



مقاله علمی - پژوهشی:

بررسی تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال IgG در پاسخ به تزریق ویروس کشته شده سیتی‌سمی خونریزی دهنده (VHSV) ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در خرگوش *Oryctolagus cuniculus* به منظور تولید کیت تشخیص سریع

معصومه حافظیه^۱، محدث قاسمی^{۲*}، شاپور کاکولکی^{۳*}، رضا کاظم‌پور^۴

*mohades@yahoo.com; bsh443@gmail.com

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، بندرانزلی، ایران

۳- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۴- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رودهن، رودهن، ایران

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۰

چکیده

آبی‌پروری به یکی از بخش‌های پایدار، دارای آینده‌ای روشن و امیدبخش برای تامین و تضمین امنیت غذای انسان تبدیل شده که ب‌دلیل نیاز به افزایش تولید این غذای سلامتی، پرورش متراکم‌آبزیان مورد استقبال قرار گرفته است که این موضوع می‌تواند آبزیان را مستعد بیماری به‌خصوص انواع ویروسی کند. در سال‌های گذشته بیماری ویروسی VHS خسارات جبران‌ناپذیری به تولید کنندگان ماهی قزل‌آلای کشور وارد نمود. تشخیص سریع بیماری و حذف سریع ماهیان آلوده در مراحل اولیه بیماری، برای کنترل موثر شیوع بیماری و کاهش هدر رفت هزینه‌ها امری ضروری است که کیت‌های تشخیص سریع در این خصوص کاربرد خواهند داشت. این کیت‌ها بر پایه آنتی‌بادی ساخته می‌شوند که در این پروژه تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال IgG علیه ویروس VHS در مدل حیوانی خرگوش نیوزلندی (*Oryctolagus cuniculus*) مورد تحقیق و بررسی قرار گرفت. بدین منظور، از استوک ویروس VHSV-Ia سویه DK-5151 با کد بانک ژنی (GenBank Accession No: AF345859) تهیه شده از آزمایشگاه رفرنس اروپا پس از آماده‌سازی به عنوان آنتی‌ژن جهت تحریک سیستم ایمنی با آدجوانت کامل فروند در ۴ تیمار شامل کنترل منفی آب مقطر، تیمار یک، با غلظت ۱ سی‌سی ویروس کامل، تیمار دو، با غلظت ۰/۵ سی‌سی ویروس و ۰/۵ سی‌سی آدجوانت فروند، تیمار سه، با غلظت ۷۵ صدم ویروس و ۲۵ صدم آدجوانت، تیمار چهار با غلظت ۲۵ صدم ویروس و ۷۵ صدم آدجوانت، به مدت چهار ماه، هر ماه یکبار به صورت IM به ۵ گروه سه تایی خرگوش‌های نیوزلندی تزریق، بعد از ۱۵ روز، نسبت خون‌گیری از ورید کناری گوش اقدام و جذب نوری آنتی‌بادی (OD) اندازه‌گیری گردید که در طول ۴ بار خونگیری میزان جذب نوری آنتی‌بادی IgG در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) نشان داد. سپس تخلیص آنتی‌بادی از طریق ستون کروماتوگرافی جذبی پروتئین G سفارز فعال شده (Sephacrose® 4B) انجام و OD آنتی‌بادی‌های تخلیص شده با دستگاه Nano 200- Ver1.0 در طول موج ۲۸۰ نانومتر به‌ترتیب در تیمار دوم ۲/۶۰ و تیمار سوم ۲/۳۸ و غلظت آنتی‌بادی به‌ترتیب ۰/۱۵ ± ۰/۸۲ و ۰/۱۲ ± ۰/۶۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. قرار است از این آنتی‌بادی در کیت تشخیص سریع این بیماری استفاده گردد.

لغات کلیدی: قزل‌آلای رنگین کمان، ویروس سیتی‌سمی خونریزی دهنده، آنتی‌بادی پلی‌کلونال، کیت تشخیص سریع

*نویسنده مسئول

مقدمه

آبزی‌پروری به یکی از بخش‌های پایدار، دارای آینده‌ای روشن و امیدبخش برای تامین و تضمین امنیت غذای انسان تبدیل شده که به دلیل نیاز به افزایش تولید این غذای سالم، پرورش متراکم آبزیان مورد استقبال قرار گرفته است که این موضوع باعث بروز بسیاری از بیماری‌ها به‌خصوص انواع ویروسی شده است. در سال‌های گذشته بیماری ویروسی VHS خسارات جبران‌ناپذیری به تولید کنندگان ماهی قزل‌آلای کشور وارد نمود.

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از مهم‌ترین گونه‌های خانواده آزادماهیان شمال شرقی منطقه اقیانوس آرام است که از مکزیک تا کامچاتکای پنیسلوانیا پراکنش دارد. این گونه به بسیاری از کشورهای جهان از جمله ژاپن، اروپا، آفریقا، آسیای جنوب شرقی، استرالیا و نیوزیلند معرفی شده است. قزل‌آلای رنگین‌کمان به دلیل قابلیت زیاد سازگاری با شرایط محیط اطراف خود به این گسترش وسیع جهانی دست یافته است و در بسیاری از کشورهای جهان پرورش داده می‌شود (Fornshell, 2002).

در ایران، پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان از سال ۱۳۳۹ در کارگاه ماهی سرای کرج با ظرفیت ۱۲۰ تن آغاز شد. (آذری تاکامی، ۱۳۶۳). اما امروزه این ماهی تقریباً در تمام استان‌های کشور پرورش می‌یابد و با توجه به اقتصادی بودن تولید، از قابلیت اشتغال‌زایی مستقیم و غیر مستقیم بالایی برخوردار است. ولید ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در ایران در افق سال ۱۴۰۴ حدود ۴۰۲ هزار تن پیش‌بینی شده است. واردات تخم چشم زده این ماهی از سایر کشورهای و انتقال بدون ضابطه بچه ماهی و تخم چشم زده از استانی به استان دیگر موجب انتقال ناخواسته برخی از بیماری‌ها نظیر بیماری نکروز عفونی لوزالمعده (IPN¹)، سپتی‌سمی ویروسی خونریزی‌دهنده (VHS²) و نکروز عفونی بافت خونساز (IPN³) و نیز بروز خسارت‌های مهلک ه پرورش دهندگان در کشور شده است (ذریه زهرا و همکاران، ۱۳۹۹).

VHS، یک رابدوویروس از جنس نووی ویروس (خانواده رابدوویریده) و عامل ایجاد کننده سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است. این ویروس دارای ۴ ژنوتیپ اصلی و ۳ سروتیپ است (Tordo et al., 2005). ویروس VHS جدی‌ترین بیماری ماهیان قزل‌آلای پرورشی در اروپا می‌باشد (Wolf, 1988). از اوایل دهه ۱۹۰۰ به‌خوبی شناخته شده است، VHS تا سال ۱۹۸۸ به عنوان یک بیماری مختص به قزل‌آلای رنگین‌کمان در اروپا (Meyers and Winton, 1995) مطرح بود. از آن به بعد از طریق برنامه‌های نظارتی منظم، دامنه میزبانی VHSV به طور گسترده‌ای گسترش یافته است و شامل چندین خانواده ماهی مانند سالمونیده (Salmonidae)، اردک ماهیان (Esocidae)، شگ ماهیان (Clupidae)، کفشک ماهیان (Pleuronectidae) و روغن ماهیان (Gadidae) می‌باشد (OIE, 2021) و دامنه میزبانی برای این ویروس بسیار وسیع است. این بیماری جزو بیماری‌های فهرست‌شده سازمان بهداشت جهانی دام بوده و به‌نوعی بیماری اول صنعت پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان در دنیا به‌شمار می‌رود. بیشتر آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال علیه تایپ ۱ ویروس VHS در تست مستقیم آنتی‌بادی فلوئورسنت و الیزا با همه سویه‌های این ویروس واکنش متقاطع دارند. در تست خنثی‌سازی، ویروس VHS با توجه به الگوهای خنثی‌سازی در برابر ۴ آنتی‌بادی مونوکلونال و ۱ آنتی‌بادی پلی‌کلونال به ۳ زیر گروه تقسیم می‌شوند. بنابراین، ویروس VHS اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنی زیادی را به اشتراک می‌گذارد اگرچه گروه سروتیپی با ژنوتیپ‌های شناسایی شده با استفاده از تجزیه و تحلیل توالی اسید نوکلئیک ارتباط ندارد. سازمان دامپزشکی این بیماری را نخستین بار در کشور در سال ۱۳۸۳ با شروع پایش و مراقبت‌های قزل‌آلای پرورشی شناسایی نمود و در سال ۱۳۸۵ به طور رسمی به سازمان جهانی بهداشت دام گزارش شد. طغیان‌های بیماری با اقدامات کنترلی، معدوم سازی و ضد عفونی کردن کاهش یافت و تا ۷ سال مشاهده نشد، اما در سال ۱۳۹۲ مجدداً وقوع بیماری در حدود ۶۰

³ Infectious Hematopoietic Necrosis

¹ Infectious Pancreatic Necrosis

² Virous Hemorrhagic Septicemia

(Brown, 2009). هدف از این تحقیق بررسی تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال IgG در پاسخ به تزریق ویروس کشته شده سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده (VHSV) ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در خرگوش (*Oryctolagus cuniculus*) به منظور تولید کیت تشخیص سریع می‌باشد.

در تئوری، هر گونه مهره‌داری می‌تواند برای تولید آنتی‌بادی استفاده شود، اما در عمل گونه‌های حیوانی پست استفاده نمی‌شود. اغلب از حیوانات آزمایشگاهی مانند موش، رت یا خرگوش استفاده می‌شود که قابل دسترس و امکان نگهداری و رشد و تکثیر مناسب دارند. باید توجه داشت، هرچه حیوانی که آنتی‌بادی در آن تهیه می‌شود با منبع آنتی ژن (حیوانی که آنتی ژن از آن تهیه شده است)، بیگانه‌تر باشد، پاسخ ایمنی در حیوان تولید کننده آنتی‌بادی شدیدتر خواهد بود. در این تحقیق به حیوانی بزرگ جثه با حجم خونی بالا جهت اخذ خون و تهیه آنتی‌بادی پلی‌کلونال به مقدار مناسب نیاز می‌باشد که در بین حیوانات آزمایشگاهی خرگوش با حجم خون ۴۵-۷۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم مقدار مناسبی سرم در اختیار قرار می‌دهد. برای تولید آنتی‌بادی کلونال بر ضد آنتی ژن VHS از ۱۵ خرگوش نژاد نیوزلندی (*Oryctolagus cuniculus*) استفاده شد. خرگوش‌ها را در ۴ گروه که در هر گروه ۳ خرگوش تیمار وجود دارد، تقسیم شد. همچنین برای اطمینان از نتیجه نهایی کار از یک گروه کنترل استفاده استفاده شد و در مجموع، ۵ گروه خرگوش جهت تزریقات مقادیر مختلف آنتی ژن و آدجوانت مورد مراقبت قرار گرفت. در این تحقیق برای بررسی انواع حالات غلظت‌های ویروس و آدجوانت را تغییر داده تا در نهایت مناسب‌ترین دوز از ویروس و آدجوانت را با بیشترین پاسخ ایمنی یافت گردد. این روش بر اساس روش فولادساز (۱۳۷۸) با حداقل ویرایش صورت انجام گرفت.

درصد استان‌های کشور گزارش شد (بکایی و همکاران، ۱۳۹۶). با توجه به اینکه ایران دارای رتبه نخست در تولید ماهی قزل‌آلا بوده و این نیز میزان ویروس عامل بیماری VHS بوده و با توجه به خسارات و زیان‌های بالای اقتصادی که به مزارع پرورش ماهی قزل‌آلا وارد کرده است، بر آن شدیم تا با تهیه آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه ویروس VHS در راستای تولید کیت تشخیص سریع این بیماری عمل کنیم. آنتی‌بادی‌ها، گروهی از گلیکوپروتئین‌ها هستند که در بسیاری از مایعات بدن حیوانات از جمله پلاسما، اشک، ترشحات دستگاه تنفس، بزاق، ترشحات روده، ادرار و شیر یافت می‌شوند؛ اما بیشترین غلظت در پلاسماست. ایمونوگلوبولین‌ها به‌وسیله پلاسماسل‌ها (پلاسماوسیت‌ها) تولید می‌شوند و خود این سلول‌ها نیز حاصل از تمایز سلول B (متعاقب برخورد با آنتی‌ژن) هستند. پنج کلاس اصلی آنتی‌بادی‌ها که این کلاس‌ها را ایزوتایپ نیز می‌نامند، شامل IgG، IgE، IgD، IgA و IgM می‌باشند. از میان این ۵ کلاس، IgG مهم‌ترین کلاس آنتی‌بادی محسوب می‌شود. در سیستم‌های سنجش ایمنی عموماً از ایمونوگلوبولین G (IgG) استفاده می‌شود. این ایمونوگلوبولین علاوه بر اپسونیزاسیون، آگلوتیناسیون و پرسپیتاسیون آنتی‌ژن‌ها، خاصیت آنتی‌توکسینی نیز دارد. IgG مهم‌ترین آنتی‌بادی در پاسخ ایمنی ثانویه بر علیه آنتی‌ژن‌های وابسته به تیموس می‌باشد. به عبارت دیگر، اگر این نوع آنتی‌ژن‌ها برای بار دوم وارد بدن شوند، IgG آنتی‌بادی اصلی است که بر علیه آنها ساخته می‌شود. IgG به شکل مونومر و بیشترین ایمونوگلوبولین خون است (Roitt, 1994). این مولکول Y شکل بوده که در دو انتهای شاخه‌های بالایی آن دوجایگاه^۱ اتصال به آنتی‌ژن وجود دارد. یک ویژگی اساسی و بسیار مهم برای تمامی آنتی‌بادی‌ها این است که قادرند به صورت اختصاصی آنتی‌ژن‌های خاص را شناسایی نمایند. این ویژگی مهم‌ترین دلیل استفاده از آنتی‌بادی‌ها در سیستم‌های سنجش سریع است. آنتی‌بادی‌ها به دو شکل پلی‌کلونال یا مونوکلونال می‌باشند. اساس طبقه‌بندی براساس شیوه تولید این آنتی‌بادی‌هاست

^۱light chain

مواد و روش ها

تهیه و آماده سازی ویروس

تهیه و آماده سازی ویروس در آزمایشگاه ویروس شناسی پژوهشکده آبی پروری آبهای داخلی بندر انزلی انجام گرفته است. ابتدا از استوک ویروس VHSV-Ia سویه DK-5151 با کد بانک ژنی (GenBank Accession No: AF345859) تهیه شده از آزمایشگاه رفرانس اروپا کشور دانمارک استفاده شد. در آزمایشگاه ویروس شناسی ابتدا ۹/۶ گرم پودر محیط کشت Eagle's minimum essential (EMEM medium) حاوی L-Glutamine به همراه ساخت شرکت Gibco به همراه FBS ۱۰٪ (albumin) به همراه IU/ml ۱۰۰ استروپتومایسین و ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر پنی سیلین تهیه و با فیلتر ۰/۲ میکرومتر ساخت شرکت CHEM Lab فیلتر گردید و در زیر هود میکروبیولوژی استریل و پس از اطمینان از pH خنثی جهت تهیه کشت سلولی تک لایه مورد استفاده قرار گرفت. سپس این مواد به فلاسک های رده سلولی تک لایه EPC که تیره سلولی پیشنهادی سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE) به منظور تکثیر و تیتراسیون VHSV است، اضافه گردید (OIE, 2021). سپس فلاسک ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری گردیده و پس از این مدت جهت بررسی رشد سلول ها و تشکیل تک لایه، زیر میکروسکوپ معکوس (Invert) مورد بررسی قرار گرفتند. پس از کسب اطمینان از رشد مناسب سلول ها، محیط کشت EMEM به همراه FBS را از فلاسک ها خارج کرده و مجدداً محیط کشت EMEM فاقد FBS به فلاسک حاوی رده سلولی EPC افزوده و همه فلاسک ها در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. در مرحله بعد پس از افزودن آب مقطر استریل به استوک لیوفیلیزه ویروس VHS عمل فیلتراسیون با استفاده از فیلترهای سرسرنگی ۰/۴۵ میکرومتر صورت گرفت و سپس ویروس به فلاسک های حاوی رده سلولی EPC+EMEM تلقیح و این فلاسک ها به مدت ۷ روز جهت بررسی آثار آسیب سلولی (CPE) مورد

بررسی قرار گرفتند و پس از مشاهده آثار آسیب سلولی و جدا شدن سلول ها از کف فلاسک، محیط کشت حاوی ویروس سه مرتبه منجمد و ذوب گردید (در این حالت قدرت عفونت زایی ویروس بدون تغییر باقی ماند) تا در اثر تخریب مکانیکی سلول ها، ویروس به درون محیط کشت آزاد شوند. سپس محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد با ۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و محلول رویی^۱ که حاوی ویروس های جداسازی شده بود با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر سرسرنگی فیلتر گردید. در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (Haenen and Davidse, 1993).

جهت آماده سازی پلیت های کشت سلولی ۹۶ خانه، پس از آماده سازی سلول های EPC در فلاسک های ۲۵cm²، محیط کشت موجود در فلاسک ها با استفاده از پیپت های استریل یکبار مصرف خارج گردید. سپس ۵ میلی لیتر تریپسین به منظور جداسازی سلول ها از کف فلاسک، به هر فلاسک اضافه شد و پس از چند دقیقه تریپسین از فلاسک ها خارج گردید. در مرحله بعد حدود ۵۰ میلی لیتر محیط کشت EMEM حاوی بافر تریس به فلاسک ها افزوده شد. پس از چندین بار مخلوط کردن محیط کشت با سلول ها به کمک پیپت، محتوی فلاسک ها به پلیت های ۹۶ خانه انتقال یافت. به هر یک از خانه های پلیت های ۹۶ خانه ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سلول های EPC افزوده شد. پس از بستن درب پلیت ها، تمامی پلیت ها در یک محفظه مرطوب قرار داده شده و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه قرار داده شدند. پس از این مدت پلیت ها از لحاظ نحوه رشد سلول ها مورد بررسی قرار گرفتند. مراحل تلقیح ویروس به سلول های EPC با رعایت اصول امنیت زیستی و در زیر هود میکروبیولوژی کلاس دو انجام پذیرفت (OIE, 2021).

به منظور تیتراسیون ویروس محلول حاوی ویروس به روش سریالی رقیق سازی گردید. به این منظور در یک پلیت ۹۶ خانه خالی، محلول ویروسی با استفاده از محیط EMEM به صورت سریالی و با ضریب رقت ۰/۱ از رقت ۱۰^{-۱} الی

¹ Supernatant

EMEM آزاد گردید. سپس با فرآیند سانتریفیوژ ۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تیتراسیون ویروس انجام شد (Haenen and Dacids, 1993). تیتراسیون ویروس طبق روش پیشنهادی Reed و Muench (۱۹۳۸) انجام پذیرفت و تیتروسی به صورت TCID₅₀/ml بیان گردید. طبق تعریف، TCID₅₀/ml غلظتی از ویروس است که منجر به ایجاد آثار آسیب سلولی در حداقل ۵۰٪ از خانه‌های پلیت کشت سلولی گردد. از این ویروس چندین بار پاساژ داده شد تا میزان غلظت تخریب حداقل ۵۰ درصد سلولی، TCID₅₀، در آنها تعیین گردد. بعد از تغلیظ ویروس با کمک فیلتر سرسرنگی ۴۵ صدم و سانتریفیوژ با ستون آمیکون در آزمایشگاه پزشکی دانشگاه تربیت مدرس نسبت به تعیین غلظت پروتئین آن به روش Bradford (۱۹۷۶) اقدام گردید. به طور هم‌زمان، باندهای پروتئین با ژل SDS-PAGE الکتروفورز SDS-PAGE به روش (مصطفایی، ۱۳۸۴) مشاهده گردید (Haenen and Dacids, 1993).

آماده سازی خرگوش‌ها، تزریق و خونگیری

برای انجام این آزمون تعداد ۱۵ خرگوش نر نژاد نیوزلندی (*Oryctolagus cuniculus*) با میانگین وزن ۱۵۰۰±۲۵ گرم و مقدار لازم غذای پلت اختصاصی از موسسه سرم‌سازی رازی خریداری و در پلی کلینیک دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، واقع در منطقه شهریار، استان تهران درون قفس‌های مجزا (هر سه خرگوش در یک قفس) نگهداری و به مدت ۱۰ روز روند سازش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. خرگوش‌ها روزانه یک وعده (برحسب ۳ درصد وزن بدن) با پلت مخصوص خرگوش غذایی و آب کافی در اختیار آنها قرار گرفت تا برای تزریق اول آماده شدند. سپس ویروس بعنوان آنتی ژن جهت تحریک سیستم ایمنی با آدجوانت کامل فروند (با نسبت‌های مختلف تیمار کنترل منفی آب مقطر، تیمار یک با غلظت ۱ سی‌سی ویروس کامل، تیمار دو با غلظت ۰/۵

۱۰^۸ رقیق‌سازی شد. سپس نمونه‌های رقیق شده در شش تکرار و به میزان ۲۰ میکرولیتر به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه حاوی تیره سلولی EPC تلقیح شدند. در ضمن، خانه‌های تلقیح نشده نیز در هر رقت به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. پلیت تیتراسیون پس از تلقیح در یک محفظه مرطوب قرار داده شده و به دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. تمامی خانه‌های تلقیح شده به مدت هفت روز و به صورت روزانه از نظر بروز آثار آسیب سلولی مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج آنان ثبت گردید. در پایان روز هفتم تیتراسیون ویروس طبق روش پیشنهادی Reed و Muench (۱۹۳۸) انجام پذیرفت و تیتروسی به صورت TCID₅₀/ml بیان گردید. طبق تعریف، TCID₅₀/ml غلظتی از ویروس است که منجر به ایجاد آثار آسیب سلولی در حداقل ۵۰٪ از خانه‌های پلیت کشت سلولی گردد.

جهت تعیین TCID₅₀/ml تعداد موارد بروز آثار آسیب سلولی در هر یک از رفتهای ویروسی در پلیت‌های ۹۶ خانه بررسی شده و به صورت درصد بیان گردید. بعد از تغلیظ ویروس با کمک فیلتر سرسرنگی ۴۵ صدم میکرومتر و سانتریفیوژ با ستون آمیکون 3KD در آزمایشگاه پزشکی دانشگاه تربیت مدرس نسبت به تعیین غلظت پروتئین آن به روش Bradford (۱۹۷۶) اقدام گردید. به طور هم‌زمان باندهای پروتئین با ژل SDS-PAGE در الکتروفورز SDS-PAGE (مصطفایی، ۱۳۸۴) مشاهده گردید.

ابتدا از استوک ویروس VHSV-Ia سویه DK-5151 با کد بانک ژنی (GenBank Accession No: AF345859) تهیه شده از آزمایشگاه رفرانس اروپا استفاده که در ابتدا از فیلتر ۴۵ صدم میکرومتر عبور داده شد، سپس به فلاسک‌های حاوی سلول‌های EPC^۱ اضافه و در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز جهت مشاهده آثار آسیب ویروسی (CPE^۲) نگهداری گردید. از تریپسین برای جداسازی سلول‌ها استفاده و با فرآیند انجماد و ذوب متوالی، قدرت عفونت‌زایی ویروس بدون تغییر باقی ماند و در اثر تخریب مکانیکی سلول‌ها ویروس به درون محیط کشت

³ Median Tissue Infectious Dose

¹ Epitheliumo Papiolosum Cyprini

² Cytopathic effect

نتایج

بر اساس فرمول محاسبه غلظت پروتئین VHS در روش Bradford (۱۹۷۶)، OD ویروس و غلظت آن مطابق جدول ۱ می باشد. غلظت نهایی ویروس پس از تغلیظ ۲۷۴ ماکروگرم/ میلی لیتر می باشد که جهت انجام الکتروفورز SDS-PAGE نیز مورد بررسی واقع شد (جدول ۲ و شکل ۱).

جدول ۱: تعیین غلظت سوپ سلولی آلوده به ویروس به روش برادفورد

Table 1: Determination of virus-infected cell soup concentration by Bradford method

مقادیر		نمونه
غلظت (میکروگرم/ میلی لیتر)	Optical density (OD)	
۱۳۷	۰/۲۰۷	سوپ سلولی آلوده به ویروس بدون تغلیظ
۲۷۴	۰/۳۳۱	مایع رویی فیلتر آمیکون (ویروس تغلیظ شده)
۲۹	۰/۰۵۶۷	مایع زیرین فیلتر آمیکون

جدول ۲: وزن مولکولی پروتئین های تشکیل دهنده ویروس VHS بر حسب کیلودالتون (Nishizawa *et al.*, 1991)

Table 2: The molecular weight of VHS virus constituent proteins in kilodaltons	
protein	VHSV
L	۱۵۶
G	۶۸/۵
N	۴۳/۵
M ₁	۲۴/۸
M	-
M ₂	۲۰/۶

سی سی ویروس و ۰/۵ سی سی آدجوانت فروند، تیمار سه با غلظت ۷۵ صدم ویروس و ۲۵ صدم آدجوانت، تیمار چهار با غلظت ۲۵ صدم ویروس و ۷۵ صدم آدجوانت) به مدت چهار ماه، هر ماه یکبار به صورت IM به ۵ گروه سه تایی خرگوش های نیوزلندی دارای تاییدیه بهداشتی تهیه شده از موسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج تزریق، بعد از ۱۵ روز، نسبت خون گیری از ورید کناری گوش، اقدام و سپس با سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه سرم جدا گردید (مجابی و همکاران، ۱۳۸۹).

سنجش آنتی بادی سرمی به روش الایزا و الکتروفورز SDS- PAGE و تخلیص آنتی بادی IgG

در آزمایشگاه پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، با استفاده از دستگاه خوانش الایزا (ELISA reader) به روش (Waritani, 2017) جذب نوری آنتی بادی (OD) با استفاده از سرم حیوانات ایمن شده و آنتی ژن تزریقی به آنها انجام شد. سپس به منظور بررسی پتانسیل ایمنی زایی جهت تولید آنتی بادی علیه پروتئین ویروسی VHSV ابتدا از سرم خرگوش هایی که بالاترین جذب نوری را در خونگیری چهارم داشتند با ستون کروماتوگرافی جذبی پروتئین G سفارز فعال شده 4B با سیانوزن بروماید عمل تخلیص آنتی بادی IgG صورت گرفت (www.gelifesciences.com/protein-purification2009).

در طول موج ۲۸۰ نانومتر با دستگاه Nano 200- Ver1.0 میزان جذب نوری، حجم و غلظت آنتی بادی ها قرائت گردید و در نهایت تست الایزا نهایی جهت بررسی آنتی بادی تخلیص شده به همراه ویروس VHS انجام گردید. همچنین برای تایید آنتی بادی IgG علیه ویروس VHS از الکتروفورز SDS-PAGE استفاده گردید (مصطفایی، ۱۳۸۴).

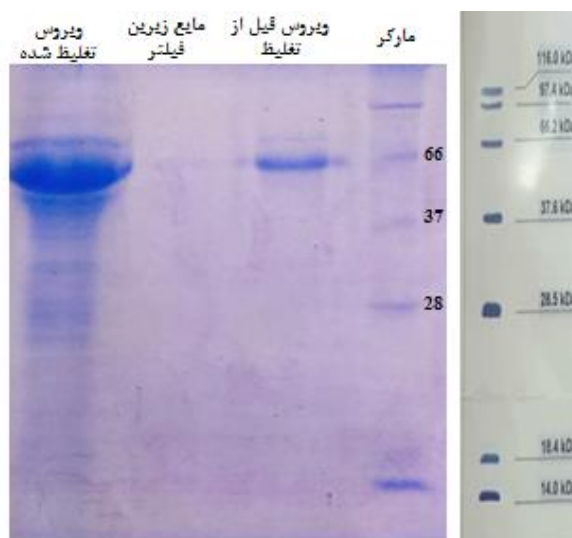
به منظور تجزیه و تحلیل بررسی های آنتی بادی تولیدی و سایر عوامل خونی علیه آنتی ژن VHS از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۰ استفاده گردید. جهت این مطلب از بررسی های آماری ANOVA یکطرفه و تست تحلیلی دانکن استفاده گردید. حداقل سطح معنادار در تمامی این آنالیزهای آماری سطح معناداری زیر ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

همان طوری که در شکل ۲ مشاهده می گردد، در نمونه بعد از تغلیظ باند قوی در ناحیه ۶۶ کیلودالتون تشکیل شده، اما در نمونه زیرین فیلتر باندی تشکیل نشده است. در واقع، باند ۶۶ کیلودالتونی مربوط به پروتئین G ویروس است که یک پروتئین ساختاری و سطحی می باشد و این دسته از پروتئین ها جهت اتصال ویروس به سلول های میزبان دخالت دارند. این عدد در دامنه پروتئین G ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده ماهی قزل آلا قرار دارد. ویروس VHS ۶ نوع پروتئین دارد که فراوان ترین نوع پروتئین، پروتئین G می باشد که در الکتروفورز قابل مشاهده است (Nishizawa *et al.*, 1991) (جدول ۳).



شکل ۱: باندهای ایجاد شده در الکتروفورز SDS-PAGE (Nishizawa *et al.* 1991)

Figure 1: Bands generated in SDS-PAGE electrophoresis



شکل ۲: حضور تک باند پروتئینی ویروس VHS با غلظت 274 Mg/ml

Figure 2: The presence of a single protein band of VHS virus with a concentration of 274 mg/ml

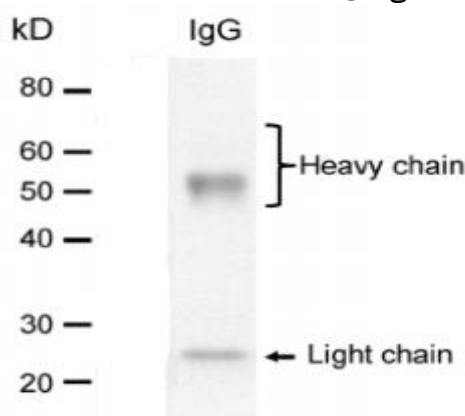
جدول ۳: میزان جذب نوری، حجم و غلظت مشخص شده از آنتی بادی ها بعد از تخلیص

Table 3: The amount of optical absorption, the volume, and the specified concentration of the antibodies after purification

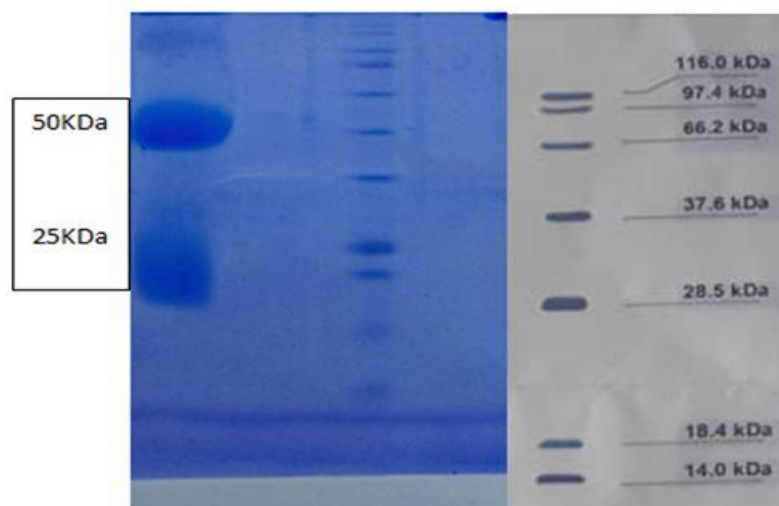
Serum group	OD of antibody IgG	Volume of antibody IgG	Concentration of antibody IgG
T2-1	۲/۶۰	۱۰ میلی لیتر	۱/۸۲ ± ۰/۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر
T3-1	۲/۳۸	۸/۵ میلی لیتر	۱/۶۷ ± ۰/۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر

پلی کلونال IgG دارای دو زنجیره سبک و سنگین می باشد که باندهای تشکیل دهنده این دو زنجیره بر اساس الکتروفورز مطابق شکل ۳ می باشد. همان طوری که از اشکال ۳ و ۴ مشاهده می شود، آنتی بادی تولیدی در دامنه رفرنس قرار دارد که نشان از تایید تولید آنتی بادی IgG می باشد (Muramatsu *et.al.*, 2014).

برای آزمون الکتروفورز و الایزای نهایی از آنتی بادی که دارای بیشترین OD بود (T2-1 antibody)، استفاده گردید آنتی بادی پلی کلونال IgG دارای دو زنجیره سبک و سنگین می باشد که باندهای تشکیل دهنده این دو زنجیره بر اساس الکتروفورز مطابق شکل ۳ می باشد. برای آزمون الکتروفورز و الایزای نهایی از آنتی بادی که دارای بیشترین OD بود (T2-1 antibody)، استفاده گردید آنتی بادی



شکل ۳: مشاهده باندهای تشکیل شده از زنجیره های سبک و سنگین IgG در الکتروفورز SDS-PAGE (Muramatsu *et.al.*, 2014)
Figure 3: Observing the bands composed of IgG light and heavy chains in SDS-PAGE electrophoresis



شکل ۴: انجام الکتروفورز SDS-PAGE جهت مشاهده دو باند آنتی بادی IgG تولید شده در سرم خرگوش و تطبیق آن با ladder
Figure 4: Performing SDS-PAGE electrophoresis to observe two IgG antibody bands produced in rabbit serum and matching it with ladder

تولیدی در دومین مرحله خونگیری در سطح گروه های تعریف شده اختلاف معنی داری نشان داد ($P < 0.05$). در همین راستا حداقل و حداکثر میزان OD آنتی بادی تولیدی

بر اساس جدول ۴، میزان OD آنتی بادی تولیدی در اولین مرحله خون گیری در سطح گروه های تعریف شده اختلاف معنی داری نشان نداد ($P > 0.05$). میزان OD آنتی بادی

بوده است ($P < 0.05$). در خونگیری چهارم بر اساس نتایج حاصله و به منظور کاهش هزینه‌ها، تنها گروه‌های ۲ و ۳ که دارای بیشترین مقدار OD بودند، به همراه گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفت. بیشینه OD آنتی‌بادی تولیدی در روز چهارم خونگیری $2/21 \pm 0/00$ با اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) با گروه‌های شاهد و ۳ به مقادیر $0/73 \pm 0/02$ و $1/78 \pm 0/03$ بوده است.

در روز دوم نمونه برداری به‌ترتیب $0/49 \pm 0/03$ و $2/0 \pm 41/01$ در گروه‌های شاهد و ۳ با 75% ویروس بوده است ($P < 0.05$). میزان OD آنتی‌بادی تولیدی در سومین مرحله خونگیری در سطح گروه‌های مختلف تعریف شده اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$). حداقل و حداکثر میزان OD آنتی‌بادی تولیدی در مرحله سوم نمونه‌برداری $0/0 \pm 71/0$ و $2/18 \pm 0/0$ (با اختلاف معنی‌دار با گروه ۳ به مقدار $0/03 \pm 1/79$) به‌ترتیب در گروه‌های شاهد و گروه ۲

جدول ۴: میزان OD در تیمارهای مختلف چهار مرحله خون گیری

Table 4: The amount of OD in different treatments of four stages of blood sampling

تعداد مراحل خونگیری	شاخص مورد ارزیابی	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
مرحله اول	OD	$59/02 \pm 0/0a$	$52/03 \pm 0/0a$	$59/00 \pm 0/0a$	$59/01 \pm 0/0a$	$56/00 \pm 0/0a$
مرحله دوم	OD*	$49/03 \pm 0/0a$	$46/49 \pm 1/0bd$	$20/27 \pm 2/0cd$	$41/01 \pm 2/0c$	$70/00 \pm 1/0ab$
مرحله سوم	OD*	$71/00 \pm 0/0a$	$71/19 \pm 0/0a$	$18/00 \pm 2/0b$	$79/03 \pm 1/0b$	$28/07 \pm 1/0c$
مرحله چهارم	OD*	$73/02 \pm 0/0a$		$21/00 \pm 2/0b$	$78/03 \pm 1/0c$	

بحث

در حال حاضر، تکنیک‌های ایمونوشیمی نقش بسیار مهم و ارزنده‌ای در سنجش‌های کیفی و کمی ترکیبات مایعات بدن ایفاء می‌کنند و تهیه آنتی‌بادی علیه ایمونوژن‌ها، اولین گام در تهیه کیت‌های ایمونوشیمی می‌باشد. پژوهش حاضر به منظور تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه ویروس سپتی سمی خونریزی‌دهنده ماهی قزل‌آلا در مدل حیوانی خرگوش نیوزلندی می‌باشد. توانایی سیستم ایمنی برای پاسخ به یک ایمونوژن (مولکول خارجی) به اندازه مولکول آنتی‌ژن بستگی زیادی دارد و معمولاً موادی با وزن مولکولی کمتر از ۱۰۰۰۰ دالتون، آنتی ژن نیستند (فولادساز و همکاران، ۱۳۷۸) و برای تزریق نیاز به یک حامل جهت باند شدن و برانگیختگی سیستم ایمنی دارند. در این میان ویروس سپتی سمی خونریزی‌دهنده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن مولکولی ۲۶ کیلودالتون (Kyle et al., 2013)، به تنهایی قادر به تحریک سیستم ایمنی در مدل حیوانی خرگوش و بروز پاسخ ایمنی و تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال IgG در این حیوان است.

به طور کلی، در تست‌های تشخیص آنتی‌ژن که با آبی‌توپ‌های مختلف هدف مطالعه می‌باشد، آنتی‌بادی پلی‌کلونال بهتر از آنتی‌بادی مونوکلونال عمل می‌کند. زیرا آنتی‌بادی پلی‌کلونال می‌تواند به مکان‌های اتصال بیشتری متصل شود و در نتیجه حساسیت بهتری ایجاد نماید (Majidi et al., 2007). ذره رابدیروس حاوی یک نوکلئوکپسید است که با یک پوشش احاطه شده است. پروتئین G تنها پروتئینی است که روی سطح ویروس قرار دارد و آنتی‌ژن، مسئول القاء آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده است (Lorenzen et al. 1990). به همین ترتیب، با تزریق ویروس کامل (whole virus) به خرگوش و خونگیری از آن و تخلیص آنتی‌بادی‌های سرمی مقادیر آنتی‌بادی IgG اختصاصی علیه ویروس VHS تولید شد.

نتایج حاصل از تیتراسیون آنتی‌بادی گروه‌های مختلف نشان داد که در تزریق اول خرگوش‌ها ایمن نشدند. اما با طولانی‌تر شدن دوران ایمنی‌زایی، پاسخ ایمنی بهتری ایجاد گردید. در این راستا با اولین یادآور، تیتراژ آنتی‌بادی در گروه‌های T2 و T3 و T4، افزایش یافت که نشان از ایمن شدن خرگوش‌ها و فعال شدن پاسخ ایمنی نسبت به حضور عامل

باعث تخریب اپی‌توپ‌های خنثی‌شونده شود، شروع به پاسخ دادن به پروتئین VHSV G می‌کند. تا زمانی که پاسخ آنتی‌بادی در خرگوش ایجاد شود، پروتئین G ممکن است تا حدی تخریب شود و اپی‌توپ‌های خنثی‌سازی مهم، ممکن است از بین بروند. برای روشن شدن این نکته به آزمایش‌های بیشتری نیاز است. دما در خرگوش‌هایی که با ویروسی که از قبل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته‌اند، ممکن است بر ایمنی‌زایی اپی‌توپ‌های خنثی‌کننده تاثیرگذار باشد (Olesen et al., 1999).

بر اساس نظریات Tesgera Hurisa (۲۰۱۹) که از مدل حیوانی خرگوش جهت اخذ آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه ویروس کامل آبله بز و ویریون گوسفند استفاده شد، پس از تزریق ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از کل ویریون ویروس آبله به صورت زیر جلدی در چندین محل، خون به فاصله ۱۴ روز جمع‌آوری و تیتراسیون آنتی‌بادی انجام شد. آنتی ژن A27 GTPV پوشش داده شد و از روش الایزای غیرمستقیم برای تیتراسیون آنتی‌بادی استفاده شد، سپس میانگین مقادیر OD برای نتایج مثبت و منفی به‌وسیله پنجره ۷ مایکروسافت اکسل آنالیز شد. در آخرین خونگیری خرگوشی که دارای بالاترین جذب نوری بود، برای تخلیص آنتی‌بادی استفاده شد. IgG با روش رسوب‌دهی سولفات آمونیوم خالص شد. غلظت پروتئین به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین شد و به ترتیب ۲/۲۹ میکروگرم بر میکرولیتر و ۲/۱۸ میکروگرم بر میکرولیتر در برابر ویروس آبله بز و ویروس sheepox برآورد شد. باندهای پروتئینی به‌وسیله SDS PAGE بررسی شدند و وزن مولکولی ۶۷ کیلو دالتون و ۲۵ کیلو دالتون برای IgG برآورد شد (Tesgera Hurisa, 2019). این تحقیق از لحاظ استفاده از ویروس کامل و پروتکل الایزا و الکتروفورز آنتی‌بادی تخلیص شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر بیشترین شباهت را به تحقیق حاضر داشت.

براساس تحقیق Olesen و همکاران (۱۹۹۹) آنتی سرم خرگوش علیه ویروس سیتی‌سمی خونریزی‌دهنده ویروسی (VHSV) تولید شده با دو روش ایمن سازی برای خنثی

خارجی در بدن خرگوش‌ها می‌باشد. لنفوسیت‌های B و پلاسماسل‌ها مسئول تولید آنتی‌بادی می‌باشند که به دلیل لنفوسیتوز و با توجه به اعداد جذب نوری جدول ۵ روند تولید آنتی‌بادی در یادآور دوم نیز به صورت افزایشی ادامه یافت. در خونگیری دوم خرگوش T2-1 با میانگین OD¹ ۲/۵ و خرگوش T3-1 با میانگین OD ۲/۳ از بیشترین میزان جذب نوری برخوردار بودند. در خونگیری سوم میانگین جذب نوری خرگوش T2-1 از عدد ۲/۵ به ۲/۰ کاهش یافت. همچنین خرگوش T3-1 نیز به میانگین OD ۱/۹ رسید. اما همچنان از بین سایر گروه‌ها میزان جذب نوری بالاتری داشتند. سپس بنا به دلایل مذکور، تنها از گروه‌های کنترل، T2 و T3 خونگیری چهارم جهت تخلیص آنتی‌بادی به‌عمل آمد. در این خونگیری OD آنتی‌بادی خرگوش T3-1 از میانگین OD ۱/۹ به ۱/۷ کاهش یافت، ولی میانگین OD خرگوش T2-1 همچنان بالا به میزان ۲/۲ بود. همان‌طوری‌که در جدول ۴ مشخص است، گروه‌های t3 و t2 به طور کلی در ۴ بار خونگیری، تیتر آنتی‌بادی بالاتری داشتند و از این بین تیتر آنتی‌بادی گروه T2 از سایرین بالاتر بود. این موضوع نشان می‌دهد که تزریق 0.50 CC ادجوانت فروند و 0.50 CC ویروس بیشترین مقدار آنتی‌بادی را به صورت پایدارتری در خرگوش تولید می‌کند.

سپس سرم خرگوش‌های T3-1 و T2-1 با استفاده از روش کروماتوگرافی جذبی با ستون پروتئین G سفارز 4B فعال شده با سیانوژن بروماید تخلیص و در طول موج ۲۸۰ نانومتر با دستگاه Nano 200- Ver1.0 میزان جذب نوری و غلظت قرائت گردید و به غلظت نهایی ۱/۸۲ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر با میزان جذب نوری ۲/۶۰ در سرم خرگوش T2-1 رسید که از غلظت نهایی T3-1 با عدد ۱/۶۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و جذب نوری ۲/۳۸ بالاتر بود. دلیل احتمالی تولید کم آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده در خرگوش‌ها ممکن است این باشد که اپی‌توپ‌های خنثی‌سازی مهم بر پروتئین VHSV G در بدن حیوانات خونگرم ناپایدارند. در سیستم ایمنی خرگوش قبل از اینکه دمای بالای بدن یا سایر عوامل

¹ Optic density

Septicemia) و عوامل موثر بر آن در مزرعه های

ماهی قزل آلا کشور.

ذریه زهرا، ج.، یارمحمدی، م.، داود حسینی، د.، پورکاظمی، م.، کاظمی، ر.، سپهداری، ا.، قاسمی، م.، کاکولکی، ش.، مهرابی، م.ر.، شناور ماسوله، ع.ر. و قیاسی، م.، ۱۳۹۹. استفاده از روش-Real Time PCR بمنظور شناسایی بیماری های ویروسی اخطار کردنی (VHS, IPN و IHN) در مولدین قزل آلا رنگین کمان نسل پایه ماهیان عاری از عوامل بیماریزای خاص (SPF) دوره ۲۹، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۹، صفحات ۵۹-۴۷.

رهبری زاده، ف.، اسدی کرم، غ.ر. و رحیمی جمنانی، ف. ۱۳۹۵. آنتی بادی های پلی کلونال و منوکلونال (از تولید تا کاربرد). دانشگاه تربیت مدرس. ص. ۲۵۴. فولادساز، ک.، رسایی، م.ج. و انصاری، م.، ۱۳۷۸. تولید و تخلیص آنتی بادی پلی کلونال بر علیه هورمون ملاتونین. مجله دانشکده پزشکی شماره ۲، صفحات ۱۰ تا ۱۶.

مصطفایی، ع.، ۱۳۸۴. راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل (چاپ اول). یادآوران (وابسته به شرکت بین المللی پژوهش و نشر یادآوران). ۱۸۴ صفحه

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-252.

Haenen, O.L.M. and Davidse, A., 1993. Comparative pathogenicity of two strains of pike fry rhabdovirus and spring viremia of carp virus for young roach common carp, grasscarp and rainbow trout. *Dis Aquat Org*, 15:87-92.

Kyle, A., Garver Garth, S., Traxler Laura, M., Hawley, J., Richard, J.P., Ross, J. and Lovy, J., 2013. Molecular epidemiology of viral haemorrhagic septicemia virus

سازی و خواص ایمونوشیمیایی در برابر سویه های همولوگ و هترولوگ مقایسه شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تزریق های داخل وریدی مکرر (IV) خرگوش ها با آنتی ژن های ویروسی نسبت به تزریق های زیرجلدی و داخل صفاقی (SC/IP) با واسطه کمکی برای تولید آنتی سرم های خنثی کننده برتر بود. در تحقیق انجام گرفته از روش تزریق داخل عضلانی در عضله ران خرگوش ها بهره گرفته شد. علت انتخاب روش عضلانی می تواند کاهش واکنش های ایمونولوژیک احتمالی به صورت شوک و ازدیاد حساسیت شدید با مقادیر متفاوت از ادجوانت و ویروس باشد. همچنین تزریق داخل رگی برای خرگوش ها بسیار استرس زا می باشد (رهبری زاده و همکاران، ۱۳۹۵).

ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده ماهی قزل آلا منجر به ایجاد بیماری برای مدل حیوانی خرگوش نمی شود اما به عنوان یک آنتی ژن^۱ می تواند منجر به تحریکات سیستم ایمنی و فعال سازی MHC class1 شود (Olesen et al., 1999) که در نهایت منجر به تولید آنتی بادی شود.

از نتایج به دست آمده در این تحقیق می توان دریافت که تزریق ویروس سپتی سمی خونریزی دهنده ماهی قزل آلا به همراه مقادیر مختلف ادجوانت در خرگوش با تحریک سیستم ایمنی هومورال و تحریک پلاسماسل ها منجر به تولید آنتی بادی در دوزهای متفاوت می شود که با توجه به نتایج جدول ۴ که میزان جذب نوری و غلظت آنتی بادی ها را پس از تخلیص نشان می دهد، می توان نتیجه گرفت که تیمار دو با ۰/۵ سی سی ویروس و ۰/۵ سی سی آدجوانت در مجموع به نسبت سایرین میانگین از تولید آنتی بادی بالاتری برخوردار بود.

منابع

بکایی، س.، آبسالان فرد، ک.، فلاح مهرآبادی، م.، ابراهیم زاده موسوی، ح.، قاجاری، ا. و شهبازی، ن.، ۱۳۹۶. بررسی طغیان های سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی (Viral Hemorrhagic

¹ Foreign body

- OIE World Organisation for animal health, 2021.** Final report 2021. . 88 GS/FR – PARIS.
- Olesen, N.J., Lorenzen, N., Aarhus, N., Scott, E. and Lapatra, N., 1999.** Production of Neutralizing Antisera against Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) Virus by Intravenous Injections of Rabbits Clear Springs Foods, Inc., Buh 1, Idaho 83316, USA. *Journal of Aquatic Animal Health*, 11:10–16, 1999.
- Reed, L.J. and Muench, H., 1938.** a simple method of estimating fifty percent endpoints.
- Roitt, I.M., 1994.** Essential Immunology:Oxford, England: Black well Sci.271 pp.
- Tesgera Hurisa,T. Jia, H., Chen, G., Yong Xiang, F., Bing He, X., oia Wang, X. and Jing, Z., 2019.** Production and assessment of polyclonal antibody against the whole virion of Goatpox virus and sheeppox virus in the rabbit. Research square.1-13,2019.
- Tordo, N., Benmansour, A., Calisher, C., Dietzgen, R.G., Fang, R.X., Jackson, A.O., Kurath, G., Nadin-Davis, S., Tesh, R.B. and Walker, P.J., 2005.** Family Rhabdoviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Eds.), Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, London, 623–53. 3.
- Wolf, K., 1988.** Fish viruses and fish viral diseases, Comstock Publishing Associates, Cornell University Press.
- (VHSV) in British Columbia, Canada, reveals transmission from wild to farmed fish Fisheries and Oceans Canada, Pacific Biological Station, 3190 Hammond Bay Road, Nanaimo, British Columbia V9T 6N7, Canada 2 Present address: New Jersey Division of Fish and Wildlife, Office of Fish and Wildlife Health and Forensics, 605 Pequest Rd, Oxford, New Jersey 07863, USA.
- Lorenzen, N. and Laparta, S.E., 2005.** DNA vaccinnnes for aquacultured fish. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 24.
- Majidi, J., Abdolalizadeh, J., Amirkhiz, M.B. and Majidi, S., 2007.** Production and purification of polyclonal antibody against bovine immunoglobulins in rabbits. *African Journal of Biotechnology*. 6(12), pp. 1369-1372.
- Meyers, T.R. and Winton, J.R., 1995.** Viral hemorrhagic septicemia virus in North America. *Annual Review of Fish Diseases*, 5:3-24.
- Muramatsu, M., Yoshida, R., Yokoyama, A., Miyamoto, H., Kajihara, M., Maruyama, J., I Nao, N., Manzoor, R., Takada, A., 2014.** Comparison of Antiviral activity between IgA and IgG Specific to Influenza Virus Hemagglutinin: Increased Potential of IgA for Heterosubtypic Immunity.
- Nishizawa, T., Yoshimizu, M., Winton, J., Ahne, W. and Kimura, T., 1991.** Characterization of structural proteins of hirame rhabdovirus, HRV.

Evaluation of polyclonal IgG antibody in Response to injection of viral Hemorrhagic Septicemia killed virus (VHSv) of trout fish (*Oncorhynchus mykiss*) in rabbit(*Oractulagus cuniculus*) in order to produce rapid diagnostic kit

Hafezieh M.¹; Ghasemi M.^{2*}; Kakoolaki Sh.^{3*}; Kazempour R.⁴

*mohades@yahoo.com; bsh443@gmail.com

1-Islamic Azad University, Research Sciences Branch, Tehran, Iran

2-Inland Water Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Bandar Anzali, Iran

3-Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran

4- Department of Biology, Islamic Azad University, Roodehen Branch, Roodehen, Iran

Abstract

Aquaculture has become one of the sustainable sectors with a bright and promising future to ensure the safety of human food. Due to the need to increase the production of this healthy food, intensive aquaculture has been welcomed, which causes many diseases, especially viral. In recent years, VHS virus has caused irreparable damage to the country's trout fish producers. Rapid diagnosis and elimination of infected fish in the early stages of the disease is essential to control the spread of the disease effectively and reduce cost wastage, and rapid diagnostic kits will be very useful. These kits are made out of antibodies. In this research, the production of polyclonal IgG antibodies against VHS virus was investigated in a New Zealand rabbit animal model(*Oractulagus cuniculus*). In order to this , the stock of VHS GenBank Accession No: AF345859) Prepared by European Reference Laboratory as an antigen to stimulate the immune system with Freund's complete adjuvant in four treatments including negative control of distilled water, treatment one with a concentration of 1 cc virus Complete, treatment two with a concentration of 0.5cc virus and 0.5cc adjuvant Freund, treatment three with a concentration of 75% virus and 25% adjuvant, treatment four with a concentration of 25% virus and 75% adjuvant, for four months, once a month IM In 5 groups of New Zealand rabbits injected, after 15 days, the ratio of blood sampling from the peripheral vein and antibody absorption (OD) were measured. During 4 blood samples, the amount of IgG antibody absorption was significantly different between the groups P <0.05) showed. Antibody purification was then activated by Sepharose Protein G adsorption chromatography column 4B (Sepharose® 4B) (and OD of antibodies purified by Nano-200-Ver1.0 at 280 nm in the second treatment were 2.60 and the third treatment was 2.38 and the antibody concentrations were 1.82 and 1.67 mg, respectively. This antibody is going to be used in the rapid diagnosis kit of this disease.

Keywords: Trout fish, Viral hemorrhagic septicemia, Polyclonal antibody, Rapid diagnosis

*Corresponding author