

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 فیزیکی‌شیمیایی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

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

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 پایداری طولانی مدت واکسن بروسلوز سویه Rev.1 با دز کاهیده تولید شده در موسسه رازی مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری طبق رفرنس OIE ۲۰۱۵ بصورت تصادفی انجام شد. نمونه‌ها پس از نگهداری در دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد و شرایط بسته‌بندی طبق بروشور واکسن به مدت ۱۱ ماه، به فاصله زمانی یک ماه برای پایداری Real time مورد آزمایش قرار گرفت. در این مطالعه تمامی آزمایش‌های کنترل کیفی و آزمایش‌های فیزیکی‌شیمیایی برای بررسی پایداری Real time این واکسن برای هر ۳ بچ متوالی تا ۱۱ ماه پس از تولید انجام شد، برای تجزیه و تحلیل اطلاعات از میانه، میانگین، واریانس، همبستگی و رگرسیون خطی استفاده شد. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که کلیه بچ‌های مورد مطالعه، پایداری را به مدت ۱۰ ماه منطبق با الزامات (OIE ۲۰۱۵) دارا می‌باشند. اگر در شرایطی که تمامی الزامات مربوط به نگهداری واکسن از جمله شرایط زنجیره سرد رعایت شود این واکسن می‌تواند تا مدت ۱۰ ماه پایداری داشته باشد. لذا طبق الزامات OIE ۲۰۱۵، BP تاریخ انقضاء این واکسن را از ۴ ماه به ۷ ماه می‌توان افزایش داد.

کلمات کلیدی: پایداری، 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; Alamyani 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 vaccine 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

انقضای توسط تولیدکننده تعیین و توسط سازمان دامپزشکی تایید گردد از این جهت موسسه رازی مکلف است تاریخ انقضای محصولات خود را قبل از تولید صنعتی مشخص کند و از طرف دیگر طبق منابع رسمی WHO پایداری واکسن Rev.1 یکسال می‌باشد در حالی که تاریخ انقضای واکسن‌های تولیدی Rev.1 موسسه رازی چهار ماه است، لذا افزایش زمان پایداری واکسن می‌تواند بسیاری از مشکلات بخش تولید را حل کند و درخواست سازمان دامپزشکی که افزایش مدت نگهداری واکسن است را پاسخ مثبت دهد (۱)، به همین جهت در این مطالعه، پایداری واکسن بروسلاز سویه Rev.1 با دز کاهیده به عنوان یک واکسن جدید مورد بررسی قرار گرفت تا با استفاده از نتایج حاصل از این مطالعه، تاریخ انقضای این واکسن را در صورت داشتن استانداردهای ارائه شده توسط رفرانس‌های بین‌المللی افزایش داد.

مواد و روش کار

در این تحقیق پایداری Real time برای ۳ بچ متوالی از واکسن‌های بروسلاز سویه Rev.1 با دز کاهیده ساخته شده در موسسه رازی به عنوان یک واکسن جدید برای پیشگیری از بروسلاز گوسفندی در ایران مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری از هر بچ طبق رفرانس OIE ۲۰۱۵ به صورت تصادفی انجام شد، و نمونه‌ها پس از نگهداری در دمای ۲-۸

مقدمه

بروسلاز یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است که با تب در انسان و سقط جنین در دام همراه است (۴). عامل این بیماری کوکوباسیل گرم منفی داخل سلولی اختیاری است (۳)، این جنس به ۶ گونه کلاسیک بروسلا سوئیس، بروسلا آورتوس، بروسلا نتوتومه، بروسلا اویس، بروسلا کانیس و بروسلا بویس تقسیم می‌شود (۷). در میان اعضای جنس بروسلا ۹۴ درصد قرابت ژنتیکی وجود دارد (۲). بیماری بروسلاز در گونه‌های مختلف گوسفند گزارش شده است (۱۵). واکسیناسیون گوسفندها از مهم‌ترین راهکارهای پیشگیری از این بیماری در این گونه میزبان باشد و واکسن Rev.1 از جمله بهترین و با ارزش‌ترین واکسن‌های موجود برای پیشگیری و کنترل بروسلاز گوسفند و بز می‌باشد که توسط سازمان‌های معتبر بین‌المللی از جمله WHO و OIE و FAO به رسمیت شناخته شده است (۱۱،۱۲،۱۳،۱۴). موثر بودن این واکسن توسط محققین کشور و با همکاری سازمان بهداشت جهانی در شرایط اقلیمی ایران بر روی نژادهای گوسفند و بز ایرانی به اثبات رسیده است، بطوری‌که از سال ۱۳۴۱ که تولید واکسن و واکسیناسیون Rev.1 در کشور آغاز شده، میزان شیوع بیماری از میزان ۴۵ درصد به ۱،۸ درصد تقلیل یافته است (۶). طبق الزامات سازمان دامپزشکی به عنوان ناظر ملی و صادرکننده مجوز تولید واکسن‌های دامپزشکی، قبل از تولید صنعتی واکسن بایستی تاریخ

را به خود می‌گیرند و آبی می‌شوند. تعداد باکتری‌های که رنگ کریستال ویوله را به خود نمی‌گیرند و صاف هستند باید بیشتر یا مساوی ۹۵ درصد باشند (۸).

Identity test: برای انجام این تست از محیط کشت بروسلا آگار حاوی پنی سیلین و استرپتومایسین استفاده شد، به این صورت که از واکسن بروسلاز سویه Rev.1 سوسپانسیون تهیه شد و داخل پلیت‌های بروسلا آگار حاوی پنی‌سیلین و استرپتومایسین بصورت چمنی کشت داده شد، نتایج آزمایش بعد از ۵ روز قرائت شد پراکنه‌های بروسلاز سویه Rev.1 در محیط کشت پنی‌سیلین نباید رشد کند و در محیط کشت حاوی استرپتومایسین باید رشد کند (۸).

Purity test: برای انجام این آزمایش از محیط کشت بروسلا آگار و بلاز آگار ساخت کمپانی مرک آلمان استفاده شد، به این صورت که ۱ میلی‌لیتر PBS استریل به هر کدام از ویال‌های واکسن مورد نظر اضافه شد و بعد از ورتکس کردن تمام محتویات هر ویال بر روی محیط کشت بروسلا آگار و بلاز آگار بصورت چمنی کشت داده شد، تمام نمونه‌ها در طی دوره مطالعه باید عاری از هر گونه آلودگی باکتریایی و قارچی باشند (۸).

Vacuum test: وجود خلاء با استفاده از یک سرنگ ۵ml حاوی ۵ml آب مقطر مورد بررسی قرار می‌گیرد، ویال واکسن باید داری خلاء و مکش آب مقطر به داخل ویال باشد.

Appearance test: شکل ظاهری ویال واکسن و محتویات داخل آن بصورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت. محتویات داخل ویال باید بصورت قرص سفید متمایل به زرد باشد.

درجه سانتی‌گراد و شرایط بسته‌بندی طبق بروشور واکسن به مدت ۱۱ ماه به فاصله زمانی یک ماه برای پایداری Real time مورد آزمایش قرار گرفت در این مطالعه تمامی آزمایش‌های کنترل کیفی شامل Viable germ, Identity, Purity, Dissociation (Roughness Appearance, Airtight ness, Moisture content, Solubility, شیمیایی Vacuum test برای بررسی پایداری Real time این واکسن برای هر ۳ بچ تا ۱۱ ماه پس از تولید انجام شد، برای تجزیه و تحلیل اطلاعات از میانه، میانگین، واریانس، دامنه تغییرات، همبستگی و رگرسیون خطی استفاده شد.

Viable germ test: برای انجام این آزمایش از محیط کشت بروسلا آگار ساخت کمپانی مرک آلمان استفاده شد، به این صورت که هر ماه از نمونه آماری مورد نظر ۳ ویال انتخاب شده و از آن‌ها رقت سریالی تهیه شد و رقت‌های 10^{-7} و 10^{-8} در محیط کشت بروسلا آگار به صورت جداگانه و چمنی در ۵ پلیت کشت داده شد و بعد از ۶ روز تعداد کلنی‌های هر رقت شمارش شده و میانگین آن‌ها قرائت شد. میانگین تعداد باکتری موجود در هر دز واکسن باید بین $10^6 \times 3 - 0.5$ (CFU/dose) باشد (۸). Dissociation test: برای انجام این آزمایش از رنگ کریستال ویوله و محیط کشت بروسلا آگار استفاده شده در آزمایش Viable germ استفاده شد، بعد از قرائت شمارش کلنی، پرکنه‌های بروسلاز به وسیله رنگ کریستال ویوله برای تشخیص صاف یا خشن بودن باکتری مورد بررسی قرار گرفت، پرکنه صاف رنگ کریستال ویوله را به خود نمی‌گیرند و سفید متمایل به زرد (کرم) می‌مانند و پراکنه‌های خشن رنگ کریستال ویوله

جدول ۱- اطلاعات مربوط به بررسی مقدار رطوبت در دوره‌های 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 | $\leq W/V \%$ 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 | $\leq W/V \%$ ۴ | % ۲/۵ | % ۱/۵۹ | % ۱/۵۲ | % ۲ | % ۲/۴۶ | % ۲/۱۱ | % ۱/۵۳ | % ۱/۹۸ | % ۱/۸۸ | % ۲ | % ۲/۱۶ | % ۲/۵۸ |
| ۳ | $\leq W/V \%$ 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 |

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

| شماره واکسن | مقدار استاندارد cfu/dose | 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 | $0.5-3 \times 10^6$ | 3×10^6 | $2/52 \times 10^6$ | $2/9 \times 10^6$ | $1/69 \times 10^6$ | $1/35 \times 10^6$ | $0/9 \times 10^6$ | $1/37 \times 10^6$ | $1/04 \times 10^6$ | $1/26 \times 10^6$ | $0/87 \times 10^6$ | $0/57 \times 10^6$ | $0/49 \times 10^6$ |
| ۲ | $0.5-3 \times 10^6$ | $2/45 \times 10^6$ | $2/1 \times 10^6$ | $2/22 \times 10^6$ | $1/86 \times 10^6$ | $1/54 \times 10^6$ | $1/77 \times 10^6$ | $1/75 \times 10^6$ | $1/14 \times 10^6$ | $1/31 \times 10^6$ | $0/89 \times 10^6$ | $0/66 \times 10^6$ | $0/49 \times 10^6$ |
| ۳ | $0.5-3 \times 10^6$ | $2/14 \times 10^6$ | $1/98 \times 10^6$ | $2/04 \times 10^6$ | $1/1 \times 10^6$ | $1/14 \times 10^6$ | $0/94 \times 10^6$ | $0/87 \times 10^6$ | $1/03 \times 10^6$ | $0/75 \times 10^6$ | $0/87 \times 10^6$ | $0/53 \times 10^6$ | $0/28 \times 10^6$ |

Solubility test: سوسپانسیون تهیه شده از واکسن بصورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت، مواد غیر محلول نباید در سوسپانسیون واکسن وجود داشته باشد.

Moisture content test: برای اندازه‌گیری رطوبت از دستگاه کارال فیشر گلو متریک استفاده شد، این دستگاه رطوبت موجود در ویال واکسن را به کمک محلول کارل فیشر اندازه‌گیری می‌کند، در این روش به طور مستقیم توسط الکتروود مولد تولید و پس از واکنش با آب نقطه پایانی توسط الکتروود دابل - پلاتینی به طریق ولتامتری شناسایی و میزان آب فرآورده بر حسب PPM گزارش و محاسبه شد. (۱۰).

نتایج

نتایج حاصل از پژوهش به کمک آمار توصیفی شامل جدول، نمودار، میانه، میانگین، واریانس و دامنه تغییرات و آمار استنباطی شامل همبستگی و رگرسیون خطی مورد تجزیه و تحلیل 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 جدول ۲، ضریب همبستگی خطی بین مدت زمان پایداری و رطوبت موجود در واکسن برای بچ اول برابر با $r=0/246$ می‌باشد، چون r محاسبه شده ($0/246$) کوچکتر از ضریب همبستگی ($N=11$) 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 جدول ۲، ضریب همبستگی خطی بین مدت زمان پایداری و رطوبت موجود در واکسن برای بچ دوم برابر با $r=0/232$ می‌باشد، چون r محاسبه شده ($0/232$) کوچکتر از ضریب همبستگی ($N=11$) 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 جدول ۲، ضریب همبستگی خطی بین مدت زمان پایداری و رطوبت موجود در واکسن برای بچ سوم برابر با $r=0/419$ می‌باشد، چون r محاسبه شده ($0/419$) کوچکتر از ضریب همبستگی ($N=11$) 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 $10^6 \times 1,47$ ، $1,51$ ، $1,13$ ، 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 جدول ۴، ضریب همبستگی خطی بین مدت زمان پایداری و مقدار جرم زنده واکسن برای بچ اول برابر با $r=-0/897$ می‌باشد، چون r محاسبه شده ($0/897$) بزرگتر از ضریب همبستگی ($N=11$) در سطح

r محاسبه شده (۰/۹۱۹) بزرگتر از ضریب همبستگی ($N=11$) 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

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 جدول ۴، 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 ($N=11$) 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 جدول ۴، ضریب همبستگی خطی بین مدت زمان پایداری و مقدار جرم زنده واکسن برای بچ سوم برابر با $r = -۰/۹۱۹$ می‌باشد، چون

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

| شماره بچ واکسن | ضریب تعیین | ضریب همبستگی مشاهده شده | ضریب همبستگی ($N=11$) | 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 |

با توجه به جدول ۶، نتایج حاصل از رگرسیون بین مدت زمان پایداری و میزان جرم زنده واکسن برای بچ دوم $p = 0/0000$ 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.

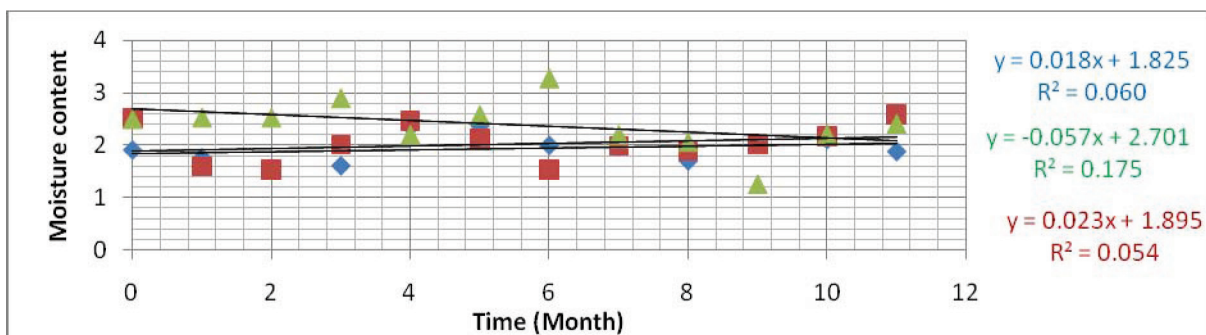
با توجه به جدول ۶، نتایج حاصل از رگرسیون بین مدت زمان پایداری و میزان جرم زنده واکسن برای بچ سوم $p = 0/0002$ را نشان می‌دهد که در سطح معناداری ۱ درصد ارتباط معناداری بین دو متغیر مذکور وجود دارد در نتیجه به احتمال ۹۹ درصد می‌توان میزان پایداری را از روی میزان جرم زنده واکسن برای بچ سوم پیش بینی کرد.

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.

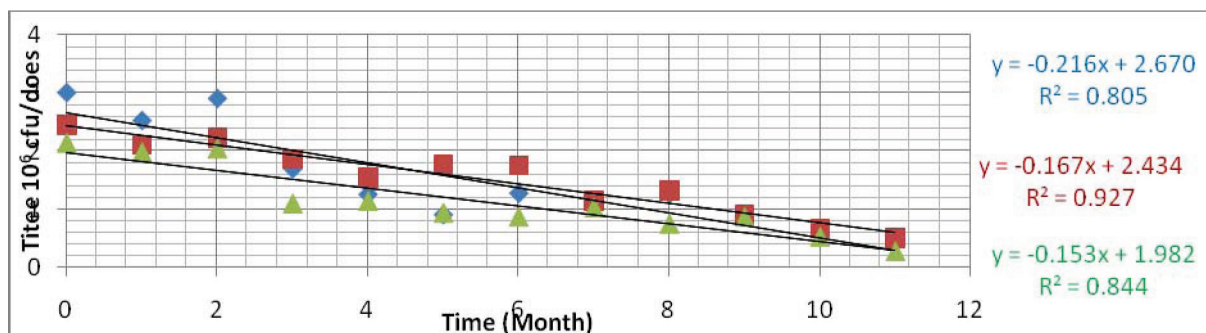
معناداری ۱ درصد ارتباط معناداری بین دو متغیر مذکور وجود ندارد در نتیجه به احتمال ۹۹ درصد نمی‌توان میزان پایداری را از روی رطوبت واکسن برای بچ دوم پیش بینی کرد.

با توجه به جدول ۵، نتایج حاصل از رگرسیون بین مدت زمان پایداری و رطوبت واکسن برای بچ سوم $p = 0/176$ 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 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 $p = 0/0006$ 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.



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

نتایج پژوهش حاضر هم‌راستا نیست (۵)، با توجه به اینکه اخیراً تغییراتی در روند لیوفلیزاسیون و دستگاه‌های لیوفلیزاتور همچنین بهبودی که در دستگاه‌های لیوفلیزاتور انجام شده است رطوبت موجود در ویال در طول دوره انقضاء واکسن افزایش نمی‌یابد و این عدم هم‌راستا بودن تحقیق حسن‌نیا و همکاران با پژوهش حاضر می‌تواند به دلیل همین تغییرات باشد.

نتایج همبستگی خطی نشان می‌دهد که بین دو متغیر مدت زمان پایداری واکسن و میزان جرم زنده واکسن رابطه همبستگی قوی معکوسی وجود دارد، ضریب همبستگی برای ۳ بچ نمونه آماری به ترتیب برابر است با $r = -0.897$ ، $r = -0.962$ و $r = -0.919$ که نشان‌دهنده ارتباط معنادار بین مدت زمان پایداری واکسن و میزان جرم زنده واکسن است.

همچنین مقدار p در رگرسیون بین میزان مدت زمان پایداری و میزان جرم زنده واکسن برای ۳ بچ نمونه آماری به ترتیب برابر است $p = 0.0006$ ، $p = 0.0002$ و $p = 0.0000$ که نشان‌دهنده ارتباط معنادار بین دو متغیر مدت زمان پایداری و میزان جرم زنده واکسن است، لذا با توجه به اطلاعات استخراج شده از رگرسیون خطی می‌توان مدت زمان پایداری واکسن را از روی میزان جرم زنده واکسن پیش‌بینی کرد. حسن‌نیا و همکاران در بررسی میزان جرم زنده واکسن IRIBA با دوز کاهشدهنده ضریب تعیین بین مدت زمان پایداری واکسن و میزان جرم زنده واکسن برای ۳ بچ نمونه آماری به ترتیب $R^2 = 0.925$ ، $R^2 = 0.929$ ، $R^2 = 0.981$ را معرفی کرده‌اند که با نتایج پژوهش حاضر هم‌راستا است (۵).

بهترین ترکیب نگهدارنده برای واکسن Rev1 شامل ترکیب باکتوکازیتون ۲/۵٪، ساکارز ۵٪ و آل گلوتامیک اسید ۱٪ می‌باشد (۸). در تحقیقی که بهروزی‌خواه و همکاران انجام داده‌اند همین ترکیب ارائه شده توسط OIE به عنوان بهترین ترکیب برای نگهداری واکسن Rev.1 معرفی کرده‌اند (۱). لذا پیشنهاد می‌شود که برای افزایش مدت زمان پایداری واکسن، تحقیقات مختلفی بر روی دستگاه‌های لیوفلیزاتور، نوع ویال و درپوش پلاستیکی و آلومینیومی واکسن انجام شود، از طرف دیگر چون کمپانی‌های مختلف دنیا از جمله کمپانی CZV کشور اسپانیا واکسن Rev.1 دز کاهشدهنده را بصورت ۵ دزی تولید می‌کند و تاریخ انقضاء واکسن را یکسال معرفی کرده‌اند، لذا به بخش تولیدی واکسن بروسلوز موسسه رازی پیشنهاد می‌شود که در تحقیقات دیگر واکسن Rev.1 دز کاهشدهنده را بصورت آزمایشی در ویال‌های ۵ دزی تولید کند و پایداری آن را مورد بررسی قرار دهد.

حسن‌نیا و همکاران در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که واکسن بروسلوز سویه IRIBA در مدت ۲۴ ماه بعد از تولید، با اینکه میزان رطوبت آن در سال دوم افزایش می‌یابد، ولی الزامات ارائه شده توسط OIE در ارتباط با جرم زنده واکسن را دارا می‌باشد و بهترین زمان مصرف برای این واکسن را ۱ سال گزارش کردند (۵). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که واکسن بروسلوز سویه Rev1 با دز کاهشدهنده تمامی الزامات لازم منطبق با الزامات (OIE ۲۰۱۵) در مدت ۱۰ ماه را دارا می‌باشند در شرایطی که تمامی الزامات مربوط به نگهداری واکسن از جمله شرایط زنجیره سرد رعایت شود این واکسن می‌تواند تا مدت ۱۰ ماه پایدار باشد، با توجه به الزامات استانداردهای OIE ۲۰۱۵ و BP ۲۰۱۵، تاریخ انقضاء واکسن باید حداقل ۳ ماه کمتر از مدت زمان پایداری واکسن باشد (۱۷،۹).

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 نمونه‌های 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 نتیجه‌گیری

فاطمی و همکاران در پژوهش خود تحت عنوان بررسی پایداری واکسن Rev.1 با ارزیابی میزان جرم زنده، به این نتیجه رسیدند که تمامی نمونه‌های بررسی شده در زمان تحویل از موسسه رازی واجد جرم زنده در حد استاندارد $CFU/dose = 3 \times 10^6 - 3 \times 10^5$ در هر دز واکسن بر اساس توصیه ارائه شده توسط OIE بودند نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های فاطمی و همکاران هم‌راستا است (۱۵)، در بررسی بروسلوز سویه Rev.1 که توسط فاطمی و همکاران در سال ۲۰۱۵ تا پایان تاریخ انقضاء واکسن (۴ ماه) انجام شده، نتایج به این صورت گزارش شد که تمامی نمونه مورد بررسی دارای جرم زنده در حد استاندارد بودند، نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های پژوهش فاطمی و همکاران هم‌راستا است (۱۶). فاطمی و همکاران در بررسی رطوبت واکسن‌های بروسلوز سویه Rev.1 به این نتیجه رسیدند که متوسط رطوبت واکسن‌های لیوفلیزه در موسسه رازی ۳/۷۴ درصد است (۱۶). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که میانگین رطوبت نمونه پژوهشی حاضر ۲/۰۷ درصد است که در استاندارد تعیین شده توسط OIE ۲۰۱۵ قرار دارد، لازم به ذکر است که این واکسن از نظر میزان رطوبت در طول مدت مطالعه در محدوده رطوبت قابل قبول بوده است.

نتایج همبستگی خطی نشان می‌دهد که بین دو متغیر مدت زمان پایداری واکسن و رطوبت موجود در واکسن (در محدوده قابل قبول رطوبت) رابطه همبستگی معناداری وجود ندارد، ضریب همبستگی برای ۳ بچ نمونه آماری به ترتیب برابر است با $r = 0.246$ ، $r = 0.246$ ، $r = 0.246$ که نشان‌دهنده عدم ارتباط معنادار بین رطوبت و مدت زمان پایداری واکسن است. همچنین مقدار p در رگرسیون بین میزان رطوبت و مدت زمان پایداری واکسن برای ۳ بچ نمونه آماری به ترتیب برابر است $p = 0.430$ ، $p = 0.88$ و $p = 0.176$ که نشان‌دهنده عدم ارتباط معنادار بین دو متغیر مدت زمان پایداری و میزان رطوبت واکسن است، لذا با توجه به اطلاعات استخراج شده از رگرسیون خطی نمی‌توان مدت زمان پایداری واکسن را از روی رطوبت پیش‌بینی کرد. حسن‌نیا و همکاران در بررسی رطوبت واکسن Iriba دوز کاهشدهنده ضریب تعیین بین میزان رطوبت و مدت زمان پایداری واکسن برای ۳ بچ نمونه آماری به ترتیب $R^2 = 0.920$ ، $R^2 = 0.970$ ، $R^2 = 0.952$ را معرفی کرده‌اند که با

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 official 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.

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 قدردانی

این مقاله از طرح بررسی پایداری واکسن بروسلوز، که در موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی انجام شده، استخراج شده است، از پرسنل محترم بخش تولیدی بروسلوز و مدیریت کنترل کیفی که بنده را در انجام این پژوهش یاری کرده‌اند نهایت تشکر و قدردانی 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., Behroozikhah, 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*

