نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۶ بهار ۱۳۹۴
DOI:10.22034/vj.2015.100910

بررسی مقایسه ای محیط کشت بروسلا آگار دیفکو(BD) با محیط گلیسرول دکستروز آگار جهت تولید واکسن Rev ۱

• سعید عالمیان
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش تولید واکسنهای بروسلوز

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۹۲ تاریخ پذیرش: مهرماه ۹۳
E-mail: s.alamian@rvsri.ac.ir

چکیده

کنترل و ریشه کنی بیماری بروسلوز در ایران مبتنی بر واکسیناسیون دام های حساس با واکسن Rev 1 است. این واکسن با استفاده از محیط های کشت بروسلا آگار تجاری تولید می شود که به دلیل تحریم های اقتصادی، واردات این محیط کشت به سختی و با قیمت های بسیار گزاف امکان پذیر می باشد، لذا با توجه به سابقه تولید محیط گلیسرول دکستروزآگار در کشور و ثبت بین المللی آن، این مطالعه جهت بررسی امکان جاگزینی آن با محیط وارداتی انجام شد. بنابراین با هر کدام از محیط های فوق، ۱۰ سری واکسن آزمایشی Rev 1 با بذر مادر (Master seed) یکسان تهیه شد. تعداد جرم باکتری در یک میلی لیتر از بالک هر سری ساخت به وسیله تهیه رقتهای سریالی و با شمارش تعداد پرگنه در واحد حجم (CFU)، محاسبه شد. همچنین سایر آزمایش های کیفی از جمله مروفولوژی پرگنه و تعیین درصد اجرام Rough، آزمایش بی ضرری (Safety) و آزمایش ایمنی زایی (Efficacy) در هر سری انجام گردید. نتایج نشان می دهد که میانگین جرم باکتری در ۱۰ سری ساخت $۱۳۴/۳۷\times۱۰^{۹}$ و $۱۱۸/۵۵\times۱۰^{۹}$ (CFU) و در صد پرگنه های Rough، ۰/۷۵ درصد و ۱/۲۸۱ درصد به ترتیب با بروسلا آگار دیفکو و محیط کشت گلیسرول دکستروز آگار سرم دار بود. از نظر آزمایش های بی ضرری و ایمنی زایی هیچ تفاوتی بین واکسن های تولیدی توسط دو نوع محیط کشت مشاهده نشد. بنابراین با توجه به همخوانی نتایج آزمایشات با استانداردهای تعریف شده، می توان از محیط کشت گلیسرول دکستروز آگار جهت تولید واکسن Rev 1 استفاده نمود.

کلمات کلیدی: بروسلا آگار، گلیسرول دکستروز آگار، واکسن، Rev 1، بروسلوز

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 106 pp: 18-23

Comparative evaluation of Difco brucella agar (BD) and glycerol dextrose agar culture media for production of brucellosis Rev 1 vaccine

By: *Alamian, S., Assistant Professor, Department of Research, Breeding and Production of Laboratory Animals, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran·*

Received: January 2013 Accepted: October 2014

E-mail:s.alamian@rvsri.ac.ir

Control and eradication of the brucellosis is loosed on vaccination of susceptible animals by Rev 1 vaccine. Production of this Vaccine is done by brucella agar culture media that is imported. Recently, the price of the medium has increased because of economic sanctions. Therefore, regarding the production of glycerol dextrose agar in Iran and its record in international sources, this study was done for possible replacement with this medium. So, 10 batches of vaccine were produced using this medium and they were compared with the vaccines produced by brucella agar with the same master seed. The number of live bacteria in 1 ml of bulk product was counted by counting the number of colony forming unit (CFU). In addition, other quality tests like morphology of colony or determination of the percentage of rough organisms, safety and efficacy test were done on each batch. The results indicated the mean numbers of live bacteria in 1 ml of bulk products was134.37×109 and 118.55×109 (CFU) and the percentage of rough colonies was %0.75 and %1/281 for Vaccines produced by brucella agar and glycerol dextrose agar respectively. There was not any difference in other quality tests includes safety and efficacy and all quality parameters remained within the standard ranges. Thus regarding the suitable results, this new culture medium can be used for Rev1 vaccine production.

Key words: Brucella Agar, Glycerol dextrose agar, Vaccine, Rev 1, Brucellosis

مقدمه

بیماری بروسلوز از مهم ترین زئونوزهای باکتریایی می باشدکه در اثر تماس مستقیم یا غیر مستقیم با دام ها و فرآورده های دامی آلوده به انسان منتقل می گردد. این بیماری تحت عنوان سقط جنین واگیر و تب مدیترانه ای به ترتیب در دام و انسان مطرح می باشد که به صورت تحت حاد یا مزمن می باشد. مهم ترین گونه های بروسلا در ایران ملی تنسیس و آبورتوس است و گونه ملی تنسیس بیووار یک شایع ترین می باشد (Zowghi، ۲۰۰۸). کنترل و ریشه کنی بیماری در جمعیت های دامی مبتنی بر واکسیناسیون دام های حساس است (Blasco، ۲۰۱۱). بیماری در انسان بوسیله مارستون در سال ۱۸۶۱ و عامل آن توسط دیوید بروس در ۲۶ دسامبر ۱۸۸۶ میلادی کشف شد (Wyatt ، ۲۰۱۳). بروس در مطالعات بعدی پرگنه های بعد از تزریق نسج در طحال را بدست آورد و اولین گزارش در نشریه Practitioner در سال ۱۸۸۷ چاپ شد (Wyatt ، ۲۰۰۵). در ایران اولین بار در سال ۱۳۱۱ بروسلا ملی تنسیس از کشت خون انسان در انستیتوپاستور توسط کراندل و همکارانش و توسط دکتر علی اف از کشت خون بیماری مبتلا به تب مالت در یکی از بیمارستان‌های تهران جدا گردید و در سال ۱۳۲۷ برای اولین بار دکتر انتصار بروسلا ملی تنسیس را از شیر بز جدا کرد (Zowghi، ۲۰۰۸).

بیماری بروسلوز دارای انتشار جغرافیایی گسترده بوده و یک مشکل جهانی محسوب می گردد (Pappas ، ۲۰۰۶). در ایران با توجه به شرایط اقلیمی کشور با پراکندگی متغیر در مناطق مختلف وجود دارد (Moradi ۲۰۰۶). برای مقابله با بیماری بروسلوز در انسان واکسن موثری وجود ندارد (Ko ، ۲۰۰۳) از این رو تلاش برای جلوگیری از آلودگی انسان بر اقدامات پیشگیرانه تمرکز یافته است بطوریکه کنترل آلودگی در دام ها منجر به کاهش بروز بیماری در انسان می گردد (Schurig، ۲۰۰۲). جهت واکسیناسیون دام ها واکسن های متعددی بکار گرفته شده است. پرمصرف ترین واکسن جهت پیشگیری از بروسلوز در گوسفند و بز واکسن بروسلا ملی تنیس سویه Rev 1 می‌باشد که به عنوان مرجع شناخته شده می بایستی سایر واکسن ها با این واکسن مقایسه شوند. مطالعات زیادی برای بدست آوردن یک سوش ضعیف بروسلا ملی تنسیس که در تهیه واکسن زنده بکار می رود انجام گرفت (Calderon ، ۲۰۱۳). تا اینکه در سال ۱۹۵۰ واکسن Rev 1 توسط Elberg و همکاران در دو مرحله شامل مقاومت و یا وابستگی به استرپتومایسین و دوم بازگشت وابستگی اما حفظ مقاومت در مقابل استرپتومایسین به دست آمد (Elberg ، ۱۹۵۷). مقاومت کروموزومی اکتسابی به استرپتومایسین غالبا به موتاسیون در ژن رمز کننده پروتئین ریبوزومی S۱۲ مربوط می شود (Cloeckaert، ۲۰۰۲). مقایسه تخفیف حدت دو سویه نامبرده تحت عنوان وابسته و غیروابسته، بوسیله تزریق به موش و خوکچه صورت گرفته و مشاهده شد که هیچ یک از این دو سویه کوچکترین ضایعه ای در طحال دام ایجاد ننموده اند ولی تکثیر سوش غیروابسته در طحال دام و قابلیت تولید ایمنی آن چندین برابر بیش از سویه وابسته در بدن دام می باشد (Blasco، ۱۹۹۷). این سویه Rev 1 بعنوان یک واکسن موثر و قوی با توانایی ایجاد ایمنی مناسب در نشخوارکنندگان کوچک، در کشورهای آمریکا، انگلستان و اسپانیا مورد تجربه قرار گرفت و نتایج رضایت بخشی بدست آمد (Wyatt، ۲۰۱۳). بدین ترتیب امروزه

واکسن استاندارد البرگ سویه Rev 1 از بروسلا ملی تنسیس زنده تخفیف حدت یافته بیووار یک با پرگنه صاف جهت ایمن سازی گوسفند و بز در سن ۶-۳ ماهگی و با دز $۱-۴\times۱۰^{-۹}$ مورد استفاده قرار می گیرد.

این واکسن با استفاده از محیط های کشت بروسلا آگار تجاری تولید می شود که به دلیل تحریم های اقتصادی، واردات این محیط کشت به سختی و آن هم با قیمت های بسیار گزاف امکان پذیر می باشد، لذا به دلیل اهمیت این واکسن و همچنین با توجه به سابقه تولید محیط گلیسرول دکستروزآگار در کشور و ثبت بین المللی آن، این مطالعه جهت بررسی امکان جاگزینی این محیط با محیط وارداتی انجام شد.

مواد و روش کار

محیط گلیسرین دکستروز آگار

برای تهیه محیط ژلوز معمولی Nutrient Agar یک کیلوگرم گوشت چرخ کرده بدون چربی با دو لیترآب مقطر به مدت نیم ساعت جوشانده و صاف شد. آن گاه به میزان ۱درصد پپتون (BDH) و ۰/۵درصد NaCl (Merck) به آن اضافه شد. پس از تنظیم pH محیط در حدود ۷/۷ در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، به نسبت ۲ درصد آگار به محیط بالا اضافه شد و پس از حذف ناخالصی های مواد غذایی در دمای ۱۲۰ درجه به مدت ۴۰ دقیقه استریل شد. برای تهیه محیط گلیسیرین دکستروز آگار، ۱۰۰ میلی لیتر محلول گلوکز و ۴۰ میلی لیتر گلیسیرین را بخوبی با هم مخلوط کرده و ۱۸۶۰ میلی لیتر ژلوز تهیه شده فوق پس از ذوب کردن به ترکیب حاصل اضافه شد. در نهایت به نسبت ۵ درصد سرم نرمال غیر فعال استریل اسب اضافه کرده و محیط حاصل به میزان ۱۶۵ میلی لیتر در هر بوات در ۱۲ بوات استریل تقسیم شد. بوات ها در ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند و پس از استریل به منظور تامین حداکثر سطح کشت، بر روی میز استیل به صورت افقی قرار داده شدند (ذوقی ۱۳۸۳). قابل ذکر است برای بررسی تاثیر سرم در رشد باکتری به تعداد بوات های فوق، بوات های بدون سرم نرمال غیر فعال اسب نیز آماده کشت باکتری شد. بعد از ۲۴ ساعت کلیه بوات ها از نظر دوام و چسبندگی ژلوز به دیواره بوات مورد بررسی قرار گرفتند.

تولید واکسن Rev 1

بذر Rev1 تهیه شده در محیط کشت بروسلا آگار دیفکو (Difco ۲۱۱۰۸۶) و گلیسرول دکستروز آگار در شرایط کاملا یکسان کشت داده شده و بعد از ۱۲۰ ساعت (۵ روز) انکوباسیون در گرمخانه، بوسیله باکتوکازیتون استریل برداشت شدند. در مجموع ۱۰ بچ از واکسن با استفاده از محیط گلیسرول دکستروزآگار تولیدشد. همزمان به منظور مقایسه همراه با هر یک از این بچ ها یک سری واکسن نیز روی محیط گلیسرول دکستروزآگار با سرم نرمال اسب با استفاده از بذر مشترک کشت و تولید شد.

ارزیابی واکسن‌های تولیدی

در ادامه واکسن های تولید شده از سه نوع محیط کشت (بروسلا آگار تجاری، گلیسرول دکستروز آگار با سرم نرمال اسب و بدون سرم) به روش های زیر مورد ارزیابی قرار گرفتند:

۱. شمارش جرم زنده: تعداد جرم زنده یا تعداد واحد تشکیل دهنده کلنی (Colony Forming Unit) (CFU) در یک میلی لیتر از فراورده بالک حاصل از سه محیط، گلیسرول دکستروز آگار با سرم نرمال اسب، گلیسرول دکستروز آگار بدون سرم نرمال اسب و محیط بروسلا آگار دیفکو محاسبه شد (Alton، ۱۹۸۸، OIE، ۲۰۱۲).

۲. آزمایش بی ضرری: واکسن های تولید شده به صورت زیر جلدی به تعداد مشخصی موش BALB/c ماده ۸-۶ هفته به صورت زیر جلدی تزریق شد. قابل ذکر است همزمان به موش های کنترل منفی سرم فیزیولوژی تزریق شد. کلیه موش ها به مدت ۱۱ روز بعد از تزریق، از لحاظ ایجاد هر گونه واکنش موضعی (در محل تزریق) و یا سیستمیک و همچنین کاهش وزن مشخص مورد بازرسی قرار گرفتند (Arena Gamboa، ۲۰۱۱، OIE، ۲۰۱۲).

۳. آزمایش ایمنی زایی: ۱×۱۰^{۵} جرم زنده از واکسن های تهیه شده به صورت زیر جلدی به تعداد مشخصی موش BALB/c ماده ۸-۶ هفته به صورت زیر جلدی در کنار موش های کنترل منفی (تزریق سرم فیزیولوژی) تزریق شد. ۳۰ روز پس از واکسیناسیون کلیه موش ها (تست و کنترل) با ۲×۱۰^{۵} جرم زنده بروسلا ملیتنسیس سویه (Godefroid ۱۶M ، ۲۰۱۰) به صورت داخل صفاقی مورد چالنج قرار گرفتند. ۲ هفته بعد از چالنج موش ها کشته شده و از طحال آنها ثلایه تهیه شد. کشت ثلایه طحال در محیط اختصاصی (بروسلا آگار) انجام شد (Arena Gamboa، ۲۰۱۱، OIE، ۲۰۱۲، Miranda، ۲۰۱۳).

۴. مرفولوژی پرگنه: با توجه به اینکه سویه Rev. ۱ دارای فنوتیپ صاف (Smoth) می باشد و در اثر شرایط نامناسب محیطی و کشت ممکن است به فرم خشن (Rough) تبدیل شود که این امر سبب از دست رفتن ایمنی زایی واکسن مربوطه می شود، لذا برای تشخیص صاف یا خشن بودن کلنی ها، آزمایش های زیر انجام شد (Arena Gamboa، ۲۰۱۱، OIE، ۲۰۱۲):

۴-۱- مشاهده مستقیم کلنی ها: کلونی ها بوسیله نور مورب منعکس شده از سطح یک آینه در زیر میکروسکوپ مشاهده شدند.

۴-۲- آزمایش آکریفلاوین: مقداری از نمونه را در یک قطره از رقت ۱/۱۰۰۰ آکریفلاوین حل کرده تا سوسپانسیون یکنواختی بدست آید.

۴-۳- رنگ آمیزی با کریستال ویوله: سوسپانسیون باکتریایی به گونه ای رقیق شد که کشت رقت نهایی آن روی محیط جامد موجب تظاهر کلونی های جدا از هم و تک گردد. پس از رشد کلونی ها مقداری رنگ کریستال ویوله استاندارد روی پلیت ریخته تا سطح کلونی ها را در بر گیرد. بعد از خروج رنگ، کلونی ها مورد بررسی قرار گرفتند.

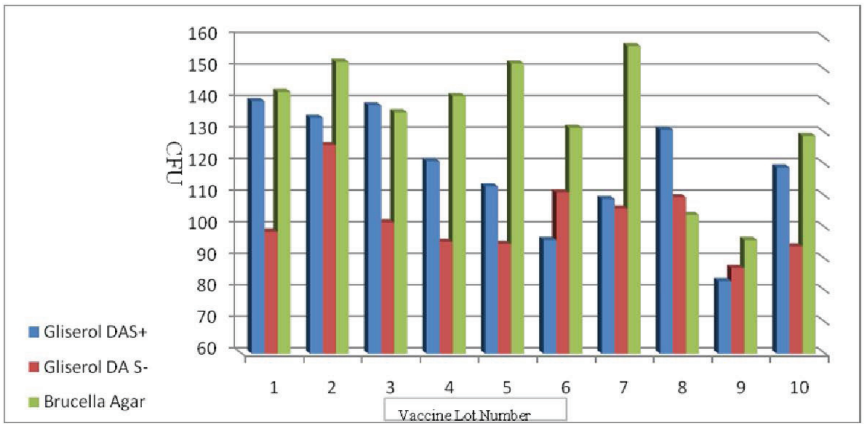
آنالیز آماری

تعداد جرم زنده واکسن به صورت میانگین CFU ± Standard E-rors (SE) بیان می شود که به صورت Log ۱۰ CFU از باکتری به شکل گرافیکی بیان شده است.

نتایج

ارزیابی واکسن های تولیدی

در ادامه واکسن های تولید شده از سه نوع محیط کشت (بروسلا آگار



نمودار ۱- مقایسه میزان جرم باکتری در یک میلی لیتر از فرآورده بالک واکسن با محیط بروسلا آگار تجاری و محیط گلیسرول دکستروز آگار با سرم و بدون سرم

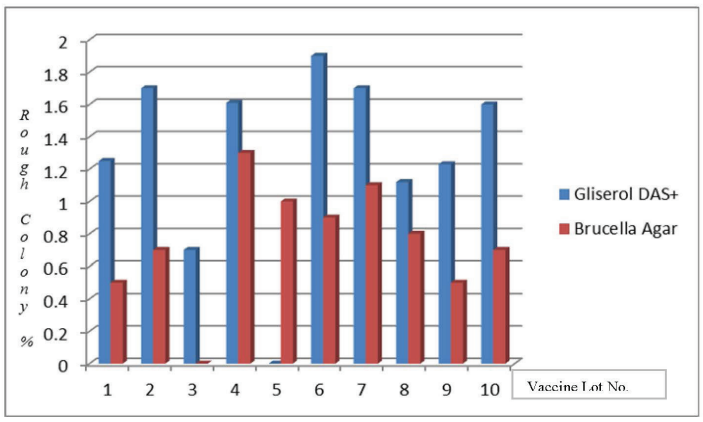
تجاری، گلیسرول دکستروز آگار با سرم نرمال اسب و بدون سرم) به روش های زیر مورد ارزیابی قرار گرفتند:

۱ - شمارش جرم زنده: نتایج مربوط به شمارش تعداد واحد تولید پرگنه (CFU) در هر میلی لیتر از فرآورده بالک واکسن های تولیدی روی محیط گلیسرول دکستروز آگار با سرم، بدون سرم و بروسلا آگار تجاری که در نمودار ۱ آورده شده است.

۲- آزمایش بی ضرری: در موش های BALB/c تزریق شده با واکسن های تولید شده با محیط بروسلا آگار تجاری و محیط گلیسرول دکستروز آگار هیچ گونه واکنش موضعی در محل تزریق و یا واکنش های سیستمیک در طول زمان بازرسی روزانه موش ها مشاهده نشد و همچنین توزین روزانه موش ها حاکی از عدم کاهش وزن در موشهای تحت آزمایش بود.

۳- آزمایش ایمنی زایی: کشت ثلاثه طحال موش های تزریق شده با واکسن های تولید شده با محیط بروسلا آگار تجاری و محیط گلیسرول دکستروز آگار در محیط اختصاصی نشان داد که ۹۰ درصد خوکچه ها از سویه حاد پاک می باشند، اما در گروه کنترل درصد عمده ای از کشت ثلاثه طحال آلوده به باکتری بودند.

۴- مرفولوژی پرگنه: در مشاهده مستقیم کلونی ها، کلنی های صاف به صورت گرد، درخشان و با رنگ آبی تا آبی متمایل به سبز و کلنی های خشن به صورت خشک و گرانوله به رنگ زرد تا زرد مایل به سفید دیده شدند. کلونی های صاف در آکریفلاوین به صورت همان سوسپانسیون یکنواخت شناور باقی مانده ولی کلونی های خشن بلافاصله آگلوتینه شدند. در رنگ آمیزی با کریستال ویوله کلونی های صاف رنگ را به خود نگرفته، در حالیکه کلونی های خشن به رنگ ارغوانی درآمده و یا روی سطح آنها شکاف های شعاعی بوجود آمد. نتایج نشان می دهند که تفاوت چندانی در میزان Rough شدن برگنه ها بین واکسن های تولید شده با محیط بروسلا آگار تجاری و واکسن های تولید شده با محیط گلیسرول دکستروز آگار مشاهده نشد بطوریکه در تمام سری های ساخت توسط دو نوع محیط درصد پرگنه های Rough در فرآورده بالک کمتر از ۵ درصد (حد استاندارد قابل قبول) بوده است (نمودار ۲).



نمودار ۲- مقایسه میزان پرگنه های راف در فرآورده بالک واکسن با محیط بروسلا آگار تجاری و محیط گلیسرول دکستروز آگار

بحث

بیماری بروسلوز در بسیاری از کشورها از جمله ایران سلامت عمومی و اقتصاد دامی را به خطر انداخته است. از نظر بهداشت عمومی پیشگیری و کنترل بیماری بروسلوز در انسان مستلزم کنترل و ریشه کنی این بیماری در دام ها می باشد. پیشگیری و کنترل بیماری در دام با واکسیناسیون دام ها، شناسایی کانون های آلوده، رعایت بهداشت در دامداری ها، تست های منظم سالانه و تشخیص بیماری در حیوانات، معدوم کردن حیوانات ناقل، جلوگیری از تماس انسان با حیوان مبتلا و یا به حداقل رساندن آن، پاستوریزه کردن تمامی شیرها و روش تست وکشتار امکان پذیر می باشد. مبارزه با بروسلوز دامی اساسا مبتنی بر واکسیناسیون دام های حساس و انجام برنامه های تست و کشتار است (Pappas ، ۲۰۰۶). در این میان واکسیناسیون جمعیت دامی کشور از موثرترین و کاربردی ترین راه کارها محسوب می شود، بطوری که مطالعات نشان می دهند که در صورت توقف واکسیناسیون دام ها، علاوه بر مخا طرات فراوانی که از نظر بهداشت عمومی به وجود می آید، خسارات جبران ناپذیری نیز به اقتصاد کشور وارد می گردد (Blasco ، ۲۰۱۱). تاکنون واکسن‌های متعددی از سویه‌های زنده یا کشته بروسلا آبورتوس، بروسلاملی تنسیس و بروسلاسوئیس جهت ایمن‌سازی گاو، گوسفند و بز، خوک، شتر و دیگر حیوانات مورد استفاده قرارگرفته است. واکسیناسیون در انسان نیز به طور محدود انجام پذیرفته است.

مهم ترین واکسن‌های مورد مصرف دامپزشکی واکسن زنده سویه ۱۹ بروسلا آبورتوس (S۱۹)، واکسن زنده و کشته سویه ۴۵/۲۰ بروسلا آبورتوس، واکسن زنده سویه موکوئیدی ۱۰۴M بروسلا آبورتوس، واکسن کشته سویه۳۸H بروسلا ملی تنسیس، واکسن‌زنده سویه Rev 1 بروسلا ملی تنسیس و واکسن زنده سویه ۲S می باشند. از فراکسیون های آنتی ژنی سویه‌های مختلف بروسلا نیز با موفقیت نه چندان چشمگیری استفاده شده است. از بین واکسن‌های فوق‌الذکر، واکسن تهیه شده از سویه ۱۹ بروسلا آبورتوس و واکسن سویه Rev 1 بروسلا ملی تنسیس از واکسن‌های انتخابی ایمن‌سازی علیه بروسلوز به ترتیب در گاو و گوسفند و بز می باشند (Ficht ، ۲۰۰۹، Schurig، ۲۰۰۲). واکسن‌سویه Rev 1 پس از کشف اولیه آن به وسیله البرگ در ۱۹۵۵ به طور وسیع در گوسفند و بز مورد استفاده قرار گرفته است. این واکسن یکی از اثر گذارترین واکسن ها در پیشگیری و کنترل بروسلوز در گوسفند و بز می‌باشد (Ficht، ۲۰۰۹، Schurig ، ۲۰۰۲). این واکسن از دهه ۱۳۴۰ به بعد در بره و بزغاله، و طی سال‌های اخیر در گوسفند و بز بالغ درایران مصرف گردیده است (Zowghi، ۲۰۰۸).

امکان رشد تعداد کم میکروب بروسلا و همچنین اختلاف میزان رشد در بعضی تیپ های آن در شماره های مختلف از یک نوع محیط کشت و یا حتی در نوبت های مختلف کشت، لزوم استفاده از یک محیط کشت مناسب برای رشد بروسلا را اجتناب ناپذیر می سازد. یک محیط کشت مناسب برای رشد میکروب بروسلا محیطی است که حداقل تعداد باکتری روی آن رشد نموده و مخصوصاً برای باکتری های حساس و دیر رشد مناسب باشد و اختلاف زیادی بین محیط های تهیه شده از یک شماره وجود نداشته باشد (ذوقی ۱۳۸۳). مطالعات نشان می دهند که محیط سرم دکستروز آگار (SDA) با یک درصد دکستروز و ۵ درصد سرم نرمال اسب که به آگاردیفکو آکسوئید اضافه می شود، برای تجدید کشت و کشت های اولیه ازمنابع غیر آلوده مثل خوکچه هندی مناسب می باشد. همچنین محیط گلیسرول دکستروز آگار جهت بررسی کشت های تفکیکی ترجیح دارد (ذوقی ۱۳۸۳). واکسن Rev.۱ بروسلا با استفاده از محیط های کشت بروسلا آگار تجاری تولید می شود که به دلیل تحریم های اقتصادی، واردات این محیط کشت به سختی و با قیمت های بسیار گزاف امکان پذیر می باشد، لذا به دلیل اهمیت این واکسن و همچنین با توجه به سابقه تولید محیط گلیسرول دکستروزآگار در کشور و ثبت بین المللی آن، این مطالعه جهت بررسی امکان جاگزینی آن با محیط تجاری وارداتی انجام شد، تا ضمن صرفه جویی اقتصادی، بتوان محیطی را تولید کرد که مشکلات محیط بروسلا آگار تجاری مثل تغییرات محیط در طول مدت زمان را نداشته باشد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که با محیط گلیسرول دکستروز آگار تهیه شده می توان جرم مناسبی از باکتری را تهیه کرد و بعد از لیوفیلیزه، واکسن تولید شده تفاوتی مشخصی با واکسن تولید شده با محیط بروسلا آگار نداشت. در بررسی مرفولوژی پرگنه های تولید شده در واکسنهای تحت آزمایش با محیط بروسلا آگار و محیط گلیسرول دکستروز آگار مشخص شد که واکسن های تولید شده با محیط گلیسرول دکستروز آگار از نظر درصد سویه راف واکسینال Rev.۱ درحد استاندارد می باشد. بر اساس نتایج به دست آمده در صد پرگنه های Rough، ۰/۷۵ درصد و ۱/۲۸۱ درصد به ترتیب با بروسلا آگار دیفکو و محیط کشت گلیسرول دکستروز آگار سرم دار بود. نتایج مربوط به شمارش تعداد واحد تولید پرگنه (CFU) در هر میلی لیتر از فرآورده بالک واکسن های تولیدی روی محیط گلیسرول دکستروز آگار و بروسلا آگار نشان می دهد که محیط کشت گلیسرول دکستروز آگار نسبت به بروسلا آگار محصول باکتریایی کمتری بدست آمده و میزان رشد باکتری روی آن کمتر از بروسلا آگار است، اما با اضافه کردن سرم نرمال اسب به میزان نهایی ۵-۳ درصد به محیط ساخته شده، این کاهش جرم تا حدود زیادی رفع شده است و میزان جرم به حد استاندارد رسیده است به طوریکه میانگین جرم باکتری در ۱۰ سری واکسن ساخته شده $۱۳۴/۳۷\times۱۰^{۹}$ و $۱۱۸/۵۵\times۱۰^{۹}$ (CFU) به ترتیب با بروسلا آگار دیفکو و محیط کشت گلیسرول دکستروز آگار سرم دار به دست آمد. از لحاظ آزمایش های بی ضرری و ایمن زایی نیز هیچ گونه تفاوتی بین واکسن های تولید شده از دو نوع محیط مشاهده نشد، بطوری که از جنبه کیفی نیز واکسن های تولید شده با استفاده از محیط گلیسرول دکستروز آگار مشابه واکسن های تولیدی روی محیط بروسلا آگار بوده و واجد خصوصیات استاندارد لازم در این آزمایش ها بودند. بنابراین می توان از محیط گلیسرول دکستروز آگار با سرم نرمال اسب و با فرمولاسیون اختصاصی برای کشت باکتری بروسلا ملی تنسیس جهت تولید واکسن Rev.۱ با کیفیت مناسب استفاده کرد.

تشکر و قدرردانی

این مطالعه طی طرح تحقیقاتی مصوب موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی به شماره مصوب ۲-۱۸-۱۸۰۸۶۰۴۲انجام شده است. نویسنده مقاله از کلیه افرادی که در این تحقیق همکاری داشتند به خصوص پرسنل بخش تولید واکسن های بروسلوز، کمال تشکر و قدردانی بعمل می آورند.

منابع مورد استفاده

۱- ذوقی، ا.، وند یوســفی، ج.، حاجی خانی، ر. (۱۳۸۳). تکنیک های آزمایشگاهی بروســلوز در دامپزشکی و پزشکی (نویســنده G. G. Alton)- انتشارات قلمستان، صفحه: ۲۸-۲۳.

2. Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris, France.

3. Arena Gamboa, A.M., Rice-Ficht, A.C., Kahl-McDonagh, M.M., Ficht, T.A. (2011). Protective Efficacy and Safety of *Brucella melitensis* 16M mucR against Intraperitoneal and Aerosol Challenge in BALB/c Mice. Infection and Immunity. 79 (9): 3653–3658.

4. Blasco, J.M. (1997). A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. Prev Vet Med. 31(3-4): 275-83.

5. Blasco, J.M., Molina-Flores, B. (2011). Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 27 (1): 95-104.

6. Calderón, A.E.D., Merino, A.L., Sriranganathan, N., Boyle, S.M., Rodríguez, A.C. (2013). A History of the Development of Brucella Vaccines. Bio Med Research International. ArticleID 743509, 8pages.

7. Cloeckaert, A., Grayon, M., Grepinet, O. (2002). Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the rpsL gene. Vaccine. 20(19-20); 2546-50.

8. Elberg, S.S., Faunce, K.J.R. (1957). Immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of *Brucella melitensis*. Journal of bacteriology. 73 (2); 211-217.

9. Ficht, T.A., Kahl-McDonagh, M.M., Arenas-Gamboa, A.M., Rice-Ficht, A.C. (2009). Brucellosis: the case for live, attenuated vaccines. Vaccine. 5;27 Suppl 4:D40-3.

10. Godefroid, M., Svensson, M.V., Cambier, P., Uzureau, S., Mirabella, A., De Bolle, X., Van Cutsem, P., Widmalm, G., Letesson, J.J. (2010). *Brucella melitensis* 16M produces a mannan and other extracellular matrix components typical of a biofilm. FEMS Immunol Med Microbiol. 59 (3):364-77.

11. Ko, J., Splitter, G.A. (2003). "Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans". Clin. Microbiol. Rev.16 (1): 65–78.

12. Miranda, K.L., Poester, F.P., Minharro, S., Dorneles, E.M., Stynen, A.P., Lage, A.P. (2013). Evaluation of *Brucella abortus* S19 vaccines commercialized in Brazil: immunogenicity, residual virulence and MLVA15 genotyping. Vaccine. 24;31 (29): 3014-8.

13. Moradi, G., Esmaiel Nasab, N., Ghaderi, E., Sofi Majidpour, M., Salimzadeh, H. (2006). Brucellosis in Kurdistan province from 1997 to 2003. Annals of Alquds Medicine. 2: 32-7.

14. Office International des Epizooties. (2012). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 7th edn, world organization for animal health. chapter 2.4.3.

15. Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., Tsianos, E.V. (2006). The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis. 6(2): 91-9.

16. Schurig, G.G., Sriranganathan, N., Corbel, M.J. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. Vet Microbiol. 90 (1-4): 479-96.

17. Wyatt, H.V. (2013). Lessons from the history of brucellosis. Rev Sci Tech. 32 (1):17-25.

18. Wyatt, H.V. (2005). How Themistocles Zammit found Malta Fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats. J R Soc Med. 98 (10): 451-4.

19. 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.