲۰/۳۷ درصد بود؛ این میزان کاهش تیتر، نسبت به میزان کاهش تیتر سوسپانسیون نگهداری شده واکسن IRIBA بررسی شده توسط دوستداری و همکاران در همین دما و زمان که ۱۸/۱۳ درصد بود، ۲/۲۴ درصد بیشتر است.

سوسپانسیون نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۸ ساعت پایدار، و الزامات OIE 2019 را از نظر میزان جرم زنده واکسن دارا بود، دوستداری و همکاران در پژوهش خود به این نتیجه رسیدند که واکسن IRIBA به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد پایدار



نمودار ۱- رگرسیون خطی واکسن Rev.1 بعد از محلول سازی واکسن و نگهداری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد.



نمودار ۲- رگرسیون خطی واکسن Rev.1 بعد از محلول سازی واکسن و نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

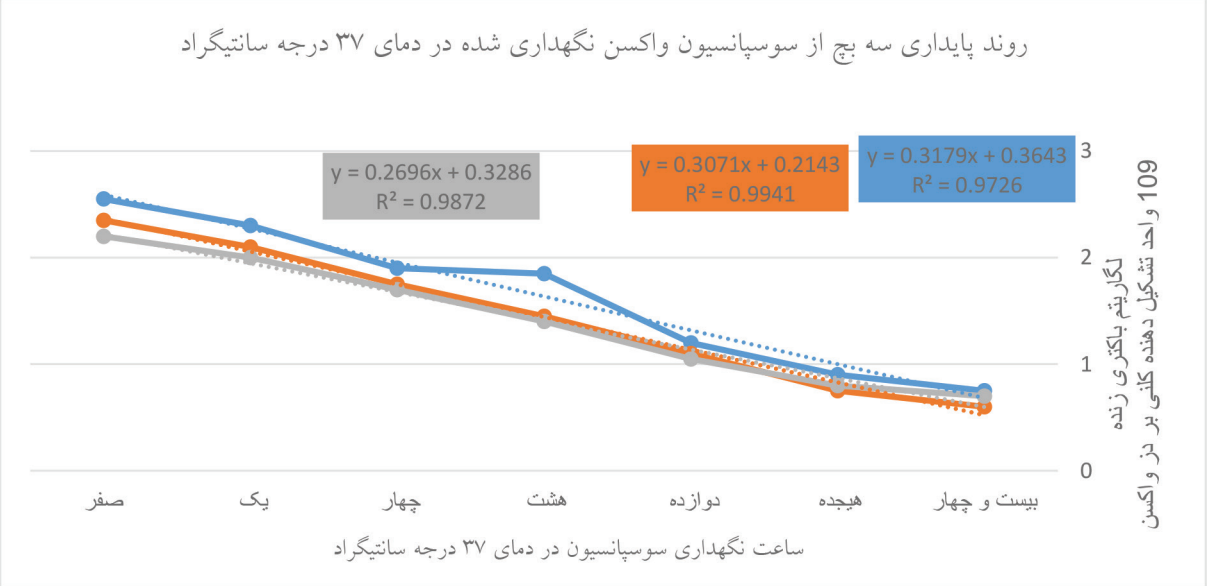
است که با یافته‌های پژوهش حاضر همسو است (۷). میانگین افت تیتر سوسپانسیون نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در زمان ۱۲ ساعت ۲۸/۹۷ درصد بود؛ این میزان کاهش تیتر، نسبت به میزان کاهش تیتر سوسپانسیون نگهداری شده واکسن IRIBA بررسی شده توسط دوستداری و همکاران در همین دما و زمان که ۲۵/۰۵ درصد بود، ۳/۹۲ درصد بیشتر است.

سوسپانسیون نگهداری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۲ ساعت پایدار، و الزامات OIE ۲۰۱۹ را از نظر میزان جرم زنده واکسن دارا بود، دوستداری و همکاران در پژوهش خود به این نتیجه رسیدند که واکسن IRIBA به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد پایدار است که با یافته‌های پژوهش حاضر همسو است (۷). میانگین افت تیتر سوسپانسیون نگهداری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در زمان ۱۲ ساعت ۵۲/۰۸ درصد بود؛ این میزان کاهش تیتر، نسبت به میزان کاهش تیتر سوسپانسیون نگهداری شده واکسن IRIBA بررسی شده توسط دوستداری و همکاران در همین دما و زمان که ۵۵/۴۱ درصد بود، ۲/۶۱ درصد کمتر است. میانگین افت تیتر سوسپانسیون نگهداری شده در دمای چهار، ۲۵، ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای سه بچ مورد مطالعه در ۲۴ ساعت بعد از محلول‌سازی به ترتیب برابر با ۵۴/۸۶، ۶۴/۸۶ و ۷۱/۰۷ درصد بود که نشان‌دهنده افت بیشتر سوسپانسیون نگهداری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد است.

میانگین افت تیتر سوسپانسیون نگهداری شده در دمای چهار، ۲۵، ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای سه بچ مورد مطالعه در یک ساعت به ترتیب برابر با ۲/۰۱، ۵/۶ و ۹/۴۸ درصد، و در چهار ساعت به ترتیب برابر با ۸/۵۳، ۱۲/۰۶و ۲۴/۵۷ درصد بود که نشان‌دهنده افت بیشتر تیتر سوسپانسیون نگهداری شده در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد نسبت به چهار درجه سانتی‌گراد است. کاهش تیتر سوسپانسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک ساعت بعد از محلول سازی ۹/۴۸ درصد و در چهار ساعت بعد از محلول‌سازی ۲۴/۵۷ درصد قابل توجه است، لذا توصیه می‌شود که در ساعت‌های اولیه محلول‌سازی واکسن Rev.1 از قرار دادن سوسپانسیون در دمای محیط خودداری شود و جهت جلوگیری از کاهش اثربخشی واکسن حتما در دمای چهار درجه سانتی‌گراد یا در کنتر یخ قرار داده شود.

نتیجه‌نهایی

با توجه به نتایج استخراج شده از این پژوهش، جهت جلوگیری از کاهش تیتر سوسپانسیون واکسن Rev.1 و در نتیجه کاهش اثربخشی واکسیناسیون، بعد از محلول کردن واکسن Rev.1، توصیه می‌شود در سریعترین زمان ممکن وکسن محلول شده مصرف شود. هر چند واکسن Rev.1 بعد از محلول‌سازی به مدت ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، ۱۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد از نظر جرم واکسن منطبق با الزامات OIE 2019 بود، اما در دماهای که سوسپانسیون قرار داده شد روند افت تیتر با گذشت زمان مشاهده شد که این کاهش تیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حتی در ساعات اولیه قابل ملاحظه بود، لذا توصیه می‌شود که همکاران واکسیناتور در سازمان دامپزشکی ویال‌های واکسن را بعد از محلول‌سازی تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یا در کنار یخ نگهداری کنند و واکسن محلول شده را در کوتاه‌ترین زمان ممکن تلقیح



نمودار ۳- رگرسیون خطی واکسن Rev.1 بعد از محلول سازی واکسن و نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

کنند و از تلقیح واکسن در روز بعد از محلول‌سازی اکیداً خودداری نمایند.

تشکر و قدردانی

از اساتید محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، از پرسنل محترم بخش تولید واکسن بروسلوز و مدیریت کنترل کیفیت موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی که بنده را در انجام این پژوهش یاری کرده‌اند نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

منابع مورد استفاده

1- Ali Ahmadi, M., D. Saadati, M. Najimi, H. Ganjali and F. Shah Karami. 2021. Comparison of PCR and Conventional Serological Methods for Detection of Brucella spp. in Ovine and Caprine Blood Serum. *Archives of Razi Institute*. 76: 445-452

2- Behroozikhah, A.M. Alamian, S. Pourahmadi, A. Moghadampour, M. (2009). Evaluation on stability process of *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine in Iran. *Archives of Razi Institute* 64(2):87-92.

3- Blasco JM (1997) A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Mee* 283-31: 275.

4- Bosseray N (199*1*) *Brucella melitensis* Rev. 1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals* 19:355–363

5- Dostdari, S. Mahmoodi, P. Mohammadzadeh, A. Khafri, A. (2019). Evaluation of Humoral Immune Responses of Sheep Vaccinated With Razi Institute Rev.1 Brucellosis *Vaccine* in Comparison to a Spanish (CZV) Rev.1 Vaccine. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*. August;6(3):95-99.

6- Dostari, S. Hasannya,E. Khafari, A. Emadi, A. Bagheri Nejad,R. Alamyan S., Bagheri Sh (2017). Stability Study of Rev.1 Reduced dose Brucellosis Vaccine Produced by Razi Institute in Iran. *Veterinary Researches & Biological Products*. No 116 pp: 26-33.

7- Dostari, S. Hasannya,E. Khafari, A. Emadi, A. Bagheri Nejad,R. (2017). Stability study of the thermal stability of Brucellosis IRIBA strain vaccine after reconstitute. *Veterinary Researches & Biological Products*. No 117 pp: 85-91.

8- Elberg SS (1981) Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. Part II, 1968–1980. *Vet Bull* 51:67–73.

9- Fatemi, Maryam. (1390). Stability Study of Rev.1 Brucellosis Vaccine With evaluation viable germ count. Thesis submitted for Doctor of Veterinary Medicine. University of Tehran. Tehra.

10- Garrity, G. (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition. .Springer. pp.721

11- Godfroid, J., Nielsen, K. & Saegerman, C. (2010). Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. *Croatian Medical Journal* 51: 296-305.

12- Hasannia1, E., Soleimani*2, S., Alamian3, S., Behrozikhah3, A., Emadi1, A., Dostdari1, S. Stability Study of Iriba Brucellosis Full-dose and Reduceddose Vaccine Produced by Razi Institute in Iran *Archives of Razi Institute*, Vol. 70, No. 1 (2015) 37-44.

13- Instructions of Razi Vaccine and Serum Research Institute. (2015) Acquisition to technology for the production of vaccines and animals biological products. First Edition, Publications: Agricultural Research, Education and Extension Organisation. Pp 44-51.

14- Moriyon, I. Osterman, B. (2006). International committee on systematics of prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of *brucella*. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56(5): 1173-1175.

15- Munoz PM, de Miguel MJ, Grillo MJ, Marin CM, Barberan M, Blasco JM (2008) Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine* 26:2562–2569.

16- Nabila, A. Wafaa, R. Ibrahim, H.M. Shell, W.S. Hosein, H.I. (2018). The use of different stabilizers for improving integrity of the locally prepared lyophilized *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. *JOURNAL OF VETERINARY MEDICAL RESEARCH* 2018, 25 (1): 59- 67.

17- Jones, L.M., Entessar, F., and Ardalan, A. (1965). Comparison of living vaccine in producing immunity against natural *Brucella melitensis* infection in sheeps and goats in Iran. ARI_Volume 17, Issue 1, Pages 39-42.

18- Osterman, B., Moriyon, I. (2006). International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1173–1175.

19- World Organization for Animal Health (2019). Chapter, 3.1.4-Brucellosis.

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

21- United States Pharmacopoeia (2012). USB 35, NF30, Wates determination 921.

22- Verger JM (1985) *B. melitensis* infection in cattle. In: Verger JM, Plommet M (eds) *Brucella melitensis*. Martinus Nijhoff Publishers D, Leiden, pp 197–203.

23- World Health Organization, Technical report series. (1986). Joint FAO WHO expert committee on brucellosis, sixth report, WHO Technical Report Series. No, 740, Geneva.

24-World Health Organization, Technical Report Series. (1970). Joint FAO WHO expert committee on brucellosis. Fifth report.

WHO Technical Report Series. No. 464. Geneva.
25- World Health Organization. (1997). The development of new/ improved brucellosis vaccines: report of WHO Meeting with the participation of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the Office International des Epizooties (OIE) Geneva, Switzerland 11-12 December 1997. WHO/ EMC/ ZD/ 98. 14.
26- WHO, 1977. Requirements for *Brucella melitensis* strain Rev.1 vaccine (Live-for Veterinary use). WHO expert committee on Biological standardization, 28th Report, Annex 4, Technical Report Series No. 610. World Heath Organization, Geneva.
27- Zowghi, E., Ebadi, A., Yarahmadi, M. (2008). Isolation and identification of *Brucella* organisms in Iran. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases* 3(4):185-188.