Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۹ زمستان ۱۳۹۴
DOI:10.22034/vj.2015.103031

ارزیابی کارآیی پایدارکننده‌های شیمیایی مختلف بر روی پایداری واکسن برونشیت عفونی طیور

• **لیلا پیشرفت ثابت (نویسنده مسئول)**
دکترای تخصصی ویروس‌شناسی، بخش تحقیق و تولید واکسن های ویروسی طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
• **شهین مسعودی**
استادیار، بخش تحقیق و تولید واکسن های ویروسی طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
• **نوشین حسینی وفا**
کارشناس ارشد، بخش کنترل کیفی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: مهر ماه ۹۳ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۹۴
Email: l.sabet@rvsri.ac.ir

چکیده

واکسن برونشیت عفونی طیور (IBV) یک واکسن ویروسی زنده تخفیف حدت یافته بوده که نسبت به تغییر شرایط محیطی حساس می باشد. پایدارکننده ها به منظور حفظ توانمندی و کارآیی واکسن، قبل از لیوفیلیزه شدن به مایع واکسن اضافه می شوند که منجر به حفظ پایداری واکسن در طی مراحل تهیه، نگهداری و تلقیح می شود. این تحقیق به منظور تعیین کارآیی چهار ترکیب پایدارکننده بر پایداری واکسن IBV پس از لیوفیلیزه شدن انجام شد. چهار پایدارکننده لاکتوز- لاکتالبومین (LL)، سوکروز- لاکتالبومین (LS)، لاکتوز-پپتون (LP) و ژلاتین- سوربیتول (GS) برای تهیه واکسن لیوفیلیزه شده مورد استفاده قرار گرفت. واکسن های فرموله شده با پایدارکننده ها پس از لیوفیلیزاسیون عیار سنجی شدند و با عیار اولیه مایع واکسن مقایسه گردید. سپس طبق دستورالعمل OIE، برای تعیین پایداری تسریع شده، عیار واکسن ها بعد از یک هفته انکوباسیون در ۳۷ °C تعیین گردید. رطوبت واکسن پس از لیوفیلیزاسیون با روش کارل- فیشر اندازه گیری شد. همچنین برای تعیین پایداری طولانی مدت واکسن در ۴ °C، برای مدت ۳ سال و هر سه ماه یکبار عیارسنجی شدند. آزمایش های فوق برای ۳ سری واکسن تولید شده انجام گردید. نتایج نشان داد واکسن های لیوفیلیزه شده با پایدار کننده ها عیار قابل قبول را داشتند و میانگین رطوبت واکسن‌ها در حدود قابل قبول (۲/۷۲-۱/۴۲٪) بود. پس از یک هفته انکوباسیون واکسن ها در ۳۷ C° (پایداری تسریع شده)، واکسن با پایدارکننده لاکتوز-لاکتالبومین کمترین کاهش تیتر را داشت. همچنین نتایج نشان داد که در پایان دوره سه ساله نگهداری واکسن‌ها در ۴ °C، واکسن با پایدارکننده LL بالاترین عیار را داشت. بدین طریق به نظر می رسد ترکیب پایدارکننده لاکتوز-لاکتالبومین حفاظت خوبی در طی مرحله لیوفیلیزاسیون و همچنین نگهداری طولانی مدت در ۴ °C برای واکسن IBV فراهم می نماید.

کلمات کلیدی: ویروس برونشیت عفونی، واکسن، پایدارکننده

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 109 pp: 52-59

Evaluation of various chemical stabilizers on the stability of avian infectious bronchitis vaccine

By: Pishraft-Sabet, L., (Corresponding Author) Department of Research & Production of Poultry Viral Vaccine, Razi Vaccine & Research Institute, Karaj, Iran. Masoudi, S., Department of Research & Production of Poultry Viral Vaccine, Razi Vaccine & Research Institute, Karaj, Iran. and Hoseini-Vafa, N., Department of Quality Control, Razi Vaccine & Research Institute, Karaj, Iran.

Received: September 2014 **Accepted: April 2015**

Email: l.sabet@rvsri.ac.ir

Infectious bronchitis vaccine (IBV) is a live attenuated viral vaccine which is sensitive to the environmental changes. In order to maintain their potency and efficacy, stabilizer agents are usually added to the lyophilized vaccines during preparation process, stabilizing the vaccine throughout the manufacturing, storage, and administration. This study aimed to determine the efficacy of four different stabilizers on IBV. Four different stabilizers including lactalbomin–lactose (LL), lactalbumin–sucrose (LS), lactose–peptone (LP) and gelatin–sorbitol (GS) were used to prepare lyophilized vaccines. The vaccine was titrated before and after lyophilization. To determine accelerated stability (based on OIE instruction), the vaccines were titrated after 7 days incubation in 37ºC. Residual moisture of lyophilized vaccines was measured by Karl-Fisher method. Furthermore, the stability of the vaccines in 4ºC was measured over 36 months at three months intervals. All experiments were repeated for three batches of the vaccine. The results showed that acceptable titer of the vaccine was observed with four stabilizers. Residual moisture found to be in appropriate limit, ranged from 1.42-2.72%. Following seven days incubation in 37ºC, titer reduction of the vaccine with lactose-lactalbomin was the lowest. The results showed that in the end of this period, the vaccine with LL has the highest titer. In conclusion, it seems that lactose-lactalbomin stabilizer provided good protection to IBV under lyophilization condition and maintenance of the vaccine for long time in 4ºC.

Keyword: Infectious Bronchitis Virus, Vaccine, Stabilizer

مقدمه

برونشیت عفونی یک بیماری حاد ویروسی سیستم تنفسی و اوروژنیتال ماکیان می‌باشد. این بیماری فوق‌العاده مسری و با واگیری شدید در تمام سنین و تلفات بالا در جوجه‌های جوان به ویژه در حضور عفونت‌های همراه بوده و منجر به کاهش تولید در مرغ‌های تخم‌گذار می‌گردد. آسیب ویروس به سیستم تنفسی، پرندگان را مستعد عفونت‌های ثانویه باکتریایی می‌نماید. در مرغان تخم‌گذار تکثیر ویروس در اویداکت منجر به کاهش تولید تخم، کاهش کیفیت پوسته و قسمت درونی تخم مرغ می‌گردد و تولید اغلب به سطح نرمال بر نمی‌گردد. همچنین برخی سویه‌های این ویروس نفروپاتوژنیک است، منجر به ایجاد آسیب شدید در کلیه و مرگ و میر بالا می‌شود. برونشیت عفونی در مرغداری‌های صنعتی اکثر کشورها از نظر زیان‌های اقتصادی بعد از بیماری نیوکاسل در مرتبه دوم اهمیت قرار دارد. عامل بیماری، ویروس برونشیت عفونی طیور بوده که در جنس ۳ کوروناویروس، خانواده کوروناویریده و راسته Nidoviral طبقه بندی شده است (Cavanagh D. 2007).

بهترین روش پیشگیری وکنترل بیماری برونشیت عفونی علاوه بر رعایت دقیق اصول امنیت زیستی، استفاده از واکسن است. در طیور صنعتی استفاده از واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته و کشته روغنی تهیه شده با سویه‌های ماساچوست در اکثر کشورهای جهان متداول است. در جوجه‌های گوشتی معمولا از واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته استفاده می‌شود. افزایش میزان آنتی‌بادی در خون علاوه بر جلوگیری از کاهش تولید تخم مرغ در انتقال آنتی‌بادی مادری به جوجه حائز اهمیت است. واکسن‌های زنده در تحریک ایمنی سلولی و موضعی مخاطی نقش مهم‌تری را ایفاء می‌کنند (Jackwood and Wit, 2013).

یک چالش مهم در واکسن‌های زنده و یا به طور کلی واکسن‌های با پایه پروتئینی، اطمینان از ثبات و پایداری آنهاست. پایداری واکسن‌های زنده لیوفیلیزه شده یک فاکتور اصلی برای انجام واکسیناسیون موفق می‌باشد. به طور معمول واکسن‌های زنده لیوفیلیزه پس از تهیه تا زمان استفاده در سردخانه ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. مشکل اصلی در مورد این نوع واکسن‌ها، کاهش عیار ویروس در طی مرحله لیوفیلیزاسیون و یا شرایط نامناسب نگهداری و زنجیره سرد می‌باشد. افزایش دما باعث تغییر ساختار پروتئین‌ها می‌شود و از بین رفتن ساختار سه بعدی طبیعی پروتئین‌ها باعث از بین رفتن فعالیت کاتالیتیک این پروتئین‌ها خواهد شد (Becker, Kleinsmith et al. 2000). پایدارکننده‌ها ترکیباتی هستند که در مراحل تولید به واکسن اضافه شده و منجر به حفظ توانمندی و کارآیی واکسن در تمام مراحل ساخت، نگهداری و تلقیح می‌شود. ((Rexroad, Wiethoff

www.SID.ir

Archive of SID

et al. 2002, Setia, Mainzer et al. 2002, Brandau, Jones et al. 2003, Peek, Martin et al. 2007). پایدارکننده‌ها به عنوان عوامل محافظت‌کننده در برابر سرما، در ممانعت از تغییر ساختار پروتئین و یا اسیدهای نوکلئیک در مراحل لیوفیلیزاسیون که یک مرحله بحرانی در تولید واکسن است، حائز اهمیت می‌باشد (Zaffran 1995). حفظ عفونت‌زایی ویروس زنده تخفیف حدت یافته تا حدود زیادی به ترکیب پایدارکننده‌های بکار رفته وابسته است. بدین طریق پایدارکننده‌ها در حفظ عفونت‌زایی ویروس نقش مهمی ایفا می‌کنند و ترکیب پایدارکننده مورد استفاده نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

مواد شیمیایی مختلف مثل نمک‌های خنثی، کربوهیدرات ها از جمله دی ساکاریدهایی مثل سوکروز، لاکتوز، مالتوز و ترهالوز، قندهای الکلی (سوربیتول و مانیتول)، اسیدهای آمینه و پپتیدها از ترکیبات رایج استفاده شده برای پایداری پروتئین‌ها از جمله واکسن‌ها می‌باشند (Bovarnick, Miller et al. 1950). ترکیباتی که اغلب در واکسن‌های ویروسی استفاده می‌شود شامل ترکیب یک پلیمر (شامل آلبومین گاوی و یا انسانی، ژلاتین، پپتون و لاکتالبومین) به همراه یک قند (از جمله سوکروز، لاکتوز، ترهالوز) می‌باشد. استفاده از ترکیبات بافری فسفات نیز در برخی موارد توصیه می‌شود (Samorek-Salmonowicz and Czekaj 1993, Sreenivasa, Ba -dyopadhyay et al. 1997).

مطالعه حاضر به منظور تعیین یک پایدارکننده مناسب برای واکسن برونشیت عفونی طیور[1] (IBV) به منظور افزایش طول مدت نگهداری آن طراحی گردید.

مواد و روش کار

تهیه واکسن

طبق دستوالعمل تهیه سوش واکسن (۲۰۱۳)، بذر واکسن ویروس برونشیت عفونی طیور به حفره آلانتوئیک تخم‌مرغ‌های SPF جنین‌دار ۱۱-۹ روزه تلقیح شد. پس از طی زمان انکوباسیون، مایع آلانتوئیک تخم مرغ‌های تلقیح شده برداشت گردیده، به عنوان مایع واکسن مورد استفاده قرار گرفت. سه سری متفاوت از مایع واکسن برای تهیه سه سری واکسن لیوفیلیزه شده با پایدارکننده‌ها تهیه گردید.

پایدارکننده‌ها

در این مطالعه چهار پایدارکننده واکسن لاکتوز- لاکتالبومین هیدرولیز شده (Sreenivasa-BP. 1997) (LL)، سوکروز- لاکتالبومین هیدرولیز شده (Adebayo, Sim-Brandenburg et al. 1998) (LS)، لاکتوز- پپتون ((LP (Rahimi-Monazzah 1984) (K. 1984, Samorek-Salamonowicz E. 1993) و سوربیتول- ژلاتین هیدرولیز شده (Sarkar, Sreenivasa GS) et al. 2003) مورد استفاده قرار گرفت (pH =۷/۲) و فرمولاسیون واکسن برونشیت عفونی طیور با پایدارکننده‌ها انجام شد. ترکیب نهایی هر پایدارکننده در واکسن در جدول ۱ آمده است. واکسن‌های تهیه شده پس از فرمولاسیون در ویال‌های استریل تقسیم شده، تحت شرایط یکسان لیوفیلیزه شدند.

اندازه گیری رطوبت باقیمانده در واکسن پس از لیوفیلیزاسیون

میزان رطوبت باقیمانده[2] (RM) در واکسن‌ها پس از لیوفیلیزاسیون با روش کارل- فیشر اندازه‌گیری شد. مقدار رطوبت برای ۴ ویال از هر نمونه اندازه‌گیری شده، میانگین مقادیر محاسبه گردید.

تعیین عیار ویروس واکسن

عیار ویروس برونشیت عفونی قبل و بعد از لیوفیلیزاسیون بر روی تخم‌مرغ‌های SPF جنین دار تعیین شد. بدین طریق که ابتدا رقت‌های سریال ۱۰ تایی از ویروس در PBS تهیه شد. ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت، به ۵ عدد تخم‌مرغ SPF جنین دار ۱۰ روزه تلقیح شد. تخم‌مرغ‌های تلقیح شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و هر روز از نظر وضعیت زنده و یا مرده بودن جنین مورد بررسی قرار گرفتند. در پایان روز هفتم عیار ویروس با روش Spearman-Karber محاسبه شد.

اندازه گیری پایداری تسریع شده واکسن

حداقل ۴ ویال از ویروس لیوفیلیزه شده با هر نمونه پایدارکننده به طور جداگانه در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از یک هفته انکوباسیون، ۴ ویال مربوطه یکی شده و عیار ویروس تعیین شد.

اندازه گیری پایداری طولانی مدت واکسن

واکسن‌های تهیه شده، تا انتهای دوره نگهداری در سردخانه ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. هر سه ماه یکبار ۴ ویال از هر نمونه واکسن با هم مخلوط شده و عیار آن تعیین شد. این کار تا سه سال پس از تاریخ تهیه واکسن‌ها ادامه یافت.

تجزیه تحلیل آماری

پس از جمع‌آوری نتایج خام حاصل از تعیین رطوبت و عیارسنجی ویروس در مراحل مختلف، آنالیز آماری نتایج با نرم افزار GraphPad انجام

جدول ۱- ترکیب پایدارکننده‌ها

پایدار کننده	غلظت نهایی هر پایدار کننده در واکسن
لاکتوز- لاکتالبومین (LL)	لاکتوز ۱۰٪ ، لاکتالبومین هیدرولیز شده ۵٪، CaCl۲ ۰/۱ g/l ، MgSO۴ ۰/۰۷۶ g/l
سوکروز- لاکتالبومین (LS)	سوکروز ۱۰٪ ، لاکتالبومین هیدرولیز شده ۵٪، CaCl۲ ۰/۱ g/l ، MgSO۴ ۰/۰۷۶ g/l
لاکتوز- پپتون (LP)	لاکتوز ۴٪ ، پپتون ۴٪
ژلاتین- سوربیتول (GS)	ژلاتین۱/۷۵٪، سوربیتول ۱/۷۵٪

www.SID.ir

Archive of SID

شد. مقایسه عیار ویروس قبل و بعد از لیوفیلیزاسیون و همچنین قبل و بعد از یک هفته انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد (پایداری تسریع شده) بر اساس آنالیز Student's t-test انجام شد.

نتایج

واکسن برونشیت عفونی طیور با پایدارکننده‌های مختلف به طور همزمان و با استفاده از برنامه یکسان لیوفیلیزه شدند تا کیفیت واکسن با این پایدارکننده‌ها مورد مقایسه قرار گیرد.

مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ‌های SPF پس از برداشت، از نظر ویروس عیارسنجی شد. همچنین عیار ویروس پس از لیوفیلیزه شدن تعیین گردید. مقایسه عیار ویروس با چهار پایدارکننده قبل و بعد از لیوفیلیزه شدن در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان داد که کاهش عیار ویروس پس از لیوفیلیزه شدن با چهار پایدارکننده کمتر از $0/8 \log_{10} EID_{50}/ml$ بود.

با مقایسه عیار ویروس قبل و بعد از لیوفیلیزه نمودن واکسن مشخص گردید که این پایدارکننده ها در طی فرایند لیوفیلیزاسیون از قدرت محافظت‌کنندگی خوبی برخوردار هستند. مقایسه میانگین کاهش عیار ویروس واکسن با چهار پایدارکننده نشان داد که واکسن با پایدارکننده LP کمترین کاهش عیار را پس از لیوفیلیزاسیون را داشت.

رطوبت باقیمانده در حفظ کیفیت واکسن‌های زنده لیوفیلیزه نقش مهمی دارد. در این مطالعه حد قابل قبولی از RM در تمام‌نمونه ها در سه سری ساخت مشاهده گردید (حد قابل قبول RM < ۳٪ می باشد). دامنه RM در تمام واکسن ها در سه سری ساخت از ۱/۴۲ تا ۲/۷۲ بوده که نتیجه بسیار مطلوبی است.

در آزمایش پایداری تسریع شده طبق دستورالعمل OIE (۲۰۱۳)، عیار واکسن لیوفیلیزه شده قبل و بعد از یک هفته انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. میانگین کاهش عیار واکسن با پایدارکننده‌ها در آزمایش پایداری تسریع شده نشان داد که واکسن با پایدارکننده LL کمترین کاهش را داشته است و پس از آن به ترتیب LS ، GS و LP قرار دارند. واکسن با ترکیب LP پایداری تسریع شده نسبتاً ضعیفی را داشته، کاهش عیار آن $2/4-2/6 \log_{10} EID_{50}/ml$ بوده است. نتایج مقایسه عیار واکسن‌های لیوفیلیزه شده با چهار پایدار کننده قبل و بعد از یک هفته انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جدول ۳ آمده است. نتایج نشان داد اگرچه میانگین کاهش تیتر ویروس در آزمایش پایداری تسریع شده برای واکسن با تمام پایدارکننده‌ها معنی‌دار بود (p value < 0/05)، واکسن با پایدارکننده LL کمترین کاهش را داشت.

برای تعیین پایداری طولانی مدت واکسن، هر سه ماه یکبار تعداد ۴ ویال از هر واکسن لیوفیلیزه شده با هم یکی شده و عیار آن تعیین شد. این عیارسنجی به مدت ۳۶ ماه انجام گرفت. آنالیز رگرسیون عیار ویروس در طی این دوره سه ساله نشان داد که تیتر واکسن با پایدارکننده‌ها در طول زمان به طور معنی‌داری کاهش یافت. اما مقایسه میانگین عیار واکسن با پایدارکننده‌ها پس از این دوره مشخص نمود که واکسن با پایدارکننده LL بالاترین عیار ویروس را در انتهای دوره داشت و تیتر آن بالاتر از حد قابل

جدول ۲- تیتر واکسن با پایدارکننده‌های متفاوت قبل و بعد از لیوفیلیزه شده

پایدارکننده	سری تولید	عیار ($\log_{10} EID_{50}/ml$)			Mean ± SEM ($\log_{10} EID_{50}/ml$)		اختلاف بین میانگین ها	P-value Student's (t-test
		قبل از لیوفیلیزاسیون	پس از لیوفیلیزاسیون	کاهش عیار	قبل از لیوفیلیزاسیون	پس از لیوفیلیزاسیون		
LL	۱	۸/۱	۷/۹	۰/۲	۸/۰۳±۰/۰۶۷	۷/۷ ±۰ /۱۶	۰/۳۳ ±۰/۱۵	NS
	۲	۸/۱	۷/۵	۰/۶				
	۳	۷/۹	۷/۷	۰/۲				
LS	۱	۸/۱	۷/۹	۰/۲	۸/۰۳±۰/۰۶۷	۷/۶۳ ± ۰/۱۳	۰/۴ ± ۰/۰۶	NS
	۲	۸/۱	۷/۵	۰/۶				
	۳	۷/۹	۷/۵	۰/۴				
LP	۱	۸/۱	۷/۷	۰/۴	۸/۰۳±۰/۰۶۷	۷/۸ ± ۰/۱	۰/۲۳ ±۰/۰۳	NS
	۲	۸/۱	۸	۰/۱				
	۳	۷/۹	۷/۷	۰/۲				
GS	۱	۸/۱	۷/۷۵	۰/۳۵	۸/۰۳±۰/۰۶۷	۷/۶۲ ± ۰/۱۶	۰/۴۱ ± ۰/۰۹	NS
	۲	۸/۱	۷/۳	۰/۸				
	۳	۷/۹	۷/۸	۰/۱				

www.SID.ir

Archive of SID

قبول (۶/۵ $log_{10}EID_{50}/ml$) بود (جدول ۴).

بحث

واکسن زنده تخفیف حدت یافته ویروس برونشیت عفونی طیور برای ایمن‌سازی جوجه‌های گوشتی، مادر و تخم‌گذار استفاده می‌شود. حفظ توانمندی و پایداری واکسن در تمام مراحل تولید و نگهداری، از چالش‌های مهم درباره واکسن‌های زنده می‌باشد که از نظر اقتصادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. پایدارکننده‌ها نقش مهمی در طول مدت نگهداری ترکیب‌های پروتئینی از جمله واکسن‌ها دارند. این ترکیبات در مراحل تولید به واکسن اضافه می‌شود و در حفظ توانمندی و کارآیی واکسن در طی مراحل تولید و نگهداری نقش ایفا می‌کنند. در این تحقیق بر اساس گزارش‌های سایر محققین بر روی پایدارکننده‌های ویروسی، چهار ترکیب پایدارکننده لاکتوز- لاکتالبومین، سوکروز- لاکتالبومین، لاکتوز-پپتون و سوربیتول- ژلاتین انتخاب شده، اثر آنها در پایداری ویروس برونشیت عفونی طیور بررسی گردید.

ژلاتین و ژلاتین هیدرولیز شده به طور وسیع در محصول‌های آرایشی، غذاها و ترکیبات دارویی استفاده می‌شود. ژلاتین ایمونوژنیسیته ضعیفی دارد. خاصیت ژله‌ای ژلاتین، از غیرفعال شدن ویروس در برابر تغییرات محیطی جلوگیری می‌کند. ژلاتین بطور وسیع به عنوان پایدارکننده برخی از واکسن‌ها از جمله واکسن زنده تخفیف حدت یافته واریسلا بکار می‌رود (Chun, Lee et al. 2004). غلظت ۰/۲٪ ژلاتین برای توکسوئید تتانوس پایدارکننده مناسبی است (Chang and Gupta 1996). همچنین واکسن هاری تهیه شده با ژلاتین از پایداری خوبی برخوردار است (Majer, Herrmann et al. 1976) اما ژلاتین بر روی واکسن باکتریایی سالمونلا انتریتیدیس اثر حفاظت‌کنندگی ندارد (Barbour, Abdelnour et al. 2002).

ترکیب سوربیتول- ژلاتین یک پایدارکننده مؤثر در تهیه واکسن لیوفیلیزه سرخک (De Rizzo, Tenorio et al. 1988) و ویروس Rinde-pest (Mariner, House et al. 1990) می‌باشد. افزودن سوربیتول به عنوان پایدارکننده به واکسن آنسفالیت ژاپنی نیز در نگهداری طولانی مدت آن مؤثر است (Toriniwa and Komiya 2008).

اثر سوکروز بر روی پایداری سویه‌های واکسن در مطالعات مختلف به صورت ضد و نقیض گزارش شده است. برخی تحقیق‌ها عدم اثر پایدارکنندگی سوکروز بر روی واکسن پولیو و نیز باکتری سالمونلا انتریتیدیس را نشان داده‌اند (Pipkin and Minor 1998, Barbour, Abdelnour et al. 2002). در یک بررسی دیگر عنوان شده است که استفاده از میزان بیشتری سوکروز (۷۰ و ۳۵٪) بر روی واکسن پولیو اثر حفاظت‌کنندگی دارد (Mirchamsy, Shafyi et al. 1977). برعکس در یک مطالعه دیگر، سوکروز بر روی واکسن تب زرد کمترین خاصیت حفاظتی را داشته است (Sood, Aggarwal et al. 1993).

جدول ۳: مقایسه عیار واکسن‌های لیوفیلیزه شده با پایداکننده‌های متفاوت، قبل و بعد از یک هفته انکوباسیون در ۷۳ درجه سانتی‌گراد (پایداری تسریع شده)

پایدارکننده	سری ساخت	عیار ($log_{10}EID_{50}/ml$)			Mean ± SEM ($log_{10}EID_{50}/ml$)		اختلاف بین میانگین ها	*P*-value Student's (t-test
		عیار اولیه	پس از یک هفته انکوباسیون در ۳۷°C	کاهش عیار	عیار اولیه	پس از یک هفته انکوباسیون در ۳۷°C		
LL	۱	۷/۹	۵/۹	۲	۷/۷ ± ۰/۱۲	۶/۳ ± ۰/۲	۱/۴±۰/۲۳	۰/۰۰۳۷
	۲	۷/۵	۶/۵	۱				
	۳	۷/۷	۶/۵	۱/۲				
LS	۱	۷/۹	۶/۵	۱/۴	۷/۷۷ ± ۰/۱۳	۵/۹۷± ۰/۲۹	۱/۸±۰/۳۲	۰/۰۰۴۹
	۲	۷/۵	۵/۹	۱/۶				
	۳	۷/۵	۵/۵	۲				
LP	۱	۷/۷	۵/۳	۲/۴	۷/۸۳ ± ۰/۱۳	۵/۳۷± ۰/۱۸	۲/۴۷±۰/۲۲	۰/۰۰۰۴
	۲	۸/۱	۵/۷	۲/۴				
	۳	۷/۷	۵/۱	۲/۶				
GS	۱	۷/۷۵	۵/۷	۲/۰۵	۷/۶۵ ± ۰/۱۸	۵/۷۲±/۰۱۷	۱/۹۳±۰/۱۸	۰/۰۰۰۴
	۲	۷/۳	۵/۷	۱/۶				
	۳	۷/۷	۵/۷	۲				

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین اثر لاکتوز نیز بر روی واکسن‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است. در یک مطالعه اثر حفاظتی چند ترکیب پایدارکننده سوکروز- گلوتامین، گلوتامین- سوکروز، پپتون-لاکتوز بر روی ویروس DDV مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج آنها، لاکتوز-پپتون بهترین اثر حفاظتی را داشته است (Samorek-Salmonowicz and Czekaj 1993). در مطالعه‌ای دیگر اثر پایدارکننده‌های لاکتالبومین- لاکتوز (LL) و لاکتالبومین- سوکروز (LS) را بر روی ویروس واکسن Rinderpest ارزیابی کردند. نتایج نشان داد که LL نسبت به LS در مقاومت واکسن در برابر گرما اثر بهتری دارد (Sreenivasa, Bandyopadhyay et al. 1997).

رطوبت باقیمانده در واکسن‌های زنده پس از مرحله لیوفیلیزاسیون در حفظ کیفیت واکسن اهمیت زیادی دارد. پایدارکننده‌ها با تغییر فشار آب سطحی اطراف پروتئین‌ها، خروج آب از لایه سطحی پروتئین را تسهیل می‌کند. در این مطالعه رطوبت باقیمانده در واکسن‌ها با هر ترکیب پایدارکننده و در هر سه سری ساخت واکسن تهیه شده، اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد که دامنه RM از ۱/۴۲ تا ۲/۷۲ و در حد قابل قبول (کمتر از ۳٪) (WHO 2012) بوده است که این نقش مثبتی در پایداری واکسن خواهد داشت.

استفاده از آزمایش پایداری تسریع شده اطلاعات مفیدی را نسبت به پایداری واکسن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد فراهم می کند. طبق دستوالعمل OIE (۲۰۱۳) این آزمایش از طریق عیارسنجی واکسن IBV پس از یک هفته قرار دادن آن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود. مشخصه‌ای که هر واکسن در آزمایش پایداری تسریع شده باید داشته باشد این است که عیار واکسن پس از این دوره نباید کمتر از $10^{2,5}$ EID_{50}/dose ($10^{5,5}$ EID_{50}/dose) یا به عبارتی ۱۰ (به ازای هر دوز تزریقی) باشد و این تضمینی برای توانمندی کارآمدی واکسن در زمان تلقیح است (در کشورهای مناطق گرمسیری این مسئله از اهمیت بیشتری برخوردار است). نتایج این تحقیق نشان داد که IBV با پایدارکننده‌های LL, LS و GS واجد این شرایط می‌باشند. آنالیز t.test بررسی پایداری تسریع شده واکسن با پایدارکننده‌ها نشان داد که کاهش عیار ویروس پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای تمام پایدارکننده ها معنی‌دار بود. میانگین کاهش عیار ویروس در سه سری واکسن با پایدارکننده‌ها پس از یک هفته انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نشان داد که LL بهترین اثر حفاظتی را برای واکسن IBV داشته است و پس از آن به ترتیب LS و GS قرار داشتند. Sreenivasa و همکاران نیز در تعیین پایداری واکسن طاعون گاوی در برابر گرما با ترکیبات LL و LS نشان دادند که LL نسبت به LS اثر حفاظتی بهتری بر پایداری ویروس در دماهای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ درجه سانتی‌گراد داشت (Sreenivasa, Bandyopadhyay et al. 1997).

آزمایش پایداری تسریع شده نباید برای تعیین پایداری طولانی مدت واکسن‌ها استفاده شود اما این آزمایش می‌تواند اطلاعات اولیه قابل قبولی در ارتباط با پایداری واکسن‌های جدید در اختیار محقق قرار دهد که بررسی مفیدی در تأیید پایداری طولانی مدت واکسن نیز خواهد بود. عنوان شده است که کاهش عیار ویروس در طی آزمایش پایداری تسریع شده بالاتر از کاهشی است که بعد از ۲۴ ماه نگهداری واکسن در ۴ درجه سانتی‌گراد ایجاد می شود (Peetermans, Colinet et al. 1976).

نتایج تعیین پایداری طولانی مدت واکسن نشان داد که در پایان دوره سه ساله، واکسن با چهار ترکیب پایدارکننده در اغلب موارد عیار قابل قبولی داشتند و این کاهش عیار در مورد پایدارکننده LL از همه کمتر بوده است. آنالیز رگرسیون عیار ویروس در طی این سه سال نشان داد که کاهش عیار

جدول۴- مقایسه عیار واکسن با پایدارکننده‌های متفاوت طی ۶۳ ماه

پایدارکننده	سری تولید	عیار واکسن ($\log_{10}EID_{50}$/ml) در ماه های متفاوت												
		اولیه	۳	۶	۹	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱	۲۴	۲۷	۳۰	۳۳	۳۶
LL	۱	۷/۹	۷/۵	۷/۷	۷/۵	۷/۳	۷/۳	۷/۱	۷/۱	۶/۹	۷/۱	۷/۱	۶/۹	۶/۹
	۲	۷/۵	۷/۵	۷/۷	۷/۵	۷/۳	۷/۳	۷/۵	۷/۳	۶/۹	۷	۶/۹	۶/۹	۶/۷
	۳	۷/۷	۷/۵	۷/۱	۷/۳	۷/۳	۷/۱	۷/۱	۷/۱	۶/۹	۷/۱	۶/۹	۶/۹	۶/۹
LS	۱	۷/۹	۷/۷	۷/۵	۷/۲۵	۷/۵	۷/۳	۷/۵	۷/۳	۷/۱	۷/۳	۷/۱	۵/۹	۶/۹
	۲	۷/۹	۷/۱	۷/۵	۷/۳	۷/۱	۷/۳	۷/۳	۷/۱	۷	۷/۳	۷/۱	۶/۹	۶/۵
	۳	۷/۵	۸	۷/۷	۷	۶/۹	۷/۱	۷/۱	۷/۱	۷/۱	۷/۳	۷/۱	۶/۹	۶/۹
LP	۱	۷/۷	۷/۷	۷/۵	۷/۱	۶/۹	۶/۹	۶/۷	۶/۷	۶/۷	۶/۹	۶/۷	۶/۵	۶/۵
	۲	۸/۱	۷/۵	۷/۱	۷/۱	۷/۱	۶/۹	۶/۵	۶/۷	۶/۵	۶/۷۵	۶/۹	۶/۷	۶/۵
	۳	۷/۷	۷/۷	۷/۵	۷	۷/۱	۶/۹	۶/۹	۶/۷	۶/۵	۶/۹	۶/۷	۶/۵	۶/۵
GS	۱	۷/۷۵	۷/۵۵	۷/۱	۶/۹	۶/۹	۶/۷	۷/۱	۶/۹	۶/۷	۶/۵	۶/۹	۶/۲۵	۶/۳
	۲	۷/۳	۷/۵	۷/۵	۶/۹	۶/۹	۷	۶/۷	۶/۷	۶/۵	۶/۹	۶/۹	۶/۷	۶/۵
	۳	۷/۹	۷/۵	۷/۱	۷/۱	۶/۹	۶/۹	۶/۹	۶/۷	۶/۹	۷/۱	۶/۹	۶/۷	۶/۵

www.SID.ir

Archive of SID

ویروس با تمام پایدارکننده‌ها معنی‌دار بوده اســت. در این بررســی به دلیل اینکه در پایان دوره ســه ساله واکسن با چهار ترکیب پایدارکننده همچنان تیتری بالاتر از حد قابل قبول داشــتند، تعیین تاریخ انقضاء واکسن ممکن نشــد. ولی نتایج نشان داد ۳۶ ماه پس از تولید، واکسن با پایدار کننده LL نسبت به سایر پایدارکننده‌ها عیار بالاتری داشته است.

مقایســه پایدارکننده‌های مورد اســتفاده در این بررســی نشان داد که پایدارکننــده LL بهترین اثر حفاظت‌کنندگی را برای واکســن برونشــیت عفونی طیور داشت و کاهش عیار واکسن با این پایدارکننده در طی پایداری تســریع شده نســبت به ســایرین کمتر بوده است. نتایج نشــان داد که در پایان دوره ســه ساله واکســن با پایدارکننده LL بیشــترین عیار را داشته است. بدین طریق به نظر می‌رسد پایدارکننده لاکتوز-لاکتالبومین می‌تواند گزینه مناســبی به عنوان پایدارکننده برای واکســن برونشیت عفونی طیور باشد. البته برای استفاده نهایی از این ترکیب در تولید واکسن، بررسی‌های بیشتری لازم است از جمله تکرار کلیه این آزمایش‌ها، تعیین توانمندی و بی ضرری واکسن تولیدی در طیور. این مطالعه یک تحقیق اولیه برای بررسی اثر چهار ترکیب پایدارکننده بر روی واکســن برونشیت عفونی طیور بود. در این بررسی واکسن IBV با پایدارکننده‌های لاکتوز-لاکتالبومین، سوکروز-لاکتالبومین، لاکتوز-پپتون و ژلاتین-سوربیتول تهیه گردید. واکسن‌ها پس از فرمولاســیون، تحت یک برنامه واحد لیوفیلیزه شدند. نتایج نشان داد که پایدارکننــده لاکتوز-لاکتالبومیــن می تواند نقــش حفاظتی خوبی بر روی واکســن برونشیت عفونی طیور داشته باشــد. بدین طریق که واکسن تولید شــده با ترکیب لاکتوز-لاکتالبومین تا ۳۶ ماه پس از تولید عیار قابل قبولی داشت.

پاورقی‌ها

1- Infectious Bronchitis Virus

2 - Residual Moisture

منابع مورد استفاده

1- Becker, M.W., Kleinsmith, L.J. and Hardin, J. (2000). Chemistry of the cell." In: The world of the cell, 4th edition. San Francisco: Benjamine, Chapter 2: 17-42.

2- Bovarnick, M.R., Miller, J.C. and Snyder, J.C. (1950). The influence of certain salts, amino acids, sugars, and proteins on the stability of rickettsiae. Journal of Bacteriology, Vol. 59, No. 4, p: 509.

3- Brandau, D.T., Jones, L.S. Wiethoff, C.M., Rexroad, J. and Middaugh, C.R. (2003). Thermal stability of vaccines. Journal of pharmaceutical sciences, Vol. 92, No. 2, pp: 218-231.

4- Cavanagh D. (2007). Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Veterinary Research , Vol. 38, pp: 281-297.

5- Chang, A.C. and Gupta, R.K. (1996). Stabilization of tetanus toxoid in poly (DL□lactic□co□glycolic acid) microspheres for the controlled release of antigen. Journal of pharmaceutical sciences, Vol. 85, No. 2, pp: 129-132.

6- Chun, B.H., Lee, Y.K., Lee, B.C. and Chung, N. (2004). Development of a varicella virus vaccine stabilizer containing no animal-derived component. Biotechnology letters, Vol. 26, No. 10, pp: 807-812.

7- De Rizzo, E., Tenorio, E.C., Mendes, I.F., Fang, F.L., Pral, M.M., Takata, C.S. et al. (1988). Sorbitol-gelatin and glutamic acid-lactose solutions for stabilization of reference preparations of measles virus." Bulletin of the Pan American Health Organization, Vol. 23, No. 3, pp: 299-305.

8- Jackwood, M.W. and Wit, S. (2013). Infectious Bronchitis. In: D.E.Swayne, J.R. Glisson, L. R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez, and V. Nair. Diseases of poultry. 13th Edition. WIELY-BLACKWELL, pp: 202-219.

9- Majer, M., Herrmann, A., Hilfenhaus, J., Reichert, E., Mauler, R. and Hennessen, W. (1976). Freeze-drying of a purified human diploid cell rabies vaccine. Developments in biological standardization, Vol. 36, pp:285-289.

10- Mariner J.C., House J.A., Sollod A.E., Stem C., van den Ende M. and Mebus C.A. (1990). Comparison of the effect of various chemical stabilizers and lyophilization cycles on the thermostability of a Vero cell-adapted rinderpest vaccine. Veterinary microbiology, Vol. 21, No. 3, pp:195-209.

11- Mirchamsy, H., Shafyi, A., Mahinpour, M. and Nazari, P. (1977). Stabilizing effect of magnesium chloride and sucrose on Sabin live polio vaccine. Developments in biological standardization, Vol. 41, pp: 255-257.

12- Office international des epizooties (OIE). Manual of standards for Diagnostic tests and Vaccine. (AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS) Seventh Edition. Chapter 2.3.2: pp: 414-426. 2012.

13- Peek, L.J., Martin, T.T., Elk Nation, C., Pegram, S.A. (2007). Effects of stabilizers on the destabilization of proteins upon adsorption to aluminum salt adjuvants. Journal of pharmaceutical sciences, Vol. 96, No. 3, pp: 547-557.

14- Peetermans, J., Colinet, G., Bouillet, A., d'Hondt, E. and Stephenne, J. (1976). Stability of live, freeze-dried virus vaccines. Developments in biological standardization, Vol. 36, pp: 291-296.

15- Pipkin, P. and Minor, P. (1998). Studies on the loss of infectivity of live type 3 poliovaccine on storage. Biologicals, Vol. 26, No. 1, pp: 17-23.

16- Rahimi-Monazzah, K. (1984). An investigation of the potency of the infectious bronchitis virus in different stabilizing media and at various temperatures. Archive Institute Razi, Vol. 34, No. 35, pp: 33-37.

17- Rexroad, J., Wiethoff, C.M., Jones, L.S. and Middaugh, C.R. (2002). Lyophilization and the thermostability of vaccines. Cell Preservation Technology, Vol. 1, No. 2, pp: 91-104.

www.SID.ir

Archive of SID

18- Samorek-Salmonowicz, E. and Czekaj H. (1993). Effect of lyophilization and storage on B-38 strain of Derzsy's disease virus properties. Medycyna- Weterynaryna, Vol. 49, No. 4, pp: 162-163.

19- Sarkar, J., Sreenivasa, B.P., Singh, R.P., Dhar, P. and Bandyopadhyay, S.K. (2003). Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated peste des petits ruminants (PPR) vaccine. Vaccine, Vol. 21, No. 32, pp: 4728-4735.

20- Setia, S., Mainzer, H., Washington, M.L., Coil, G., Snyder, R. and Weniger, B.G. (2002). Frequency and causes of vaccine wastage. Vaccine , Vol. 20, No. 7, pp: 1148-1156.

21- Sood, D.K., Aggarwal, R.K., Sharma, S.B., Sokhey, J. and Singh, H. (1993). Study on the stability of 17D-204 yellow fever vaccine before and after stabilization. Vaccine , Vol. 11, No. 11, pp: 1124-1128.

22- Sreenivasa, B.P., Bandyopadhyay, S.K. and Joshi, R.C. (1997). Thermostability of rinderpest vaccin virus after adptation of to vero cells. Indian Journal of Animal Sciences , Vol. 67, No. 7, pp: 553-555.

23- Toriniwa, H. and Komiya, T. (2008). Long-term stability of Vero cell-derived inactivated Japanese encephalitis vaccine prepared using serum-free medium. Vaccine , Vol. 26, No. 29, pp: 3680-3689.

24- Zaffran, M. (1995). Vaccine transport and storage: environmental challenges. Developments in biological standardization, Vol. 87, pp: 9-17.

www.SID.ir