DOI: 10.22092/vj.2017.109881
شماره ۱۱۶ پاییز ۱۳۹۶
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

مطالعه پایداری واکسن بروسلوز سویه Rev.1 با دز کاهیده تولید شده در موسسه رازی

• **سجاد دوستداری (نویسنده مسئول)**
بخش کنترل کیفی واکسن‌های باکتریایی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
• **سید ابراهیم حسن نیا**
بخش کنترل کیفی واکسن‌های باکتریایی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
• **ابوالفضل خفری**
بخش کنترل کیفی واکسن‌های باکتریایی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
• **آناهیتا عمادی**
بخش کنترل کیفی واکسن‌های باکتریایی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
• **رامین باقری‌نژاد**
بخش تولید واکسن بروسلوز موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
• **سعید عالمیان**
بخش تولید واکسن بروسلوز موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
• **شیرین دخت باقری**
بخش کنترل کیفی و فیزیکوشیمیایی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت:۰۹-۰۶-۱۳۹۵ تاریخ پذیرش:۱۰-۰۸-۱۳۹۵

Email: sajad.dostdari@yahoo.com

چکیده

مطالعات پایداری فرآورده‌های بیولوژیک نقش مهمی در تعیین تغییرات فرآورده در طول مدت زمان نگهداری و همچنین اطمینان از بی‌ضرری و اثر بخشی واکسن‌ها دارد. در این پژوهش پایداري طولاني مدت واکسن بروسلوز سویه Rev.1 با دز کاهیده تولید شده در موسسه رازي مورد بررسي قرار گرفت. نمونه‌برداري طبق رفرانس OIE ۲۰۱۵ بصورت تصادفي انجام شد، نمونه‌ها پس از نگهداری در دماي ۸-۲ درجه سانتي‌گراد و شرایط بسته‌بندي طبق بروشور واکسن به مدت ۱۱ ماه، به فاصله زمانی یك ماه برای پایداری Real time مورد آزمایش قرار گرفت. در این مطالعه تمامي آزمایش‌هاي کنترل کیفي و آزمایش‌هاي فیزیکوشیمیایي براي بررسي پایداري Real time این واکسن براي هر ۳ بچ متوالی تا ۱۱ ماه پس از تولید انجام شد، براي تجزیه و تحلیل اطلاعات از میانه، میانگین، واریانس، همبستگي و رگرسیون خطي استفاده شد. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که کلیه بچ‌هاي مورد مطالعه، پایداري را به مدت۱۰ ماه منطبق با الزامات (OIE۲۰۱۵) دارا مي‌باشند. اگر در شرایطي که تمامي الزامات مربوط به نگهداري واکسن از جمله شرایط زنجیره سرد رعایت شود این واکسن مي‌تواند تا مدت ۱۰ ماه پایداري داشته باشد. لذا طبق الزامات ۲۰۱۵، OIE BP ۲۰۱۵ تاریخ انقضاء این واکسن را از۴ ماه به ۷ ماه می‌توان افزایش داد.

کلمات کلیدي: پایداري، بروسلوز، واکسن Rev.1

● Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 26-33

Stability Study of Rev1 Reduced dose Brucellosis Vaccine Produced by Razi Institute in Iran

By: Dostdari S., Dept. of Bacterial Vaccines Quality Control, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran; Hassannya E., Dept. of Bacterial Vaccines Quality Control, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran; Khafri A., Dept. of Bacterial Vaccines Quality Control, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran; Emadi A., Dept. of Bacterial Vaccines Quality Control, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran; Bagherinejad A., Dept. of Brucella Vaccine Production, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran; Alamyan S., Dept. of Brucella Vaccine Production, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran; Bagheri Sh., Dept. of Physicochemistry, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Received: 2016-08-30 Accepted: 2016-10-31

Email: sajad.dostdari@yahoo.com

Stability study of biological products plays an important role for determination of product changes in maintenance period and ensuring of safety and efficacy of vaccines. In this study longterm stability reduced-dose Rev.1 strain brucellosis vaccin that manufactured by Razi vaccine and serum research institute was evaluated. Sampling was conducted in accordance with references OIE 2015, and the samples after storage at 8-2 ° C and packaging conditions for 11 months, according to the vaccine package insert an interval of one month was tested for stability Real time. In this study, all tests quality control and physicochemical tests for evaluate the stability the vaccine for every 3 batches to 11 months after production was performed.For analyzing information from median, mean, variance, correlation and linear regression were used. The results of the study showed that all batches of studied, stable for 10 months in accordance with the requirements OIE 2015. If the conditions that all the requirements related to the preservation of vaccine including cold chain conditions should be observed. The vaccine can be stable for 10 months. Therefore, in accordance with the requirements OIE 2015, BP 2015 the expiration date of the vaccine can be increased from 4 months to 7 months.

Key words: Stability, 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 (۴). عامل اين بيماري كوكوباسيل گرم منفي داخل سلولي اختياري است (۳)، اين جنس به ۶ گونه كلاسيک بروسلا سوئيس، بروسلا آبورتوس، بروسلا نئوتومه، بروسلا اويس، بروسلا كانيس و بروسلا بويس تقسيم مي‌شود (۷). در ميان اعضاي جنس بروسلا ۹۴ درصد قرابت ژنتيكي وجود دارد (۲). بيماری بروسلوز در گونه‌هاي مختلف گوسفند گزارش شده است (۱۵). واكسيناسيون گوسفندها از مهم‌ترين راهكارهاي پيشگيري از اين بيماري در اين گونه ميزبان باشد و واكسن Rev.1 از جمله بهترين و با ارزش‌ترين واكسن‌هاي موجود براي پيشگيري و كنترل بروسلوز گوسفند و بز مي‌باشد كه توسط سازمان‌هاي معتبر بين‌المللي از جمله WHO و OIE و FAO به رسميت شناخته شده است (۱۴،۱۳،۱۲،۱۱). موثر بودن اين واكسن توسط محققين كشور و با همكاري سازمان بهداشت جهاني در شرايط اقليمي ايران بر روي نژادهاي گوسفند و بز ايراني به اثبات رسيده است، بطوري‌كه از سال ۱۳۴۱ كه توليد واكسن و واكسيناسيون Rev.1 در كشور آغاز شده، ميزان شيوع بيماري از ميزان ۴۵ درصد به ۱،۸ درصد تقليل يافته است (۶). طبق الزامات سازمان دامپزشکی به عنوان ناظر ملی و صادرکننده مجوز توليد واكسن‌های دامپزشکی، قبل از توليد صنعتی واكسن بايستی تازيخ انقضاء توسط توليدكننده تعيين و توسط سازمان دامپزشکی تاييد گردد از اين جهت موسسه رازی مكلف است تاريخ انقضاء محصولات خود را قبل از توليد صنعتی مشخص كند و از طرف ديگر طبق منابع رسمي WHO پايداري واكسن Rev.1 يكسال مي‌باشد در حالي‌كه تاريخ انقضاء واكسن‌هاي توليدي Rev.1 موسسه رازي چهار ماه است، لذا افزايش زمان پايداري واكسن مي‌تواند بسياري از مشكلات بخش توليد را حل كند و درخواست سازمان دامپزشكي كه افزايش مدت نگهداري واكسن است را پاسخ مثبت دهد (۱)، به همين جهت در اين مطالعه، پايداري واكسن بروسلوز سويه Rev.1 با دز كاهيده به عنوان يك واكسن جديد مورد بررسي قرار گرفت تا با استفاده از نتايج حاصل از اين مطالعه، تاريخ انقضاء اين واكسن را در صورت داشتن استانداردهاي ارائه شده توسط رفرانس‌هاي بين‌المللي افزايش داد.

مواد و روش کار

در اين تحقيق پايداری Real time برای ۳ بچ متوالی از واكسن‌های بروسلوز سويه Rev.1 با دز كاهيده ساخته شده در موسسه رازی به عنوان يک واكسن جديد برای پيشگيری از بروسلوز گوسفندي در ايران مورد بررسي قرار گرفت. نمونه‌برداری از هر بچ طبق رفرانس OIE ۲۰۱۵ به صورت تصادفي انجام شد، و نمونه‌ها پس از نگهداری در دماي ۸-۲

درجه سانتي‌گراد و شرايط بسته‌بندي طبق بروشور واکسن به مدت۱۱ ماه به فاصله زمانی يك ماه برای پایداری Real time مورد آزمايش قرار گرفت در اين مطالعه تمامي آزمايش‌هاي کنترل کيفي شامل Viable germ, Identity, Purity, Dissociation (Roughness) و آزمايش‌هاي فيزيکو شيميايي Appearance, Airtight ness, Moisture content, Solubility, Vacuum test براي بررسي پايداري Real time اين واکسن براي هر ۳ بچ تا ۱۱ ماه پس از توليد انجام شد، براي تجزيه و تحليل اطلاعات از ميانه، ميانگين، واريانس، دامنه تغييرات، همبستگي و رگرسيون خطي استفاده شد.

Viable germ test: براي انجام اين آزمايش از محيط کشت بروسلا آگار ساخت کمپاني مرك آلمان استفاده شد، به اين صورت که هر ماه از نمونه آماري مورد نظر ۳ ويال انتخاب شده و از آن‌ها رقت سريالي تهيه شد و رقت‌هاي 10^{-7} و 10^{-8}در محيط کشت بروسلا آگار به صورت جداگانه و چمنی در ۵ پليت کشت داده شد و بعد از ۶ روز تعداد کلنی‌های هر رقت شمارش شده و ميانگين آن‌ها قرائت شد. ميانگين تعداد باکتري موجود در هر دز واکسن بايد بين (CFU/dose) 3×10^{6} - ۰/۵ باشد (۸).

Dissociation test: براي انجام اين آزمايش از رنگ کريستال ويوله و محيط کشت بروسلا آگار استفاده شده در آزمايش Viable germ استفاده شد، بعد از قرائت شمارش کلني، پرکنه‌هاي بروسلوز به وسيله رنگ کريستال ويوله براي تشخيص صاف يا خشن بودن باکتري مورد بررسي قرار گرفت، پرکنه صاف رنگ کريستال ويوله را به خود نمي‌گيرند و سفيد متمايل به زرد (کرم) مي‌مانند و پراکنه‌هاي خشن رنگ کريستال ويوله را به خود مي‌گيرند و آبي مي‌شوند. تعداد باکتري‌هاي که رنگ کريستال ويوله را به خود نمي‌گيرند و صاف هستند بايد بيشتر يا مساوی ۹۵ درصد باشند (۸).

Identity test: براي انجام اين تست از محيط کشت بروسلا آگار حاوي پني سيلين و استرپتومايسين استفاده شد، به اين صورت که از واکسن بروسلوز سويه Rev.1 سوسپانسيون تهيه شد و داخل پليت‌هاي بروسلا آگار حاوي پني‌سيلين و استرپتومايسن بصورت چمني کشت داده شد، نتايج آزمايش بعد از ۵ روز قرائت شد پراکنه‌هاي بروسلوز سويه Rev.1 در محيط کشت پني‌سيلين نبايد رشد کند و در محيط کشت حاوي استرپتومايسين بايد رشد کند (۸).

Purity test: براي انجام اين آزمايش از محيط کشت بروسلا آگار و بلاد آگار ساخت کمپاني مرك آلمان استفاده شد، به اين صورت که ۱ ميلي‌ليتر PBS استريل به هر کدام از ويال‌هاي واکسن مورد نظر اضافه شد و بعد از ورتکس کردن تمام محتويات هر ويال بر روي محيط کشت بروسلا آگار و بلاد آگار بصورت چمني کشت داده شد، تمام نمونه‌ها در طي دوره مطالعه بايد عاري از هر گونه آلودگي باکتريائی و قارچي باشند (۸).

Vacuum test: وجود خلاء با استفاده از يك سرنگ ۵ml حاوي ۵ml آب مقطر مورد بررسي قرار مي‌گيرد، ويال واکسن بايد داري خلاء و مکش آب مقطر به داخل ويال باشد.

Appearance test: شکل ظاهري ويال واکسن و محتويات داخل آن بصورت چشمي مورد بررسي قرار گرفت. محتويات داخل ويال بايد بصورت قرص سفيد متمايل به زرد باشد.

جدول ۱- اطلاعات مربوط به بررسی مقدار رطوبت در دوره های زمانی مختلف (از بدو تولید تا ۱۱ ماه)

شماره واکسن	مقدار استاندارد	بدو تولید	۱ ماه	۲ ماه	۳ ماه	۴ ماه	۵ ماه	۶ ماه	۷ ماه	۸ ماه	۹ ماه	۱۰ ماه	۱۱ ماه
۱	≤ W /V ٪ ۴	٪ ۱/۹	٪ ۱/۷۵	٪ ۱/۵۲	٪ ۱/۶	٪ ۲/۳۴	٪ ۲/۳۶	٪ ۱/۹۹	٪ ۱/۹۷	٪ ۱/۶۹	٪۲	٪ ۲/۱	٪ ۱/۸۷
۲	≤ W /V ٪ ۴	٪ ۲/۵	٪ ۱/۵۹	٪ ۱/۵۲	٪ ۲	٪ ۲/۴۶	٪ ۲/۱۱	٪ ۱/۵۳	٪ ۱/۹۸	٪ ۱/۸۸	٪ ۲	٪ ۲/۱۶	٪ ۲/۵۸
۳	≤ W /V ٪ ۴	٪ ۲/۵	٪ ۲/۵۳	٪ ۲/۱۲	٪ ۲/۹	٪ ۲/۲	٪ ۲/۵۸	٪ ۳/۲۸	٪ ۲/۲	٪ ۲/۰۶	٪ ۱/۲۵	٪ ۲/۲۱	٪ ۲/۴۱

جدول ۲. محاسبه همبستگی بین پایداری و مقدار رطوبت واکسن

شماره بچ واکسن	ضریب تعیین	ضریب همبستگی مشاهده شده	ضریب همبستگی (N=۱۱)	تعداد	سطح معناداری	میانگین	میانه	واریانس
۱	۰/۰۶۰	۰/۲۴۶	۰/۶۸۴	۱۱	۰/۰۱	۱/۹۲	۱/۹۳	۰/۰۶
۲	۰/۰۵۴	۰/۲۳۲	۰/۶۸۴	۱۱	۰/۰۱	۲/۰۲	۲	۰/۱۳
۳	۰/۱۷۵	۰/۴۱۹	۰/۶۸۴	۱۱	۰/۰۱	۲/۳۸	۲/۴۵	۰/۲۴

Solubility test: سوسپاسیون تهیه شده از واکسن بصورت چشمي مورد برسي قرار گرفت، مواد غير محلول نبايد در سوسپانسيون واكسن وجود داشته باشد.

Moisture content test: براي اندازه‌گيري رطوبت از دستگاه كارال فيشر گلومتريك استفاده شد، اين دستگاه رطوبت موجود در ويال واكسن را به كمك محلول كارل فيشر اندازه‌گيري مي‌كند، در اين روش به طور مستقيم توسط الكترود مولد توليد و پس از واكنش با آب نقطه پاياني توسط الكترود دابل – پلاتيني به طريق ولتامتري شناسايي و ميزان آب فرآورده بر حسب PPM گزارش و محاسبه شد. (۱۰).

نتایج

نتايج حاصل از پژوهش به كمك آمار توصيفي شامل جدول، نمودار، ميانه، ميانگين، واريانس و دامنه تغييرات و آمار استنباطي شامل همبستگي و رگرسيون خطي مورد تجزيه و تحليل قرار گرفت.

میانگین رطوبت برای ۳ بچ واکسن انتخاب شده به عنوان نمونه آماری در طول مدت ۱۱ ماه که واکسن دارای پایداری است برابر با ۱,۹۲، ۲,۰۲، ۲,۳۸ درصد است. در ماه یازدهم نیز میزان رطوبت واکسن در رنج استاندارد ارائه شده توسط OIE ۲۰۱۵ است. لذا در طول مدت مطالعه رطوبت واکسن مذکور در محدوده استاندارد ارائه شده قرار دارد.

با توجه به جدول۲، ضریب همبستگی خطی بین مدت زمان پایداری و رطوبت موجود در واکسن برای بچ اول برابر با r=۰/۲۴۶ می‌باشد، چون r محاسبه شده (۰/۲۴۶) کوچکتر از ضریب همبستگی (N=۱۱) در سطح معناداری ۱ درصد است، در نتیجه با ۹۹ درصد اطمینان بین مدت زمان پایداری و رطوبت موجود در واکسن برای بچ اول ارتباط معناداری وجود ندارد.

با توجه به جدول۲، ضریب همبستگی خطی بین مدت زمان پایداری و رطوبت موجود در واکسن برای بچ دوم برابر با r=۰/۲۳۲ می‌باشد، چون r محاسبه شده (۰/۲۳۲) کوچکتر از ضریب همبستگی (N=۱۱) در سطح معناداری ۱ درصد است، در نتیجه با ۹۹ درصد اطمینان بین مدت زمان پایداری و رطوبت موجود در واکسن برای بچ دوم ارتباط معناداری وجود ندارد.

با توجه به جدول۲، ضریب همبستگی خطی بین مدت زمان پایداری و رطوبت موجود در واکسن برای بچ سوم برابر با r=۰/۴۱۹ می‌باشد، چون r محاسبه شده (۰/۴۱۹) کوچکتر از ضریب همبستگی (N=۱۱) در سطح معناداری ۱ درصد است، در نتیجه با ۹۹ درصد اطمینان بین مدت زمان پایداری و رطوبت موجود در واکسن برای بچ سوم ارتباط معناداری وجود ندارد.

میانگین باکتری زنده برای ۳ بچ واکسن انتخاب شده به عنوان نمونه آماری در طول مدت ۱۱ ماه که واکسن دارای پایداری است برابر است با ۱,۴۷× ۱۰^۶ cfu/dose، ۱,۵۱، ۱,۱۳، در ماه یازدهم میزان جرم زنده واکسن پایین‌تر از استاندارد ارائه شده توسط OIE ۲۰۱۵ است. لذا مدت زمان پایداری واکسن ۱۰ ماه است.

با توجه به جدول۴، ضریب همبستگی خطی بین مدت زمان پایداری و مقدار جرم زنده واکسن برای بچ اول برابر با r= -۰/۸۹۷ می‌باشد، چون r محاسبه شده (۰/۸۹۷) بزرگتر از ضریب همبستگی (N=۱۱) در سطح

جدول ۳- اطلاعات مربوط به بررسی مقدار باکتری زنده در دوره های زمانی مختلف (از بدو تولید تا ۱۱ ماه)

شماره واکسن	مقدار استاندارد	بدو تولید	۱ ماه	۲ ماه	۳ ماه	۴ ماه	۵ماه	۶ ماه	۷ ماه	۸ ماه	۹ ماه	۱۰ ماه	۱۱ ماه
۱	۰/۵ -۳ ×۱۰^۶ cfu/dose	۳ ×۱۰^۶	۲/۵۲ ×۱۰^۶	۲/۹ ×۱۰^۶	۱/ ۶۹ ×۱۰^۶	۱/۲۵ ×۱۰^۶	۰/۹ ×۱۰^۶	۱/۲۷ ×۱۰^۶	۱/۰۴ ×۱۰^۶	۱/۲۶ ×۱۰^۶	۰/۸۷ ×۱۰^۶	۰/۵۷ ×۱۰^۶	۰/۴۷ ×۱۰^۶
۲	۰/۵ -۳ ×۱۰^۶ cfu/dose	۲/۴۵ ×۱۰^۶	۲/۱ ×۱۰^۶	۲/۲۲ ×۱۰^۶	۱/۸۶ ×۱۰^۶	۱/۵۴ ×۱۰^۶	۱/۷۷ ×۱۰^۶	۱/۷۵ ×۱۰^۶	۱/۱۴ ×۱۰^۶	۱/۳۱ ×۱۰^۶	۰/۸۹ ×۱۰^۶	۰/۶۶ ×۱۰^۶	۰/۴۹ ×۱۰^۶
۳	۰/۵ -۳ ×۱۰^۶ cfu/dose	۲/۱۴ ×۱۰^۶	۱/۹۸ ×۱۰^۶	۲/۰۴ ×۱۰^۶	۱/۱ ×۱۰^۶	۱/۱۴ ×۱۰^۶	۰/ ۹۴ ×۱۰^۶	۰/۸۷ ×۱۰^۶	۱/۰۳ ×۱۰^۶	۰/۷۵ ×۱۰^۶	۰/۸۷ ×۱۰^۶	۰/۵۳ ×۱۰^۶	۰/۲۸ ×۱۰^۶

معناداری ۱ درصد است، در نتیجه با ۹۹ درصد اطمینان بین مدت زمان پایداری و رطوبت موجود در واکسن برای بچ اول ارتباط معناداری وجود دارد.

با توجه به جدول۴، ضریب همبستگی خطی بین مدت زمان پایداری و مقدار جرم زنده واکسن برای بچ دوم برابر با r= -۰/۹۶۲ می‌باشد، چون r محاسبه شده (۰/۹۶۲) بزرگتر از ضریب همبستگی (N=۱۱) در سطح معناداری ۱ درصد است، در نتیجه با ۹۹ درصد اطمینان بین مدت زمان پایداری و رطوبت موجود در واکسن برای بچ دوم ارتباط معناداری وجود دارد.

با توجه به جدول۴، ضریب همبستگی خطی بین مدت زمان پایداری و مقدار جرم زنده واکسن برای بچ سوم برابر با r= -۰/۹۱۹ می‌باشد، چون r محاسبه شده (۰/۹۱۹) بزرگتر از ضریب همبستگی (N=۱۱) در سطح معناداری ۱ درصد است، در نتیجه با ۹۹ درصد اطمینان بین مدت زمان پایداری و رطوبت موجود در واکسن برای بچ سوم ارتباط معناداری وجود دارد.

با توجه به جدول ۵، نتایج حاصل از رگرسیون بین مدت زمان پایداری و رطوبت واکسن برای بچ اول p = ۰/۴۳۰ را نشان می‌دهد که در سطح معناداری ۱ درصد ارتباط معناداری بین دو متغیر مذکور وجود ندارد در نتیجه به احتمال ۹۹ درصد نمی‌توان میزان پایداری را از روی رطوبت واکسن برای بچ اول پیش بینی کرد.

با توجه به جدول ۵، نتایج حاصل از رگرسیون بین مدت زمان پایداری و رطوبت واکسن برای بچ دوم p = ۰/۰۸۹ را نشان می‌دهد که در سطح

جدول ۴. محاسبه همبستگی بین پایداری و مقدار جرم زنده واکسن

شماره بچ واکسن	ضریب تعیین	ضریب همبستگی مشاهده شده	ضریب همبستگی (N=۱۱)	تعداد	سطح معناداری	میانگین	میانه	واریانس
۱	۰/۸۰۵	- ۰/۸۹۷	۰/۶۸۴	۱۱	۰/۰۱	۱/۴۷	۱/۲۵	۰/۷۵
۲	۰/۹۲۷	-۰/۹۶۲	۰/۶۸۴	۱۱	۰/۰۱	۱/۵۱	۱/۶۴	۰/۳۹
۳	۰/۸۴۴	- ۰/۹۱۹	۰/۶۸۴	۱۱	۰/۰۱	۱/۱۳	۰/۹۸۵	۰/۳۶

جدول ۵- نتایج رگرسیون مربوط به مقدار رطوبت و مدت زمان پایداری واکسن

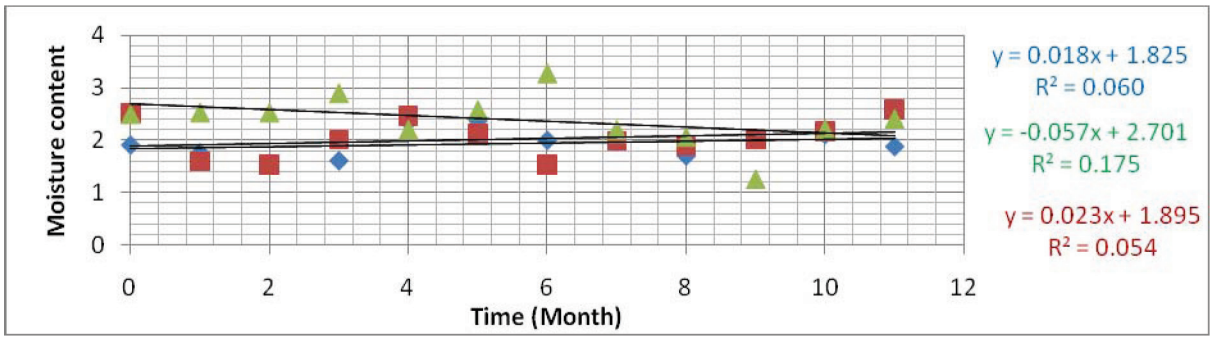
شماره بچ واکسن	ضریب رگرسیون چندگانه	ضریب رگرسیون تعدیل شده	خطای استاندارد	سطح معناداری	Significance
۱	۰/۲۶۵	۰/۰۳۲	۳/۳۷۰	۰/۰۱	۰/۴۳۰
۲	۰/۵۳۵	۰/۲۰۷	۲/۹۵۲	۰/۰۱	۰/۰۸۹
۳	۰/۴۳۹	۰/۱۰۳	۳/۱۴۰	۰/۰۱	۰/۱۷۶

جدول ۶ - نتایج رگرسیون مربوط به میزان جرم زنده واکسن و مدت زمان پایداری واکسن

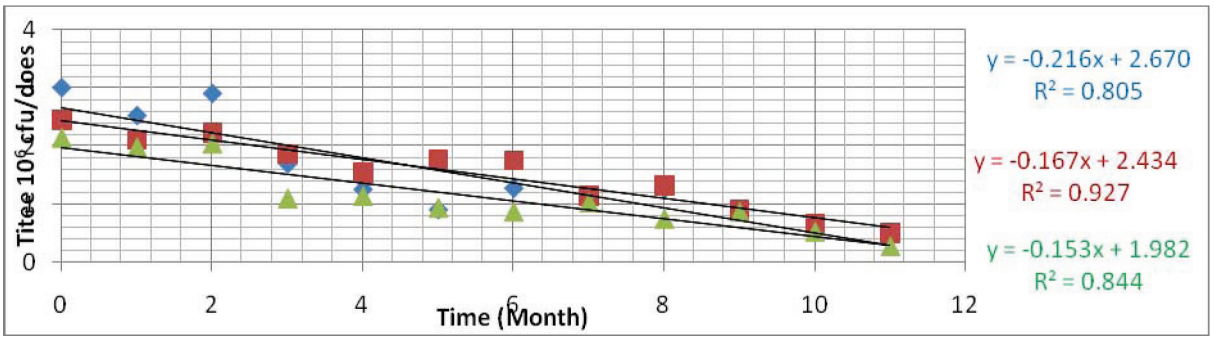
شماره بچ واکسن	ضریب رگرسیون چندگانه	ضریب رگرسیون تعدیل شده	خطای استاندارد	سطح معناداری	Significance
۱	۰/۸۶۴	۰/۷۱۸	۱/۷۵۹	۰/۰۱	۰/۰۰۰۶
۲	۰/۹۵۲	۰/۸۹۶	۱/۰۶۸	۰/۰۱	۰/۰۰۰۰
۳	۰/۸۹۳	۰/۷۷۵	۱/۵۷۰	۰/۰۱	۰/۰۰۰۲

معناداری ۱ درصد ارتباط معناداری بین دو متغیر مذکور وجود ندارد در نتیجه به احتمال ۹۹ درصد نمی‌توان میزان پایداری را از روی رطوبت واکسن برای بچ دوم پیش بینی کرد.
با توجه به جدول ۵، نتایج حاصل از رگرسیون بین مدت زمان پایداری و رطوبت واکسن برای بچ سوم p = ۰/۱۷۶ را نشان می‌دهد که در سطح معناداری ۱ درصد ارتباط معناداری بین دو متغیر مذکور وجود ندارد در نتیجه به احتمال ۹۹ درصد نمی‌توان میزان پایداری را از روی رطوبت واکسنبرای بچ دوم پیش بینی کرد.
با توجه به جدول ۶، نتایج حاصل از رگرسیون بین مدت زمان پایداری و میزان جرم زنده واکسن برای بچ اول p = ۰/۰۰۰۶ را نشان می‌دهد که در سطح معناداری ۱ درصد ارتباط معناداری بین دو متغیر مذکور وجود دارد در نتیجه به احتمال ۹۹ درصد می‌توان میزان پایداری را از روی میزان جرم زنده واکسن برای بچ اول پیش بینی کرد.

با توجه به جدول ۶، نتایج حاصل از رگرسیون بین مدت زمان پایداری و میزان جرم زنده واکسن برای بچ دوم p = ۰/۰۰۰۰ را نشان می‌دهد که در سطح معناداری ۱ درصد ارتباط معناداری بین دو متغیر مذکور وجود دارد در نتیجه به احتمال ۹۹ درصد می‌توان میزان پایداری را از روی میزان جرم زنده واکسن برای بچ دوم پیش بینی کرد.
با توجه به جدول ۶، نتایج حاصل از رگرسیون بین مدت زمان پایداری و میزان جرم زنده واکسن برای بچ سوم p = ۰/۰۰۰۲ را نشان می‌دهد که در سطح معناداری ۱ درصد ارتباط معناداری بین دو متغیر مذکور وجود دارد در نتیجه به احتمال ۹۹ درصد می‌توان میزان پایداری را از روی میزان جرم زنده واکسن برای بچ سوم پیش بینی کرد.
تمامی نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفته در مطالعه حاضر از نظر تست Dissociation در رنج تعیین شده (OIE ۲۰۱۵) قرار داشت و تمامی پرکنه‌های باکتری بروسلوز در طول مدت مطالعه صد درصد صاف بودند.



شکل ۱- رگرسیون خطی مربوط به مقدار رطوبت و مدت زمان پایداری واکسن



شکل ۲- رگرسیون خطی مربوط به میزان جرم زنده واکسن و مدت زمان پایداری واکسن

تمامی نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفته در مطالعه حاضر از نظر تست Purity در رنج تعیین شده (OIE ۲۰۱۵) قرار داشت و تمامی نمونه‌ها در طول مدت مطالعه عاری از هرگونه آلودگی باکتریایی و قارچی بودند.
تمامی نمونه های مورد بررسی قرار گرفته در مطالعه حاضر از نظر تست Vacuum در رنج تعیین شده (OIE ۲۰۱۵) قرار داشت و تمامی ویال‌ها در طول مدت مطالعه دارای خلاء کامل بودند.
تمامی نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفته در مطالعه حاضر از نظر تست Identity در رنج تعیین شده (OIE ۲۰۱۵) قرار داشت و تمامی نمونه‌ها در محیط کشت بروسلا آگار حاوی استروپتومایسین توانایی رشد داشتند و در محیط کشت حاوی پنی‌سیلین فاقد رشد بودند.
تمامی نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفته در مطالعه حاضر از نظر تست Appearance در رنج تعیین شده (OIE ۲۰۱۵) قرار داشت.

بحث و نتیجه گیری

فاطمي و همکاران در پژوهش خود تحت عنوان بررسي پايداري واکسن Rev.1 با ارزيابي ميزان جرم زنده، به اين نتيجه رسيدند که تمامي نمونه‌هاي بررسي شده در زمان تحويل از موسسه رازي واجد جرم زنده در حد استاندارد CFU/ dose ۳-۰,۵-۳×۱۰^۶× در هر دز واکسن بر اساس توصيه ارائه شده توسط OIE بودند نتايج پژوهش حاضر با يافته‌هاي فاطمي و همکاران هم راستا است(۱۵)، در بررسي بروسلوز سويه Rev.1 که توسط فاطمي و همکاران در سال ۲۰۱۵ تا پايان تاريخ انقضاء واکسن (۴ ماه) انجام شده، نتايج به اين صورت گزارش شد که تمامي نمونه مورد بررسي داراي جرم زنده در حد استاندارد بودند، نتايج پژوهش حاضر با يافته‌هاي پژوهش فاطمي و همکاران هم راستا است (۱۶). فاطمي و همکاران در بررسي رطوبت واکسن‌هاي بروسلوز سويه Rev.1 به اين نتيجه رسيدند که متوسط رطوبت واکسن‌هاي ليوفليزه در موسسه رازي ۳/۷۴ درصد است (۱۶). نتايج پژوهش حاضر نشان داد که ميانگين رطوبت نمونه پژوهشي حاضر ۲/۰۷ درصد است که در استاندارد تعيين شده توسط OIE ۲۰۱۵ قرار دارد، لازم به ذکر است که اين واکسن از نظر ميزان رطوبت در طول مدت مطالعه در محدوده رطوبت قابل قبول بوده است.
نتايج همبستگی خطی نشان می‌دهد که بين دو متغير مدت زمان پايداری واکسن و رطوبت موجود در واکسن (در محدوده قابل قبول رطوبت) رابطه همبستگی معناداری وجود ندارد، ضريب همبستگی برای ۳ بچ نمونه آماری به ترتيب برابر است با r=۰/۲۴۶ ٪ ۲۴۶ =r ,r۲۳۲/ =r و r= ۰/۴۱۹ که نشان‌دهنده عدم ارتباط معنادار بين رطوبت و مدت زمان پايداری واکسن است. همچنين مقدار p در رگرسيون بين ميزان رطوبت و مدت زمان پايداری واکسن برای ۳ بچ نمونه آماری به ترتيب برابراست ٪۴۳۰ =p، ٪۸۸ =p و ٪۱۷۶ =p که نشان دهنده عدم ارتباط معنادار بين دو متغير مدت زمان پايداری و ميزان رطوبت واکسن است، لذا با توجه به اطلاعات استخراج شده از رگرسيون خطی نمی توان مدت زمان پايداری واکسن را از روی رطوبت پيش‌بينی کرد. حسن‌نيا و همکاران در بررسی رطوبت واکسن Iriba دوز کاهيده ضريب تعيين بين ميزان رطوبت و مدت زمان پايداری واکسن برای ۳ بچ نمونه آماری به ترتيب R۲=۰,۹۲۰, R۲=۰,۹۷۰, R۲=۰,۹۵۲ را معرفی کرده‌اند که با نتايج پژوهش حاضر هم‌راستا نيست (۵)، با توجه به اينکه اخيراً تغييراتي در روند ليوفليزاسيون و دستگاه‌هاي ليوفليزاتور همچنين بهبودي که در دستگاه‌هاي ليوفليزاتور انجام شده است رطوبت موجود در ويال در طول دوره انقضاء واکسن افزايش نمي‌يابد و اين عدم هم راستا بودن تحقيق حسن‌نيا و همکاران با پژوهش حاضر مي‌تواند به دليل همين تغييرات باشد.
نتايج همبستگی خطی نشان می‌دهد که بين دو متغير مدت زمان پايداری واکسن و ميزان جرم زنده واکسن رابطه همبستگی قوی معکوسی وجود دارد، ضريب همبستگی برای ۳ بچ نمونه آماری به ترتيب برابر است با (r=-۰/۸۹۷، r=-۰/۹۶۲ و r=-۰/۹۱۹) که نشان‌دهنده ارتباط معنادار بين مدت زمان پايداری واکسن و ميزان جرم زنده واکسن است.
همچنين مقدار p در رگرسيون بين ميزان مدت زمان پايداری و ميزان جرم زنده واکسن برای ۳ بچ نمونه آماری به ترتيب برابراست p= ۰/۰۰۰۶، p= ۰/۰۰۰۰ و p= ٪۰۰۰۲ که نشان دهنده ارتباط معنادار بين دو متغير مدت زمان پايداری و ميزان جرم زنده واکسن است، لذا با توجه به اطلاعات استخراج شده از رگرسيون خطی می توان مدت زمان پايداری واکسن را از روی ميزان جرم واکسن پيش بينی کرد. حسن نيا و همکاران در بررسی ميزان جرم زنده واکسن IRIBA با دوز کاهيده ضريب تعيين بين مدت زمان پايداری واکسن و ميزان جرم زنده واکسن برای ۳ بچ نمونه آماری به ترتيب R^۲=۰/۹۲۵ , R^۲= ۰/۹۲۹= ۰/R^۲۹۸۱= را معرفی کرده‌اند که با نتايج پژوهش حاضر هم راستا است (۵).
بهترين ترکيب نگهدارنده براي واکسن Rev1 شامل ترکيب باکتوکازيتون ٪۲/۵، ساکارز ٪۵ و ال گلوتاميک اسيد ٪۱ می‌باشد (۸). در تحقيقي که بهروزي‌خواه و همکاران انجام داده‌اند همين ترکيب ارائه شده توسط OIE به عنوان بهترين ترکيب برای نگهداری واکسن Rev.1 معرفی کرده‌اند (۱). لذا پيشنهاد می‌شود که برای افزايش مدت زمان پايداری واکسن، تحقيقات مختلفی بر روی دستگاه‌های ليوفليزاتور، نوع ويال و درپوش پلاستيکی و آلومنيومی واکسن انجام شود، از طرف ديگر چون کمپانی‌های مختلف دنيا از جمله کمپانی CZV کشور اسپانيا واکسن Rev.1 دز کاهيده را بصورت ۵ دزی توليد می‌کند و تاريخ انقضاء واکسن را يکسال معرفی کرده‌اند، لذا به بخش توليدی واکسن بروسلوز موسسه رازی پيشنهاد می‌شود که در تحقيقات ديگر واکسن Rev.1 دز کاهيده را بصورت آزمايشی در ويال‌های ۵ دزی توليد کند و پايداری آن را مورد بررسی قرار دهد.
حسن‌نيا و همکاران در تحقيق خود به اين نتيجه رسيدند که واکسن بروسلوز سويه IRIBA در مدت ۲۴ ماه بعد از توليد، با اينکه ميزان رطوبت آن در سال دوم افزايش مي‌يابد، ولي الزامات ارائه شده توسط OIE در ارتباط با جرم زنده واکسن را دارا می‌باشد و بهترين زمان مصرف براي اين واکسن را ۱ سال گزارش کردند (۵). نتايج پژوهش حاضر نشان مي‌دهد که واکسن بروسلوز سويه Rev۱ با دز کاهيده تمامي الزامات لازم منطبق با الزامات (OIE ۲۰۱۵) در مدت ۱۰ ماه را دارا مي‌باشند در شرايطي که تمامي الزامات مربوط به نگهداري واکسن از جمله شرايط زنجيره سرد رعايت شود اين واکسن مي‌تواند تا مدت ۱۰ ماه پايدار باشد، با توجه به الزامات استانداردهای OIE ۲۰۱۵ و BP ۲۰۱۵، تاريخ انقضاء واکسن بايد حداقل ۳ ماه کمتر از مدت زمان پايداری واکسن باشد (۱۷،۹)،

لذا در صورت تایید NRA مربوط به واکسن‌های دامپزشکی که سازمان دامپزشکی است مدت زمان تاریخ انقضاء واکسن بروسلوز سویه Rev.1 با دز کاهیده تولید شده در موسسه رازی را از ۴ ماه به ۷ ماه می‌توان افزایش داد.

تشکر و قدرداني

این مقاله از طرح بررسي پايداري واكسن بروسلوز، كه در موسسه واكسن و سرم‌سازي رازي انجام شده، استخراج شده است، از پرسنل محترم بخش توليدي بروسلوز و مديريت كنترل كيفي كه بنده را در انجام اين پژوهش ياري كرده‌اند نهايت تشكر و قدرداني را دارم.

منابع مورد استفاده

1-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.

2- Delvecchio, V.G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G., Mujer, C.V., (2002)a. The genome of *Brucella melitensis*. *Veterinary Microbiology* 90, 587–592.

3- Garrity, G.M., (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second ed. Springer, New York. 721 pp.

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

5- Hasannia, E., Soleimani, S., Alamian3, S., Behrozikhah, A., Emadi, A., Dostdari (2015), S. Stability Study of Iriba Brucellosis Full-dose and Reduced dose Vaccine Produced by Razi Institute in Iran *Archives of Razi Institute,* Vol. 70, No. 1 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- 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.

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

9- OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (2016), Principles of veterinary vaccine production. Chapter 1.1.6. P 96.

10- The offical compendia of standard, U.S. Pharmacopoeia, the standard of quality(2012). USB 35, NF30- WATER DETERMINATION (921).

11- WHO. Joint FAO. (1984) WHO, expert committee on brucellosis, sixth report, Technical report, series, 14, Geneva.

12- WHO. Technical report series (1971). Joint FAO/ WHO expert committee on brucellosis, 5th report. No. 484.

13- WHO. (1997). The development of new/ improved brucellosis vaccines: report of WHO. Meeting WHO/ EMC/ ZD/ 98. 14.

14- WHO expert committee on biological standardization. (1977) Requirement for *Brucella melitensis* strain Rev1 vaccine. 28th Report Annex 4. WHO Geneva.

15- 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.

16- Fatemi, Maryam. (1390). Stability Study of Rev1 Brucellosis vaccine with evaluation viable germ count. University of Tehran. Tehran.

17- British Pharmacopoeia (2015). Veterinary Vaccines Vet. Stability, chapter 2.2.6. P 197.