



## 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 دکستروز آگار 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 رقت های 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  $10^9 \times 37/134$  و  $10^9 \times 55/118$  (CFU) و در صد پرگنه های Rough، ۷۵/۰ درصد و ۲۸۱/۱ 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 was  $134.37 \times 10^9$  and  $118.55 \times 10^9$  (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 باشد که 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, 2008). کنترل و ریشه کنی بیماری در جمعیت های دامی مبتنی بر واکسیناسیون دام های حساس است (Blasco, 2011). بیماری در انسان بوسیله مارستون در سال ۱۸۶۱ و عامل آن توسط دیوید بروس در ۲۶ دسامبر ۱۸۸۶ میلادی کشف شد (Wyatt, 2013). 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, 2005). 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 بیمارستان های تهران جدا گردید و در سال ۱۳۲۷ برای اولین بار دکتر انتصار بروسلا ملی تنسیس را از شیر بز جدا کرد (Zowghi, 2008).

بیماری بروسلوز دارای انتشار جغرافیایی گسترده بوده و یک مشکل جهانی محسوب می گردد (Pappas, 2006). در ایران با توجه به شرایط اقلیمی کشور با پراکندگی متغیر در مناطق مختلف وجود دارد (Moradi, 2006). برای مقابله با بیماری بروسلوز در انسان واکسن موثری وجود

ندارد (Ko, 2003) 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, 2002). 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 تنسیس سویه Rev 1 می باشد 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, 2013). 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, 1957). مقاومت کروموزومی اکتسابی به استرپتومایسین غالباً به موتاسیون در ژن رمز کننده پروتئین ریبوزومی S12 مربوط می شود (Clockaert, 2002). 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 نموده 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, 1997). 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, 2013). بدین ترتیب امروزه

کلنی (CFU) (Colony Forming Unit) 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:  $1 \times 10^5$  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  $10^5 \times 2$  جرم زنده بروسلا ملتینسیس 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 تلایه تهیه شد. کشت تلایه طحال در محیط اختصاصی (بروسلا آگار) انجام شد (Arena Gamboa, ۲۰۱۱, OIE, ۲۰۱۲).

۴. مرفولوژی پرگنه: با توجه به اینکه سویه Rev ۱ دارای فنوتیپ صاف (Smooth) 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):

۱-۴- مشاهده مستقیم کلنی ها: کلونی ها بوسیله نور مورب منعکس شده از سطح یک آینه در زیر میکروسکوپ مشاهده شدند.  
۲-۴- آزمایش آکریفلاوین: مقداری از نمونه را در یک قطره از رقت  $1/1000$  آکریفلاوین حل کرده تا سوسپانسیون یکنواختی بدست آید.

۳-۴- 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  $CFU \pm Standard E$  (SE) بیان می شود که به صورت  $Log 10$  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

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  $10^{-4} \times 4-1$  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 دکستروز آگار در کشور و ثبت بین المللی آن، این مطالعه جهت بررسی امکان جایزینی 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 لیتر آب مقطر به مدت نیم ساعت جوشانده و صاف شد. آن گاه به میزان ۱ درصد پپتون (BDH) و ۰/۵ درصد 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 گلیسرین دکستروز آگار، ۱۰۰ میلی لیتر محلول گلوکز و ۴۰ میلی لیتر گلیسرین 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 بوت در ۱۲ بوت استریل تقسیم شد. بوت ها در ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند و پس از استریل به منظور تأمین 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 بوت های فوق، بوت های بدون سرم نرمال غیر فعال اسب نیز آماده کشت باکتری شد. بعد از ۲۴ ساعت کلیه بوت ها از نظر دوام و چسبندگی ژلوز به دیواره بوت مورد بررسی قرار گرفتند.

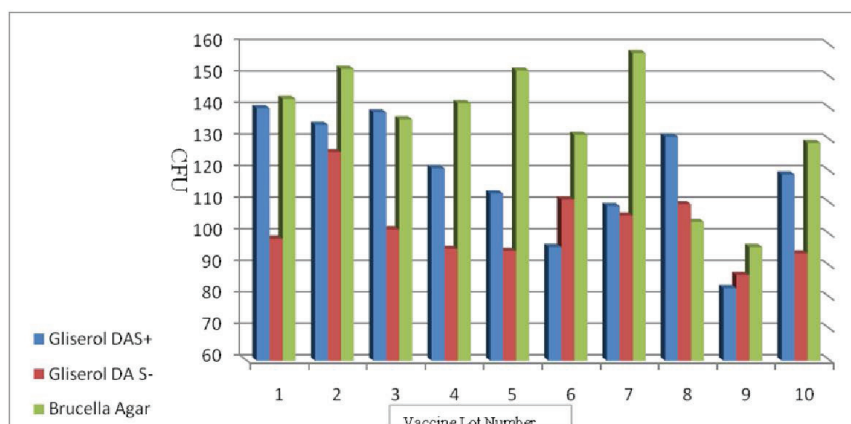
#### تولید واکسن Rev 1

بذر Rev 1 تهیه شده در محیط کشت بروسلا آگار دیفکو (Difco ۲۱۱۰۸۶) و گلیسرول دکستروز آگار در شرایط کاملاً 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 دکستروز آگار تولید شد. همزمان به منظور مقایسه همراه با هر یک از این بچ ها یک سری واکسن نیز روی محیط گلیسرول دکستروز آگار با سرم نرمال اسب با استفاده از بذر مشترک کشت و تولید شد.

#### ارزیابی واکسن های 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



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

سویه حاد پاک می باشند، اما در گروه کنترل درصد عمده ای از کشت ثلاثیه طحال آلوده به باکتری بودند.

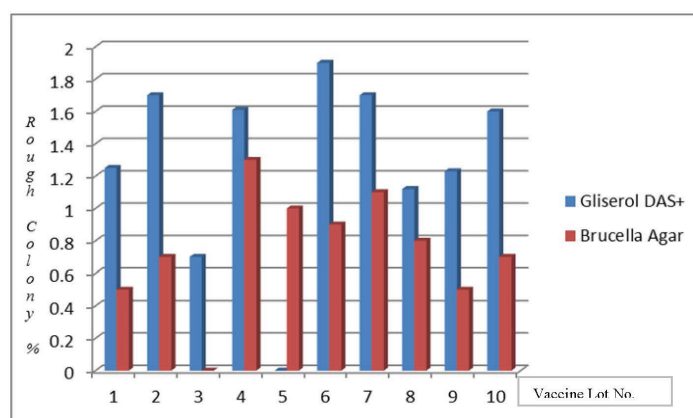
۴- مرفولوژی پرگنه: در مشاهده مستقیم کلونی ها، کلنی های صاف به صورت گرد، درخشان و با رنگ آبی تا آبی متمایل به سبز و کلنی های خشن به صورت خشک و گرانوله به رنگ زرد تا زرد مایل به سفید دیده شدند. کلونی های صاف در آکریفلاوین به صورت همان سوسپانسیون یکنواخت شناور باقی مانده ولی کلونی های خشن بلافاصله آگلوتینه شدند. در رنگ آمیزی با کریستال ویوله کلونی های صاف رنگ را به خود نگرفته، در حالیکه کلونی های خشن به رنگ ارغوانی درآمد و یا روی سطح آنها شکاف های شعاعی بوجود آمد. نتایج نشان می دهند که تفاوت چندانی در میزان Rough شدن پرگنه 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).

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 ثلاثیه 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



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

## بحث

که به آگار دیفکو آکسوئید اضافه می شود، برای تجدید کشت و کشت های اولیه از منابع 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 دکستروز آگار در کشور و ثبت بین المللی آن، این مطالعه جهت بررسی امکان جایزینی 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 سوبه راف واکسینال Rev ۱ در حد استاندارد می باشد. بر اساس نتایج به دست آمده در صد پرگنه های Rough، ۷۵/۰ 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  $10^9 \times 134/37$  و  $10^9 \times 118/55$  (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 فرمولاسیون اختصاصی برای کشت باکتری بروسلا ملی تنسیس جهت تولید واکسن Rev ۱ با کیفیت مناسب استفاده کرد.

## تشکر و قدردانی

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

بیماری بروسلا 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 بروسلا 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 و کشتار امکان پذیر می باشد. مبارزه با بروسلا دامی اساساً 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 مخاطر فراوانی که از نظر بهداشت عمومی به وجود می آید، خسارات جبران ناپذیری نیز به اقتصاد کشور وارد می گردد (Blasco, ۲۰۱۱). تاکنون واکسن های متعددی از سویه های زنده یا کشته بروسلا آبورتوس، بروسلا ملی تنسیس و بروسلا سوئیس جهت ایمن سازی گاو، گوسفند و بز، خوک، شتر و دیگر حیوانات مورد استفاده قرار گرفته است. واکسیناسیون در انسان نیز به طور محدود انجام پذیرفته است.

مهم ترین واکسن های مورد مصرف دام پزشکی واکسن زنده سویه ۱۹ بروسلا آبورتوس (S19)، واکسن زنده و کشته سویه ۴۵/۲۰ بروسلا آبورتوس، واکسن زنده سویه موکوئیدی ۱۰۴M بروسلا آبورتوس، واکسن کشته سویه ۳۸H بروسلا ملی تنسیس، واکسن زنده سویه Rev 1 بروسلا ملی تنسیس و واکسن زنده سویه ۲S می باشند. از فراکسیون های آنتی ژنی سویه های مختلف بروسلا نیز با موفقیت نه چندان چشمگیری استفاده شده است. از بین واکسن های فوق الذکر، واکسن تهیه شده از سویه ۱۹ بروسلا آبورتوس و واکسن سویه Rev 1 بروسلا ملی تنسیس از واکسن های انتخابی ایمن سازی علیه بروسلا به ترتیب در گاو و گوسفند و بز می باشند (Ficht, ۲۰۰۹, Schurig, ۲۰۰۲). واکسن سویه 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 بروسلا در گوسفند و بز می باشد (Ficht, ۲۰۰۹, Schurig, ۲۰۰۲). این واکسن از دهه ۱۳۴۰ به بعد در بره و بزغاله، و طی سال های اخیر در گوسفند و بز بالغ در ایران 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



son, 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., Esmail 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.

### منابع مورد استفاده

۱- ذوقی، ا.، وند یوسفی، ج.، حاجی خانی، ر. (۱۳۸۳). تکنیک های آزمایشگاهی بروسلوز در دامپزشکی و پزشکی (نویسنده 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. Cloeckert, 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., Letes-

