DOI: http://dx.doi.org/10.22034/vj.2016.105743

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۰ بهار ۱۳۹۵

ارزیابی پایداری آنتی ژن رزبنگال، رینگ تست و سروآگلوتیناسیون رایت در موسسه رازی

• **سعید عالمیان (نویسنده مسئول)**
عضو هیات علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
• **افشار اعتمادی**
کارشناس ارشد آزمایشگاه
• **لیلا نعمتی**
کارشناس ارشد آزمایشگاه
تاریخ دریافت: تیرماه ۹۲ تاریخ پذیرش: آذرماه ۹۲
Emali: s.alamian@rvsri.ac.ir

چکیده

مطالعات پایداری برای تعیین تاریخ انقضای فراورده‌های بیولوژیک و تایید اثرگذاری آن‌ها استفاده شده و نقش مهمی در اطمینان از کیفیت فرآورده دارند. به این منظور فرآورده بیولوژیک طوری طراحی می‌شـــود که بی‌ضرری و اثربخشی آن تضمین شده باشد. برای رســـیدن به این منظور ویژگی‌هایی برای فراورده در نظر گرفته می‌شود که مهم‌ترین آن مقدار ماده موثره می‌باشد. حفظ این ویژگی در طول زمان، پایداری فراورده (Stability) نامیده می‌شـــود. برای بررســـی پایداری فراورده‌های بیولوژیک، مطالعاتی تحت عنوان مطالعات پایداری طرح‌ریزی شده اســـت. این مطالعات در ۲ گروه اصلی طبقه‌بندی می‌شوند: الف: مطالعات پایداری تسریع شـــده (Accelerated Stability Study) که در این نوع مطالعات پایداری از طریق تغییر شرایط نگهداری مثل افزایش دمای نگهداری در دمای ۳۷ درجه در مدت زمان مشـــخص، طول مدت مطالعه را کاهـــش داده و با یکبار انجام آزمایش‌های کنترل کیفیت از جمله آزمایش Potency، میزان پایداری تعیین می‌شـــود. ب: مطالعات پایداری طولانی مدت Long Term Stability Study (Real Time/ Real Condition): در این نوع مطالعه، واکســـن در شرایط توصیه شده نگهداری از طرف تولید کننده، قرار می گیرد. سپس آزمایش‌های کنترل کیفیت در طول مدت نگهداری و به فواصل زمانی مشـــخص بســـته به نوع و مدت زمان انقضای قرارداد شده، انجام شده و پایداری آن تعیین می‌شـــود. لذا به استناد یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که آنتی ژن رینگ تست آنتی ژن رزبنگال و آنتی ژن رایت تولیدی در موسسه رازی حداقل به مدت ۳ سال قابل استفاده می‌باشد.

کلمات کلیدی: آنتی ژن، رزبنگال، تاریخ انقضا، رینگ تست

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 110 pp: 41-53

Prevalence study of Eimeria species in broilers and layer chickens pathology in Tehran and Alborz provinces

By: Alamian, S,. (Corresponding Author) Member of Sientific Board of Razi Vaccine and Serum Research Institute. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. Etemadi, A., Member of Board of Razi Vaccine and Serum Research Institute. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. Nemati, L., Member of Board of Razi Vaccine and Serum Research Institute. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Received: June 2013 Accepted: November 2013

Emali: s.alamian@rvsri.ac.ir

Brucellosis is a zoonotic disease that spread from infected animals to humans. Six classic species of Brucella include *B. abortus, B. melitensis, B. suis, B. canis, B. neotomae* and *B. ovis*. there. Four new species of Brucella including *B. pinnipediae, B. inopinata B. cetaceae* and *B. maris* have been reported in recent years. There are several methods to diagnosis of brucellosis. Some of these methods contain agglutination tests, such as Wright - Rose Bengal and ring test. The expiry date of these products are considered for one year in Razi Institute. Since the expiry date of foreign similar products is greater than one year also OIE and WHO guidelines are not mandatory on the one-year expiration of these products. So this project is to investigate the possibility of increasing the expiration date of the products for longer storing time and provides easy access to consumers. For this project, the antigens were sampled and the following two methods were used: 1- Real Time Stability Study. The standard method for determining the product expiry date is Real Time Stability Study . In this method, the sample antigens were tested at production time for 3 years in one-year periodical durations. 2- Accelerated Stability Study. The results showed that the physical and chemical characteristics including packed cell volume, sterility, phenol, pH, agglutination test with standard serum of Rose Bengal, Wright and ring test antigens did not show marked changes rather than specifications feature at production time and standard sample. Therefore, the results indicated that the expiry date of Rose Bengal, sero agglutination Wright and Milk Ring antigens can be considered for 3 years.

Keywords: Antigen - Sero agglutination Wright - Rose Bengal - Milk Ring. Expiry date

مقدمه

مطالعات پایداری برای تعیین تاریخ انقضای فراورده‌های بیولوژیک و تایید اثرگذاری آن‌ها استفاده شده و نقش مهمی در اطمینان از کیفیت فرآورده دارند. به این منظور فراورده بیولوژیک طوری طراحی می‌شود که بی‌ضرری و اثربخشی آن تضمین شده باشد. برای رسیدن به این منظور ویژگی‌هایی برای فراورده در نظر گرفته می‌شود که مهم‌ترین آن مقدار ماده موثره می‌باشد. حفظ این ویژگی در طول زمان، پایداری فراورده (Stability) نامیده می‌شود (۱، ۲ و ۳).

برای بررسی پایداری فراورده بیولوژیک، مطالعاتی تحت عنوان مطالعات پایداری طرح‌ریزی شده است. این مطالعات در ۲ گروه اصلی طبقه‌بندی می‌شوند: الف: مطالعات پایداری تسریع شده (Accelerated Stability Study) که در این نوع مطالعات پایداری از طریق تغییر شرایط نگهداری مثل افزایش دمای نگهداری در دمای ۳۷ درجه در مدت زمان مشخص، طول مدت مطالعه را کاهش داده و با یکبار انجام آزمایش‌های کنترل کیفیت از جمله آزمایش Potency واکسن، میزان پایداری فراورده تعیین می‌شود. ب: مطالعات پایداری طولانی مدت Long Term Stability Study (Real Time/ Real Condition): در این نوع مطالعه، فراورده بیولوژیک در شرایط توصیه شده نگهداری از طرف تولید کننده، قرار می‌گیرد. سپس آزمایش‌های کنترل کیفیت در طول مدت نگهداری و به فواصل زمانی مشخص بسته به نوع فراورده و مدت زمان انقضای قرارداد شده برای واکسن مورد نظر، انجام شده و پایداری آن تعیین می‌شود.

موسسه رازی یکی از مراکز اصلی تولیدکننده آنتی ژن‌های تشخیصی از جمله آنتی ژن‌های بروسلوز می‌باشد که جهت تشخیص بیماری بروسلوز بر پایه آزمایش‌های سرولوژی آگلوتیناسیون چون تست‌های رزبنگال، سروآگلوتیناسیون رایت و رینگ تست که ساده، سریع و ارزان با حساسیت بالا در تشخیص اولیه بروسلوز مورد مصرف می‌باشند. زمان انقضاء آنتی ژن‌های بروسلوز در بخش تولید در حال حاضر یک سال در نظر گرفته شده است. با توجه به اینکه نمونه‌های خارجی این محصولات دارای زمان انقضاء بیشتری می‌باشد و دستورالعمل‌های مراکز مربوطه در OIE و WHO الزامی بر یک ساله بودن زمان انقضای محصولات فوق ندارند، لذا با انجام این پروژه امکان افزایش تاریخ انقضاء فرآورده‌های مذکور بررسی می‌گردد تا ذخیره‌پذیر نمودن و دسترسی آسان برای مصرف کنندگان فراهم گردد.

مواد و روش‌ها

تمامی آزمایشات لازم شامل تست‌های کنترل کیفی حین تولید (In process Quality Control) و تست‌های کنترل کیفی نهایی بر روی هر یک از آنتی ژن‌های مذکور در زمان تولید در بخش بروسلوز مطابق با

دستوالعمل‌های استاندارد OIE و EEC صورت گرفته است. همچنین این فرآورده‌ها با تایید واحد کنترل کیفی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، گواهی ترخیص اخذ نموده اند.

این فرآورده‌ها پس از تولید طی دوره‌های یک ساله به مدت ۳ سال متوالی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند به نحوی که تمامی مشخصات آن‌ها با مشخصات زمان تولید و میزان انطباق یا انحراف آن‌ها از معیارهای استاندارد ثبت گردیده است. نمونه‌های آنتی‌ژن مورد استفاده در این تحقیق مربوط به سال‌های ۱۳۸۹، ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ می‌باشند. آزمایش‌های لازم جهت مطالعه پایداری آنتی‌ژن‌های سروآگلوتیناسیون رایت، رزبنگال و رینگ تست بر اساس دستوالعمل‌های استاندارد OIE و EEC به شرح ذیل می‌باشد.

۱-تعیین درصد جرم: میزان ۰/۵ میلی لیتر آنتی‌ژن و ۴/۵ میلی لیتر آب مقطر با هم در لوله مخصوص جرم سنجی مخلوط و با سانتریوفوژ به مدت ۷۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰ میزان رسوب جرم قرائت می‌شود. محدوده قابل قبول میزان جرم برای آنتی‌ژن رزبنگال ۸/۲-۷/۸ درصد و برای آنتی ژن‌های رینگ تست و سرو آگلوتیناسیون رایت معادل ۴/۲-۳/۸ درصد می‌باشد.

۲-تعیین میزان فنل و pH: با استفاده از دستگاه سنجش فنل و pH متر سنجیده می‌شود.

۳-تست استریلیتی: میزان ۳/. میلی لیتر از آنتی ژن به محیط سابورو گلوکز آگار و تایو گلیکولات اضافه و به ترتیب در دماهای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از ۱۴ روز از لحاظ رشد قارچ و باکتری مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۴-تست ارزیابی تیتر در مقایسه با آنتی‌سرم استاندارد بین‌المللی:

ارزیابی آنتی‌ژن رایت توسط آنتی سرم بین‌المللی

پس از تهیه ISABS از مراجع استاندارد ابتدا ۱ ml آب دیونیزه به آمپول لیوفیلیزه افزوده و مطابق واحد آن رقت‌های ۱/۱۵۰، ۱/۲۲۰، ۱/۲۷۰، ۱/۳۲۰ و ۱/۳۷۰ از استاندارد مورد نظر با استفاده از بافر سالین با فنل ۵٪ به میزان ۰/۵ سی سی در هر لوله تهیه شد. آنتی‌ژن مورد نظر را نیز به میزان ۱ به ۱۰ رقیق کرده و سپس به رقت‌های تهیه شده از آنتی سرم استاندارد به میزان ۰/۵ سی‌سی افزوده که در نهایت رقت‌های سرم دو برابر می‌شود. در نهایت رقت‌ها را کاملا میکس کرده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و پس از این مدت همه لوله‌ها را از لحاظ آگلوتیناسیون بررسی شدند. لوله‌ای که در آن ۵۰٪ اگلوتیناسیون (++) در رقت ۱/۶۴۰ نهایی سرم ایجاد شود تیتر مناسب و مورد نظر است که با جرم ۴٪ هم‌خوانی دارد.

ارزیابی آنتی‌ژن رزبنگال با استاندارد بین‌المللی ISABS

پس از تهیه رقت‌های ۱/۴۷ و ۱/۵۵ از سرم استاندارد با استفاده از بافرسالین با فنل ۵٪، آزمایش آگلوتیناسیون را با آنتی‌ژن رزبنگال انجام می‌شود. روش انجام آن نیز به گو نه‌ای است که پس از قرار دادن سرم‌ها و آنتی‌ژن رزبنگال به مدت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه یک قطره (۳٪ سی سی) از آنتی‌ژن و یک قطره از سرم مورد نظر را بر روی صفحه مخصوص این آزمایش قرار داده و پس از مخلوط کردن صفحه بر روی شیکر به مدت ۵ دقیقه قرار داده شده و سپس در زیر نور کافی ایجاد آگلوتیناسیون بررسی شدند. نتیجه قابل قبول مطابق استاندارد OIE در این آزمایش وجود آگلوتیناسیون در رقت ۱/۴۷ و عدم آگلوتیناسیون با رقت ۱/۵۵ از سرم استاندارد می‌باشد.

ارزیابی آنتی‌ژن رینگ تست توسط استاندارد بین‌المللی ISABS

ابتدا ۶ لوله همولیز انتخاب و یک سی‌سی از آنتی‌ژن به هر لوله ریخته شد. سپس از تامپون گلیسیرینه فنل دار از لوله اول به ترتیب به میزان ۰/۶، ۰/۸، ۱ ، ۱/۲ ، ۱/۴ و ۱/۶ میلی‌لیتر تا لوله ششم افزوده و از هر لوله توسط تامپون گلیسیرینه فنل‌دار رقت ۱/۱۰ تهیه شد.

مشابه با آنچه که در خصوص آنتی‌ژن رایت صورت می‌پذیرد. تهیه رقت‌های دو برابر از آنتی سرم استاندارد تهیه و رقت‌های آنتی‌ژن تهیه شده را به هر لوله افزوده شدند. پس از شیک کامل لوله‌ها آنها را به انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت منتقل کرده و پس از آن نتیجه را مطابق با روش آنتی ژن رایت قرائت شدند.

همچنین نمونه‌ها ی آنتی‌ژن‌ها به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه به منظور ارزیابی به روش Accelerated Stability نیز قرار گرفته و کلیه آزمایش‌های نامبرده به روی آن‌ها انجام شد.

نتایج

نمونه‌های انتخاب شده آنتی‌ژن رزبنگال در تحقیق بر اساس برنامه پیش‌بینی شده مورد آزمایش قرار گرفتند. این آزمایش‌ها شامل تعیین درصد جرم، میزان فنل، استریلیتی و میزان اسیدیته بوده که مطابق با شماره بچ به صورت سالانه به مدت ۳ سال مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج در جدول‌های ۱ و ۲ آورده شده است. همچنین مقایسه میزان آگلوتیناسیون نمونه‌های آنتی‌ژن‌های رزبنگال مورد نظر و نمونه استاندارد با سرم‌های مثبت و منفی در جدول۳ و نمودار ۱ نشان داده شده است.

نمونه انتخاب شده آنتی سروآگلوتیناسیون رایت در تحقیق بر اساس برنامه پیش‌بینی شده مورد آزمایش قرار گرفتند این آزمایشات شامل تعیین درصد جرم، میزان فنل و استریلیتی و میزان اسیدیته مطابق با شماره بچ به صورت سالانه و به مدت ۳ سال انجام شدند که نتایج در جدول‌های ۸ و ۹ آورده شده است. همچنین نتایج تیتراسیون آنتی‌ژن‌های سروآگلوتیناسیون رایت در مقابل آنتی‌سرم استاندارد بین‌المللی در جدول ۹ و نمودار ۲ نشان داده شده است. میزان ۵۰ درصد آگلوتیناسیون در رقت ۱/۶۴۰ در شکل ۲ نشان داده شده است.

نمونه‌های انتخاب شده از آنتی‌ژن‌های حلقه شیر مورد نظر در تحقیق بر اساس برنامه پیش‌بینی شده نیز مورد آزمایش قرار گرفتند. این آزمایش‌ها شامل تعیین درصد جرم، میزان فنل و استریلیتی و میزان اسیدیته مطابق با شماره بچ به صورت سالانه بوده که در طی ۳ سال مورد بررسی قرار گرفتند. که نتایج در جدول‌های ۱۱ و ۱۲ آورده شده است. همچنین نتایج تیتراسیون آنتی‌ژن‌های حلقه شیر در مقابل آنتی‌سرم استاندارد بین‌المللی در جدول ۱۳ و شکل ۳ نشان داده است.

کلیه نمونه‌های تحت مطالعه در دمای ۳۷ درجه نیز نتایج کاملا مشابهی با نمونه‌های مورد آزمایش در روش Real time داشتند.

بحث

یکی از وظایف تولیدکننده بررسی پایداری فراورده تولید شده جهت تایید تاریخ انقضای درج شده روی آن به عنوان یکی از آزمایشات کنترل کیفی بسیار مهم می‌باشد و حرکت در این راستا در جهت انطباق با استانداردهای مورد تایید سازمان بهداشت جهانی در قالب اجرای طرح‌های تحقیقاتی از گام‌های بسیار موثر در جهت نیل به این هدف مهم می‌باشد. بیماری بروسلوز از جمله بیماری‌های مشترک بین انسان و دام می‌باشد که سبب تهدید بهداشت عمومی جامعه و تحمیل خسارات اقتصادی کلان می‌گردد. بروز این بیماری در جامعه از سویی باعث غیرفعال شدن نیروی کار، و بدنبال آن منجر به پرداخت هزینه‌های درمان می‌گردد. بیماری‌زایی باکتری بروسلا در حیوانات اهلی به عنوان یک تهدید برای صنایع دامپروری و لبنی نیز محسوب می‌شود. سیاست سازمان‌های جهانی در خصوص مبارزه با این بیماری در درجه اول کنترل و نهایتا ریشه‌کنی آن می‌باشد. اساس کنترل و ریشه‌کنی این بیماری در پایش مستمر و دقیق بیماری در جمعیت‌های انسانی و دامی می‌باشد که مبتنی بر تشخیص سریع و دقیق عوامل سببی بیماری و گزارش به موقع آن به مراجع ذیصلاح می‌باشد. (۲، ۳) اجرای چنین استراتژی بایستی هم راستا با اصول کلی کاهش هزینه‌های تشخیص، افزایش اختصاصیت و سهولت انجام آزمایش قرار گیرد.(۴، ۵).

اصولا هر فرآورده بیولوژیک پس از تولید باید بتواند کیفیت مناسب خود را در شرایط تعیین شده جهت نگهداری تا زمان انقضاء محصول حفظ نماید. هدف این مطالعه نیز بررسی زمان پایداری محصولات نامبرده و امکان حفظ کیفیت و خصوصیات لازم در مدت بیشتر از تاریخ انقضاء تعیین شده می‌باشد. ارزیابی پایداری فرآورده‌های بیولوژیک منجر به ارائه شواهد در مورد چگونگی تغییر کیفیت مواد فعال آنها تحت تاثیر فاکتورهای محیطی مانند زمان دما، رطوبت، و نور می‌گردد که بر اساس آن می‌توان تاریخ انقضاء و شرایط نگهداری فرآورده مورد نظر را تعیین نمود. این مطالعات به دو صورت تسریع شده و طولانی مدت انجام می‌شود. مطالعه تسریع شده یک روش مطلوب از نظر زمانی می‌باشد چرا که می‌توان زمان مورد نظر جهت انقضاء محصول را با تغییر شرایط نگهداری مانند کاهش یا افزایش دما و رطوبت کوتاه نمود، اما از آنجایی که این گونه آزمایش‌ها حتی با رعایت ملاحظات خاص نمی‌تواند به صورت دقیق تاثیر زمان و شرایط محیطی را بر نمونه مورد نظر نشان دهد، لذا تنها جهت تخمین و نه تعیین زمان انقضاء مورد استفاده قرار می‌گیرد. از این رو مطالعات دوره طولانی یا Long Term Stability Study به عنوان ملاک واقعی محسوب می‌شوند. (۱۲، ۱۴) از این رو در این تحقیق از آنتی‌ژن رزبنگال، رایت و رینگ تست نمونه‌گیری و بر اساس روش مطالعه طولانی مدت مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین از فرآورده‌های مذکور که در سنوات گذشته تولید شده بودند نیز همزمان با آزمایش‌های مربوط به این تحقیق، مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج بررسی‌ها نشان داد که آنتی‌ژن رزبنگال تولیدی موسسه رازی با در نظر گرفتن آزمایش‌های استاندارد در حین تولید و تست‌های دوره‌ای پس از مدت ۳ سال، دارای قابلیت و کیفیت مناسب می‌باشد. نمونه‌های مربوط به سنوات گذشته که بیش از ۳ سال از زمان تولید آنها گذشته بود نیز مطلوب ارزیابی گردیدند لذا می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که می‌توان زمان انقضاء این فرآورده را ۳ سال در نظر گرفت.

ارزیابی آنتی‌ژن رایت در آزمایشات بررسی به روش طولانی مدت (Long Term) نشان داد که فاکتور زمان به مدت ۳ سال در کیفیت و کمیت این فرآورده تاثیری ندارد چرا که آزمایش‌های استاندارد پس از طی این زمان فاقد تغییر نسبت به نتایج ارزیابی در حین تولید فرآورده بود. همچنین نمونه‌های آنتی‌ژن رایت که قبل از شروع این تحقیق تولید شده‌اند که بیش از ۳ سال از تاریخ تولید آن‌ها گذشته بود نیز دارای نتایج قابل قبول بود اما بدلیل تحت کنترل نبودن شرایط تولید آن‌ها، نتایج مربوطه مورد استناد قرار نمی‌گیرد. در خصوص آنتی‌ژن رایت نتایج مطالعه به روش تسریع شده نشان داد که در این آنتی ژن، از نظر شکل فیزیکی، اسیدیته، جرم و فنل تغییری وجود نداشت نظر به اطلاعات بدست آمده از این مطالعه و تشابه نتایج آزمایشات این فرآورده می‌توان برای آنتی‌ژن رایت تولیدی موسسه رازی زمان انقضاء ۳ سال را در نظر گرفت.

نتایج ارزیابی آنتی‌ژن رینگ تست نشان داد که نمونه‌های مورد آزمایش از این فرآورده به ترتیب پس از ۴ سال از تاریخ تولید از نظر مشخصات فیزیکی و شیمیایی قابل قبول بودند. همچنین ارزیابی آن‌ها با آنتی‌سرم استاندارد نشان داد که پس از این مدت نتایج مطابق با شاخص‌های تعریف شده بین‌المللی یعنی جواب مثبت در ۲ واحد بین‌المللی آنتی‌سرم استاندارد و جواب منفی در ۱ واحد بین‌المللی آنتی‌سرم استاندارد می‌باشند. لذا به استناد یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که آنتی‌ژن رینگ تست تولیدی در موسسه رازی حداقل به مدت ۳ سال قابل استفاده می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی شماره مصوب پروژه :۹۲۱۱۷-۱۸-۱۸-۲ در موسسه رازی با نمره خوب به پایان رسیده است. بدینوسیله از مدیریت محترم موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی و پرسنل بخش بروسلوز و کنترل آنتی‌ژن‌های بروسلوز که همکاری مداوم داشتند تا این طرح به نتیجه عالی و کمک بزرگی به کشور اسلامی ایران انجام گیرد کما ل تشکر را دارم.

پیشنهادات

۱- با توجه به نتایج حاصله امکان در نظر گرفتن زمان انقضاء به مدت بیشتر از ۳ سال برای آنتی‌ژن‌های مذکور وجود دارد.

۲- جهت استفاده آسان‌تر از آنتی‌ژن رزبنگال پیشنهاد می‌گردد از بسته‌بندی به صورت قطره چکان استفاده گردد.

۳- به منظور افزایش صحت نتایج آزمایش رزبنگال پیشنهاد می‌گردد به همراه آنتی‌ژن سرم‌های کنترل مثبت و کنترل منفی قرار داده شود.

منابع مورد استفاده

۱ - ثمر، گیتی و همکاران، بروسلوز انسان و ویژگی‌های آن در ایران، چاپ اول، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۵-۱۳۶۹، ۷-۱۷-۸۹.

۲- ذوقی، اسماعیل، میکروبیولوژی بروسلاها، چاپ اول، سازمان تحقیات کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۳۶۹، ۲۴-۲۶-۲۸-۳۱-۱۵۲.

۳- ذوقی، اسماعیل و همکاران، زئونوزهای نوپدید و بازپدید، چاپ اول، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، ۱۳۸۳، ۲۵۳-۲۵۴-۲۵۵.

۴- ذوقی، اسماعیل و همکاران، تکنیک‌های آزمایشگاهی بروسلوز در دامپزشکی و پزشکی، چاپ اول، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج ۱۳۸۳، ۳۰۴-۲۹۳، ۲۱۵-۹۹.

۵- ذوقی، اسماعیل، خلاصه مقالات دومین همایش سراسری بروسلوز، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۱۳۸۶.
۶-صائبی، اسماعیل، بیماری‌های عفونی در ایران، بیماری‌های باکتریال، چاپ چهارم، نشر نینوا، ۱۳۶۹،۳۷۰-۳۷۱.
۷-بیماری تب مالت (Brucellosis) با تاکید بر جنبه‌های پزشکی و بهداشتی بیوتروریسم دکتر حسین حاتمی، دکتر هوشنگ ساغری.
8- Altone G.G. Laboratory Technique in Brucellosis. World Health Organization 1975.
9- Alton G.G, Lois M. 1967, Laboratory Techniques in Brucellosis. Word Health Organization .Geneva.
10- Pabuccuoglu O., Evaluation of serological tests for diagnosis of Brucellosis, Jpn. J. Infect. Dis 2011, 272-276 -64.
11-Serological diagnosis of Brucellosis, 2010. Nilson K., Yu WL boil. Med. Scip 65-89.
12- Stablefarth A.W, 1954. The international standard for Anti-*Brucella abotus* serum. Bull wld. hlth.org. 10, 927-935.
13- OIE manual 1992. Brucellosis in sheep, goats and swine (b23, 24, 52).
14- OIE terrestrial manual 2008. Bovine brucellosis, section 2.3, chapter 2.3.1.
15- OIE Terrestrial Manual 2009. Chapter 2.4.3. Bovine brucellosis.
16- OIE Terrestrial manual. Chapter 1.1.6- principal of veterinary vaccine production. 2012. P.
17-TRS 740.1986, Joint FAO/WHO expects committee on brucellosis. wld. hlth.org. Geneva.
18- Nilson K., Yu WL boil Serological diagnosis of Brucellosis 2010. Med. Scip 65-89 .
19-WHO Manual for the establishment of national and other secondary standards for vaccine, Stability, WHO/IVB.03.

جدول۱- مشخصات و کد آنتی‌ژن‌های رزبنگال

Batch. No	Code	PRO.DATE	EXP.DATE	Vol(mL)
۵۲/۸۳	A	۸۳	۸۴	۲۰
۱۵۶/۸۴	B	۸۴	۸۶/۷/۷	۲۰
۱۶۰/۸۵	C	۸۵	۸۷/۹/۷	۲۰
۱۶۱/۸۶	D	۸۶	۸۸/۳/۹	۲۰
۸۷۰۱۶۳	G	۸۷	۸۹/۷/۳	۲۰
۱۰۴۸۸۰۰۱	I	۸۸	۹۰/۷/۲۵	۲۰
۱۰۴۸۹۰۰۵	J	۸۹	۹۰/۱۲/۲۸	۵
۱۰۴۹۰۰۰۶	K	۹۰	۹۱/۱/۲۲	۵
۱۰۴۹۱۰۰۲	M	۹۱	۹۱/۱۱/۱	۵
۱۰۴۹۱۰۰۳	N	۹۱	۹۲/۴/۱	۵

جدول۲- مشخصات و کد آنتی‌ژن‌های سروآگلوتیناسیون رایت

Batch. No	Code	PRO.DATE	EXP.DATE	Vol(mL)
۸۴۰۲۵۲	A	۸۴	۸۶/۲/۱	۲۰
۸۴۱۱۵۳	B	۸۴	۸۶/۱۱/۲۳	۲۰
۵۴/۸۵	C	۸۵	۸۷/۱/۲۰	۲۰
۰۰۵۵/۸۶	D	۸۶	۸۸/۲/۲۵	۲۰
۸۷۰۰۵۶	E	۸۷	۸۸/۱۲/۲۶	۲۰
۱۰۵۸۸۰۵۵	F	۸۸	۸۹/۹/۲۳	۲۰
۱۰۵۹۰۰۰۱	G	۹۰	۹۱/۳/۲۸	۵
۱۰۵۹۱۰۰۱	H	۹۱	۹۲	۵

جدول۳- مشخصات و کد آنتی‌ژن‌های رینگ تست

Batch. No	Code	PRO.DATE	EXP.DATE	Vol(mL)
۱۰۶۸۹۰۰۱	A	۸۹	۹۰	۲۰
۱۰۶۹۰۰۰۱	B	۹۰	۹۱/۱/۲۰	۵
۱۰۶۹۱۰۰۱	C	۹۱	۹۲	۵

جدول ۴- قرائت نتایج آزمایش حلقه شیر

رنگ ستون	رنگ حلقه	نتیجه MRT
سفید	کاملا آبی	+++
آبی کم رنگ	کاملا آبی	++
کاملا آبی	آبی کم رنگ یا به رنگ ستون شیر	+
کاملا آبی	سفید	-

جدول۵- نتایج ارزیابی میزان فنل و جرم سلولی نمونه‌های آنتی‌ژن رزبنگال

Batch. No	Code	Phenol				PCV			
		۱R	۲R	۳R	۴R	۱R	۲R	۳R	۴R
۵۲/۸۳	A	۳,۶۷	۳,۶۵	۳,۶۴	۳,۶۷	۷,۱	۷,۱	۷,۱	۷,۱
۱۵۶/۸۴	B	۵,۸۷	۵,۸۸	۵,۸۳	۵,۸۶	۷,۷	۷,۷	۷,۷	۷,۷
۱۶۰/۸۵	C	۶,۶۵	۶,۶۱	۶,۶۳	۶,۶۵	۷,۹	۷,۹	۷,۹	۷,۹
۱۶۱/۸۶	D	۵,۹۰	۵,۹۱	۵,۹۰	۵,۹۲	۸,۳	۸,۳	۸,۳	۸,۳
۸۷۰۱۶۳	G	۴,۷۴	۴,۷۳	۴,۷۲	۴,۷۴	۷,۷	۷,۷	۷,۷	۷,۷
۱۰۴۸۸۰۰۱	I	۵,۸۳	۵,۸۰	۵,۸۲	۵,۸۱	۸	۸	۸	۸
۱۰۴۸۹۰۰۵	J	۵,۹۱	۵,۹۲	۵,۹۱	۵,۹۳	۸,۳	۸,۳	۸,۳	۸,۳
۱۰۴۹۰۰۰۶	K	۶,۱۳	۶,۱۹	۶,۱۲	۶,۱۵	۷,۹	۷,۹	۷,۹	۷,۹
۱۰۴۹۱۰۰۲	M	۵,۲	۵,۳	۵,۱	۵,۲	۷,۸	۷,۸	۷,۸	۷,۸
۱۰۴۹۱۰۰۳	N	۵,۵	۵,۳	۵,۱	۵,۳	۷,۸	۷,۸	۷,۸	۷,۸

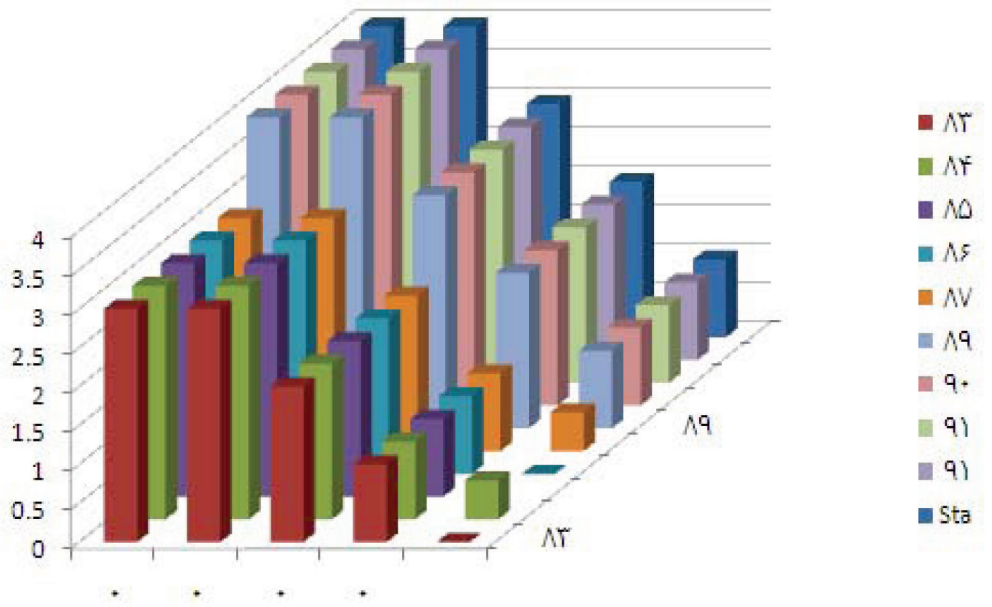
جدول۶- نتایج ارزیابی میزان اسیدیته و استریلیتی نمونه‌های آنتی‌ژن رزبنگال

Batch. No	Code	pH				STRILITY			
		R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
۵۲/۸۳	A	۳,۳۹	۳,۳۸	۳,۳۷	۳,۳۸	–	–	–	–
۱۵۶/۸۴	B	۳,۶۶	۳,۶۶	۳,۵۳	۳,۶۴	–	–	–	–
۱۶۰/۸۵	C	۳,۶۹	۳,۶۸	۳,۶۳	۳,۶۷	–	–	–	–
۱۶۱/۸۶	D	۳,۶۳	۳,۶۵	۳,۶۵	۳,۶۴	–	–	–	–
۸۷۰۱۶۳	G	۳,۶۵	۳,۶۶	۳,۶۵	۳,۶۶	OK	OK	OK	OK
۱۰۴۸۸۰۰۱	I	۳,۵۴	۳,۵۹	۳,۵۳	۳,۵۸	OK	OK	OK	OK
۱۰۴۸۹۰۰۵	J	۳,۶۳	۳,۶۲	۳,۶۵	۳,۶۲	OK	OK	OK	OK
۱۰۴۹۰۰۰۶	K	۳,۶۱	۳,۶۴	۳,۶۳	۳,۶۴	OK	OK	OK	OK
۱۰۴۹۱۰۰۲	M	۳,۶۳	۳,۶۱	۳,۶۱	۳,۶۲	OK	OK	OK	OK
۱۰۴۹۱۰۰۳	N	۳,۶۴	۳,۶۴	۳,۶۲	۳,۶۱	OK	OK	OK	OK

R۱: قرائت اول مربوط به نتایج آزمایشات سال ۱۳۹۰
R۲: قرائت دوم مربوط به نتایج آزمایشات سال ۱۳۹۱
R۳: قرائت سوم مربوط به نتایج آزمایشات سال ۱۳۹۲
R۴: قرائت سوم مربوط به نتایج آزمایشات سال ۱۳۹۳

جدول ۷- مقایسه میزان آگلوتیناسیون نمونه‌های آنتی‌ژن‌های رزبنگال مورد نظر و نمونه استاندارد با سرم‌های مثبت و منفی.

Batch. No	Code						Neg.serum
۵۲/۸۳	A	+۳	+۳	+۲	+۱	_	_
۱۵۶/۸۴	B	+۳	+۳	+۲	+۱	±	_
۱۶۰/۸۵	C	+۳	+۳	+۲	+۱	_	_
۱۶۱/۸۶	D	+۳	+۳	+۲	+۱	_	_
۸۷۰۱۶۳	G	+۳	+۳	+۲	+۱	±	_
۱۰۴۸۸۰۰۱	I	+۳	+۳	+۲	+۱	+۱	_
۱۰۴۸۹۰۰۵	J	+۴	+۴	+۳	+۲	+۱	_
۱۰۴۹۰۰۰۶	K	+۴	+۴	+۳	+۲	+۱	_
۱۰۴۹۱۰۰۲	M	+۴	+۴	+۳	+۲	+۱	_
۱۰۴۹۱۰۰۳	N	+۴	+۴	+۳	+۲	+۱	_
ST	ST	+۴	+۴	+۳	+۲	+۱	_



نمودار۱- مقایسه میزان آگلوتیناسیون نمونه‌های آنتی‌ژن رزبنگال با ۵ سرم مثبت نسبت به آنتی‌ژن استاندارد

جدول۸- نتایج ارزیابی میزان فنل و جرم سلولی نمونه‌های آنتی‌ژن سروآگلوتیناسیون رایت

Batch. No	Code	Phenol				PCV			
		R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
۸۴۱۱۵۳	A	۴,۴	۳,۶۵	۳,۱	۲,۲۱	۸,۲	۸,۱	۸,۲	۸,۲
۵۴/۸۵	B	۵,۸۷	۵,۸۸	۵,۸۳	۵,۸۶	۵,۲	۵,۱	۵,۲	۵,۱
۰۰۵۵/۸۶	C	۵,۹۸	۵,۸۲	۵,۷	۵,۹۸	۴,۳	۴,۴	۴,۱	۴,۴
۸۷۰۰۵۶	D	۴,۵	۴,۶	۴,۲	۳,۶۲	۴,۴	۴,۴	۴,۴	۴,۴
۱۰۵۸۸۰۵۵	E	۴,۷۴	۴	۳	۲,۱۹	۲,۱	۲,۲	۲,۱	۲,۱
۱۰۵۹۰۰۰۱	F	۴,۷	۴,۸	۴,۶	۴,۳۸	۲,۵	۲,۶	۲,۵	۲,۵
۱۰۵۹۱۰۰۱	G	۵,۱	۵	۵,۱	۴,۸۲	۳,۲	۳,۱	۳,۲	۳,۲
standard	H	۵	۴,۹	۴,۸	۴,۹	۴	۴,۱	۴	۴

شکل ۱- میزان آگلوتیناسیون با سرم‌های مثبت و منفی آنتی‌ژن‌های رزبنگال

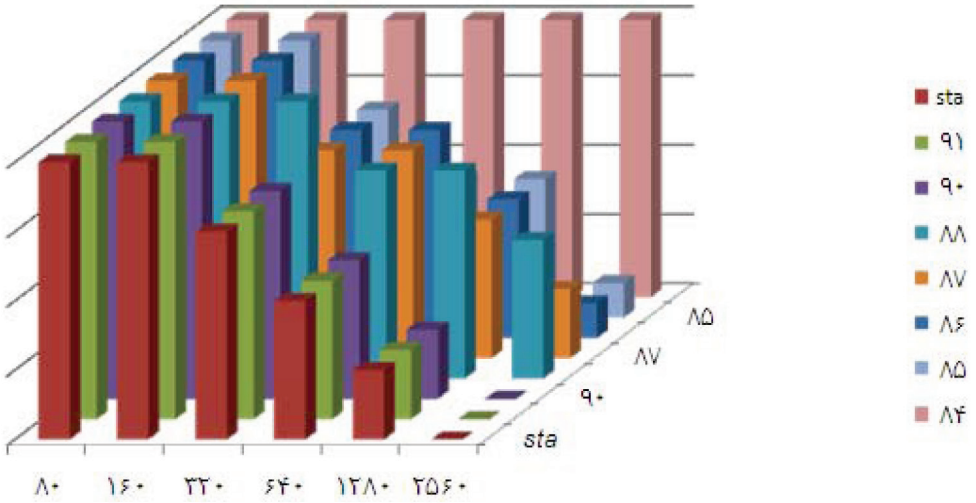
جدول۹- نتایج ارزیابی میزان اسیدیته و استریلیتی نمونه‌های آنتی‌ژن سروآگلوتیناسیون رایت

Batch. No	Code	pH				Sterility test			
		R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
۸۴۱۱۵۳	A	۷,۲	۷,۳	۷,۱	۷,۴	-	-	-	-
۵۴/۸۵	B	۵,۸۷	۵,۸۸	۵,۸۳	۵,۸۶	_	_	_	_
۰۰۵۵/۸۶	C	۷۱	۷,۳	۷,۲	۷,۱	_	_	_	_
۸۷۰۰۵۶	D	۶,۶۷	۶,۶۵	۶,۶۷	۶,۶۴	-	-	-	-
۱۰۵۸۸۰۵۵	E	۷,۴	۴	۳	۲,۱۹	OK	OK	OK	OK
۱۰۵۹۰۰۰۱	F	۷,۱	۷,۲	۷	۷,۲	OK	OK	OK	OK
۱۰۵۹۱۰۰۱	G	۷,۱	۷,۲	۷,۱	۷,۲	OK	OK	OK	OK
standard	H	۷,۱	۷,۲	۷,۱	۷,۲	OK	OK	OK	OK

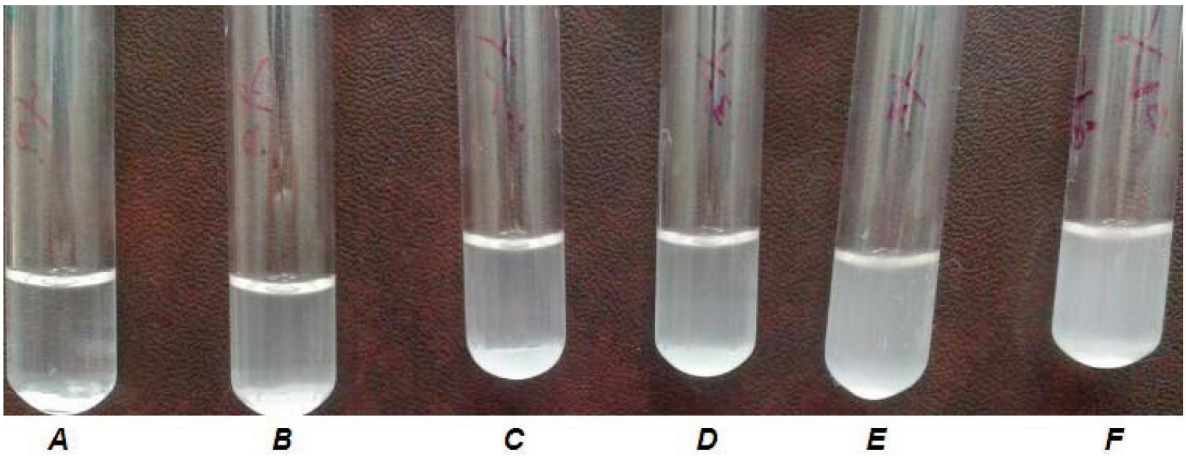
R۱: قرائت اول مربوط به نتایج آزمایشات سال ۱۳۹۰
R۲: قرائت دوم مربوط به نتایج آزمایشات سال ۱۳۹۱
R۳: قرائت سوم مربوط به نتایج آزمایشات سال ۱۳۹۲
R۴: قرائت سوم مربوط به نتایج آزمایشات سال ۱۳۹۳

جدول ۱۰ - تیتراسیون آنتی‌ژن‌های سروآگلوتیناسیون رایت در مقابل آنتی‌سرم استاندارد بین‌المللی

Batch. No	۸۰/۱	۱۶۰/۱	۳۲۰/۱	۶۴۰/۱	۱۲۸۰/۱	۲۵۶۰/۱
۸۴۱۱۵۳	+۴	+۴	+۴	+۴	+۴	+۴
۵۴/۸۵	+۴	+۴	+۳	+۲	+۲	۰,۵
۰۰۵۵/۸۶	+۴	+۴	+۳	+۳	+۲	۰,۵
۸۷۰۰۵۶	+۴	+۴	+۳	+۳	+۲	۱
۱۰۵۸۸۰۵۵	+۴	+۴	+۴	+۳	+۳	۲
۱۰۵۹۰۰۰۱	+۴	+۴	+۳	+۲	+۱	۰
۱۰۵۹۱۰۰۱	+۴	+۴	+۳	+۲	+۱	۰
standard	+۴	+۴	+۳	+۲	+۱	۰



نمودار۲- تیتراسیون آنتی‌ژن‌های سروآگلوتیناسیون رایت در مقابل آنتی‌سرم استاندارد بین‌المللی



A: رقت ۱/۰۰۴ نتیجه ۴+
B: رقت ۱/۰۰۵ نتیجه ۴+
C: رقت ۱/۰۰۶ نتیجه ۳+
D: رقت ۱/۰۴۶ نتیجه ۲+
E: رقت ۱/۰۰۷ نتیجه ۱+
F: رقت ۱/۰۰۸ نتیجه -

شکل ۲ - میزان آگلوتیناسیون آنتی‌ژن رایت با سرم استاندارد بین‌المللی

جدول۱۱- نتایج ارزیابی میزان فنل و جرم سلولی نمونه‌های آنتی‌ژن سروآگلوتیناسیون رایت

Batch. No	Code	Phenol				PCV			
		R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
۱۰۶۸۹۰۰۱	A	۵	۴,۹	۴,۹	۴,۹	۴	۴,۱	۴	۴
۱۰۶۹۰۰۰۱	B	۴,۸۷	۴,۸۸	۵	۴,۸۹	۳,۸	۳,۹	۳,۹	۳,۸
۱۰۶۹۱۰۰۱	C	۴,۹	۴,۹	۵	۴,۹	۴	۳,۹	۴	۳,۸

R۱: قرائت اول مربوط به نتایج آزمایشات سال ۱۳۹۰
R۲: قرائت دوم مربوط به نتایج آزمایشات سال ۱۳۹۱
R۳: قرائت سوم مربوط به نتایج آزمایشات سال ۱۳۹۲
R۴: قرائت سوم مربوط به نتایج آزمایشات سال ۱۳۹۳

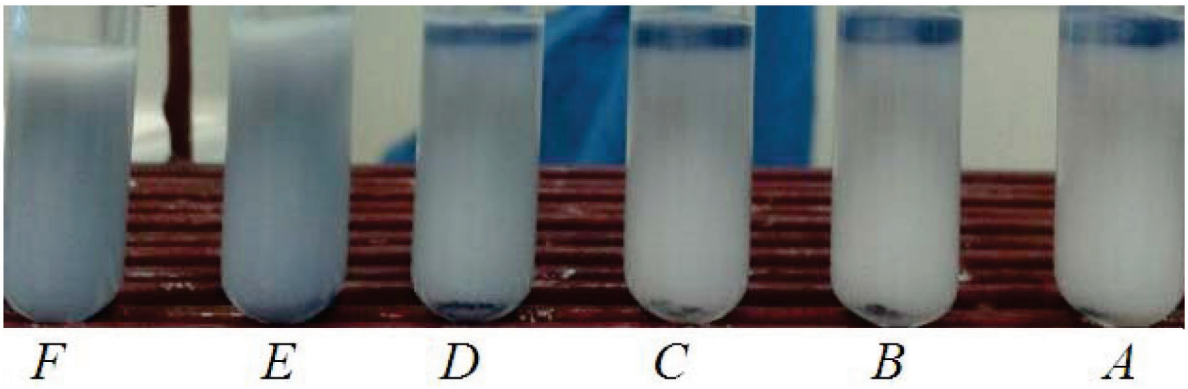
جدول۱۲- نتایج ارزیابی میزان اسیدیته و استریلیتی نمونه‌های آنتی ژن رینگ تست

Batch. No	Code	pH				STRILITY			
		R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
۱۰۶۸۹۰۰۱	A	۹ .۳	۸ .۳	۷ .۳	۸ .۳	OK	OK	OK	OK
۱۰۶۹۰۰۰۱	B	۴	۳,۹	۳,۹	۳,۸۷	OK	OK	OK	OK
۱۰۶۹۱۰۰۱	C	۳,۹	۴,۱	۴	۳,۹	OK	OK	OK	OK

R۱: قرائت اول مربوط به نتایج آزمایشات سال ۱۳۹۰
R۲: قرائت دوم مربوط به نتایج آزمایشات سال ۱۳۹۱
R۳: قرائت سوم مربوط به نتایج آزمایشات سال ۱۳۹۲
R۴: قرائت سوم مربوط به نتایج آزمایشات سال ۱۳۹۳

جدول۱۳- تیتراسیون آنتی‌ژن‌های حلقه شیر در مقابل آنتی‌سرم استاندارد بین‌المللی

DILUTION=International Unit	۵/۱	۱۰/۱	۲۰/۱	۵۰/۱	۱۰۰/۱
Batch. No	۲۰ IU	۱۰ IU	۵ IU	۲ IU	۱ IU
۱۰۶۸۹۰۰۱	+	+	+	+	-
۱۰۶۹۰۰۰۱	+	+	+	+	-
۱۰۶۹۱۰۰۱	+	+	+	+	-



لوله A: ۰۲ واحد بین المللی سرم استاندارد بین المللی
لوله B: ۰۱ واحد بین المللی سرم استاندارد بین المللی
لوله C: ۵ واحد بین المللی سرم استاندارد بین المللی
لوله D: ۲ واحد بین المللی سرم استاندارد بین المللی
لوله E: ۱ واحد بین المللی سرم استاندارد بین المللی
لوله F: کنترل منفی

شکل۳- تیتراسیون آنتی‌ژن حلقه شیر با آنتی‌سرم استاندارد بین‌المللی