مقاله علمی – پژوهشی:

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

معصومه حافظیه[۱]، محدث قاسمی*[۲]، شاپور کاکولکی*[۳]، رضا کاظم‌پور[٤]

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

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

۲- پژوهشکده آبزی‌پروری 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

٤- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رودهن، رودهن، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱٤۰۰ تاریخ پذیرش: اسفند ۱٤۰۰

چکیده

آبزی‌پروری به یکی از بخش‌های پایدار، دارای آینده‌ای روشن و امیدبخش برای تامین و تضمین امنیت غذای انسان تبدیل شده که ب ادلیل 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 وحذف 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 ویروسVHS 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 (Sepharose® 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 ± ۱/۸۲ و ۰/۱۲± ۱/۶۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. قرار است از این آنتی‌بادی در کیت تشخیص سریع این بیماری استفاده گردد.

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

***نویسنده مسئول**

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.6.8]

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 پنسیلوانیا 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 رنگین کمان 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 (IPN[1])، سپتی‌سمی ویروسی خونریزی‌دهنده (VHS[2]) و نکروز عفونی بافت خونساز (IPN[3]) 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 رنگین کمان 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 رنگین کمان 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 (Gadidiae) 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 رنگین کمان در دنیا به‌شمار می‌رود. بیشتر آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال علیه تایپ ۱ ویروس VHS در تست مستقیم آنتی‌بادی فلوئورسنت و الایزا با همه سویه‌های این ویروس واکنش متقاطع دارند. در تست خنثی سازی، 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 ژنوتیپ های 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 مجدداًوقوع بیماری در حدود ۶۰

[1] Infectious Pancreatic Necrosis
[2] Virous Hemorrhagic Septicemia
[3] Infectious Hematopoietic Necrosis

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.6.8]

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 میزبان 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 ازگلیکوپروتئین‌ها 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 (پلاسموسیت‌ها) 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 ایمنوگلوبولین G (IgG) استفاده می‌شود. این ایمونوگلوبولین علاوه بر اپسونیزاسیون، آگلوتیناسیون و پرسیپیتاسیون 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[1] 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 (Brown, 2009). هدف از این تحقیق بررسی تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونالIgG در پاسخ به تزریق ویروس کشته شده سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده (VHSv) ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان(*Oncorhyncus mykiss*) درخرگوش (*Oryctolagus cuniculus*) به منظور تولید کیت تشخیص سریع می‌باشد.

در تئوری، هر گونه مهره‌داری می‌تواند برای تولید آنتی‌بادی استفاده شود، اما در عمل گونه های حیوانی پست استفاده نمی‌شود. اغلب از حیوانات آزمایشگاهی مانند موش، رت یا خرگوش استفاده می شود که قابل دسترس و امکان نگهداری و رشد و تکثیر مناسب دارند. باید توجه داشت، هرچه حیوانی که آنتی‌بادی در آن تهیه می شود با منبع آنتی ژن (حیوانی که آنتی ژن ازآن 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 ۷۰-۴۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم مقدار مناسبی سرم در اختیار قرار می‌دهد. برای تولید آنتی‌بادی کلونال بر ضد آنتی ژن VHS از ۱۵ خرگوش نژاد نیوزلندی (*Oryctulagus 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 ادجوانت را تغییر داده تا در نهایت مناسب‌ترین دوز از ویروس و ادجوانت را با بیشترین پاسخ ایمنی یافت گردد. این روش بر اساس روش فولادساز (۱۳۷۸) با حداقل ویرایش صورت انجام گرفت.

[1].light chain

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.6.8]

مواد و روش ها

تهیه و آماده سازی ویروس

تهیه و آماده‌سازی ویروس در آزمایشگاه ویروس‌شناسی پژوهشکده آبزی‌پروری 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 ویروس‌شناسی ابتدا ۹/۶ گرم پودر محیط کشت Eagle ‘s minimum essential (EMEM medium) حاوی L-Glutamine دهیدراته ساخت شرکت Gibco به همراه Fetal bovine (albumin) ۱۰٪ FBS به همراه ۱۰۰ IU/ml استروپتومایسین و۰/۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر 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 فلاسک‌های 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 فلاسک‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرم خانه‌گذاری گردیده و پس از این مدت جهت بررسی رشد سلول‌ها و تشکیل تک لایه، زیر میکروسکوپ معکوس (Invert) مورد بررسی قرار گرفتند. پس از کسب اطمینان از رشد مناسب سلول‌ها، محیط کشت EMEM به همراهFBS را از فلاسک‌ها خارج کرده و مجدداً محیط کشت EMEM فاقد FBS به فلاسک حاوی رده سلولی EPC افزوده و همه فلاسک‌ها در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد 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 فلاسک‌های حاوی رده سلولی EPC+EMEM تلقیح و این فلاسک‌ها به مدت ۷ روز جهت بررسی آثار آسیب سلولی (CPE) مورد بررسی قرار گرفتند و پس از مشاهده آثار آسیب سلولی و جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک، محیط کشت حاوی ویروس سه مرتبه منجمد و ذوب گردید (در این حالت قدرت عفونت‌زایی ویروس بدون تغییر باقی ماند) تا در اثر تخریب مکانیکی سلول‌ها، ویروس به درون محیط کشت آزاد شوند. سپس محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و محلول رویی[1] که حاوی ویروس‌های 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 پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ خانه، پس از آماده سازی سلول‌های EPC در فلاسک‌های ۲۵cm^2، محیط کشت موجود در فلاسک‌ها با استفاده از پیپت‌های استریل یکبار مصرف خارج گردید. سپس ۵ میلی‌لیتر تریپسین به منظور جداسازی سلول‌ها از کف فلاسک، به هر فلاسک اضافه شد و پس از چند دقیقه تریپسین از فلاسک‌ها خارج گردید. در مرحله بعد حدود ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت EMEM حاوی بافر تریس به فلاسک‌ها افزوده شد. پس از چندین بار مخلوط کردن محیط کشت با سلول‌ها به کمک پیپت، محتوی فلاسک‌ها به پلیت‌های ۹۶ خانه انتقال یافت. به هر یک از خانه‌های پلیت‌های ۹۶ خانه ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سلول‌های EPC افزوده شد. پس از بستن درب پلیت‌ها، تمامی پلیت‌ها در یک محفظه مرطوب قرار داده شده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه قرار داده شدند. پس از این مدت پلیت‌ها از لحاظ نحوه رشد سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. مراحل تلقیح ویروس به سلول‌های 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 رقیق‌سازی 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 10^{-1} الی

[1] Supernatant

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.6.8]

10^8 رقیق‌سازی شد. سپس نمونه‌های رقیق شده در شش تکرار و به میزان ۲۰ میکرولیتر به هر خانه از پیلت 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 Muenech (۱۹۳۸) انجام پذیرفت و تیتر ویروسی 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 خانه های 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[1] اضافه و در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز جهت مشاهده آثار آسیب ویروسی (CPE[2]) 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 EMEM آزاد گردید. سپس با فرآیند سانتریفیوژ ۲۰۰۰ دوردر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تیتراسیون ویروس انجام شد (Haenen and Dacidse, 1993). تیتراسیون ویروس طبق روش پیشنهادی Reed و Muench (۱۹۳۸) انجام پذیرفت و تیتر ویروسی به صورت TCID50/ml بیان گردید. طبق تعریف، TCID50/ml غلظتی از ویروس ست که منجر به ایجاد آثار آسیب سلولی در حداقل ۵۰٪ از خانه های پلیت کشت سلولی گردد.

از این ویروس چندین بار پاساژ داده شد تا میزان غلظت تخریب حداقل ۵۰ درصد سلولی، TCID50[3]، در آنها تعیین گردد. بعد از تغلیظ ویروس با کمک فیلتر سرسرنگی ۴۵ صدم و سانتیرفیوژ 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 در الکتروفورز SDS-PAGE به روش (مصطفایی،۱۳۸۴) مشاهده گردید (Haenen and Dacidse, 1993).

آماده سازی خرگوش‌ها، تزریق و خونگیری

برای انجام این آزمون تعداد ۱۵ خرگوش نر نژاد نیوزلندی (*Oryctolagus cuniculus*) با میانگین وزن۰/۲۵±۱۵۰۰ گرم و مقدار لازم غذای پلت اختصاصی از موسسه سرم‌سازی رازی خریداری و در پلی کلینیک دامپزشکی دانشگاه آزاداسلامی 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 غذادهی 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

[1] Epitheliumo Papiolosum Cyprini
[2] Cytopathic effect
[3] Median Tissue Infectious Dose

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.6.8]

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 دارای تاییدیه بهداشتی تهیه شده از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی کرج تزریق، بعد از ۱۵ روز، نسبت خون‌گیری از ورید کناری گوش، اقدام و سپس با سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه سرم جدا گردید (مجابی و همکاران، ۱۳۸۹).

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

درآزمایشگاه پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، با استفاده از دستگاه خوانش الایزا (ELISA reader)به روش (Waritani, 2017) جذب نوری آنتی‌بادی(OD) با استفاده از سرم حیوانات ایمن شده و آنتی‌ژن تزریقی به آنها انجام شد. سپس به منظور بررسی پتانسیل ایمنی‌زایی جهت تولید آنتی‌بادی 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 شده4B با سیانوژن بروماید عمل تخلیص آنتی‌بادی 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 آنتی‌بادی‌ها قرائت گردید و در نهایت تست الایزا نهایی جهت بررسی آنتی‌بادی تخلیص شده به همراه ویروس VHS انجام گردید. همچنین برای تایید آنتی‌بادی IgG علیه ویروس VHS از الکتروفورز SDS-PAGE استفاده گردید (مصطفایی، ۱۳۸۴).

به منظور تجزیه و تحلیل بررسی‌های آنتی‌بادی 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.

نتایج

بر اساس فرمول محاسبه غلظت پروتئین VHS در روش Bradford (۱۹۷۶)، OD ویروس و غلظت آن مطابق جدول ۱ می‌باشد. غلظت نهایی ویروس پس از تغلیظ ۲۷۴ ماکروگرم/ میلی‌لیتر می‌باشد 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

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

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

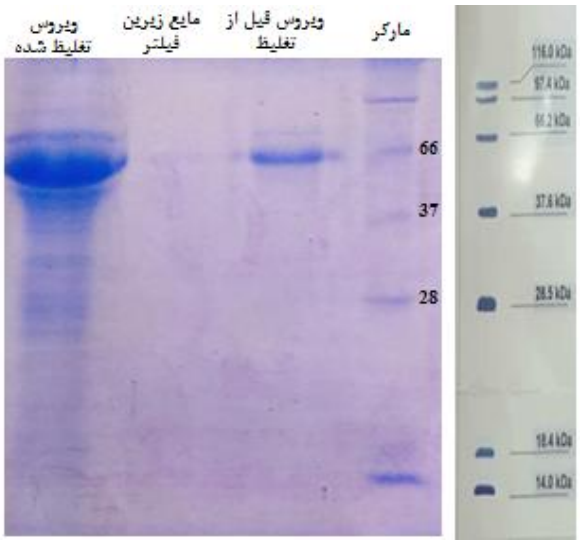
protein	VHSV
L	۱۵۶
G	۶۸/۵
N	۴۳/۵
M_1	۲۴/۸
M	-
M_2	۲۰/۶

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.6.8]

همان‌طوری‌که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد، 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 می‌باشد و این دسته از پروتئین‌ها جهت اتصال ویروس به سلول‌های میزبان دخالت دارند. این عدد در دامنه پروتئین G ویروس سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده ماهی قزل‌آلا قرار دارد. ویروس VHS ۶ نوع پروتئین دارد که فراوان‌ترین نوع پروتئین، پروتئینG می‌باشد 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



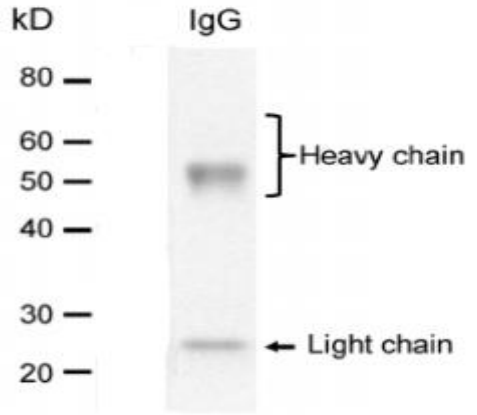
شکل ۲: حضور تک باند پروتئینی ویروس VHS با غلظت 274 Mg/ml
Figure 2: The presence of a single protein band of VHS virus with a concentration of 274 mg/ml

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 میلی‌لیتر	۱/۸۲ ± ۰/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
T3-1	۲/۳۸	۸/۵ میلی‌لیتر	۱/۶۷ ±۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

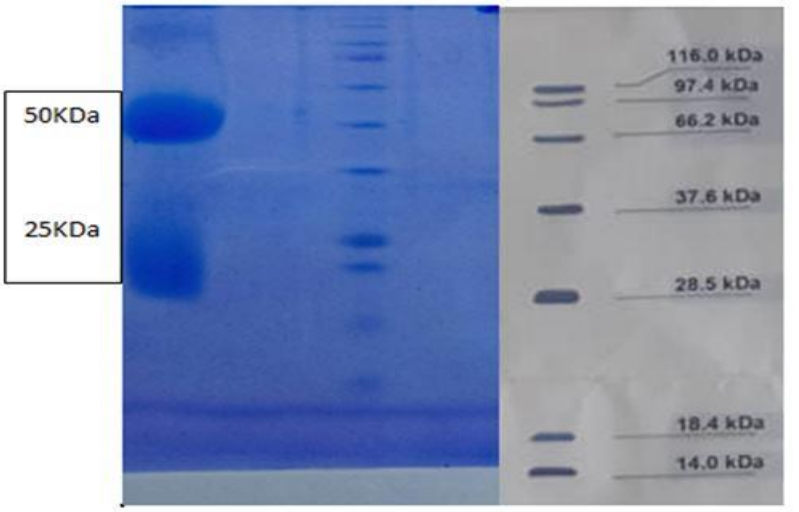
[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.6.8]

برای آزمون الکتروفورز و الایزای نهایی از آنتی‌بادی که دارای بیشترین OD بود (T2-1 antobody)، استفاده گردید آنتی‌بادی پلی‌کلونال IgG دارای دو زنجیره سبک و سنگین می‌باشد که باندهای تشکیلی این دو زنجیره بر اساس الکتروفورز مطابق شکل ۳ می‌باشد. برای آزمون الکتروفورز و الایزای نهایی از آنتی‌بادی که دارای بیشترین OD بود (T2-1 antobody)، استفاده گردید آنتی‌بادی پلی‌کلونال IgG دارای دو زنجیره سبک و سنگین می‌باشد که باندهای تشکیلی این دو زنجیره بر اساس الکتروفورز مطابق شکل ۳ می‌باشد. همان‌طوری‌که از اشکال ۳ و ۴ مشاهده می شود، آنتی‌بادی تولیدی در دامنه رفرنس قرار دارد که نشان از تایید تولید آنتی‌بادی IgG می‌باشد (Muramatsu *et.al*., 2014).



شکل ۳: مشاهده باندهای تشکیل‌شده از زنجیره‌های سبک و سنگین IgG در الکتروفورزSDS-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 بادیIgG 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

بر اساس جدول ۴، میزان OD آنتی‌بادی تولیدی در اولین مرحله خون‌گیری در سطح گروه‌های تعریف شده اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P>0.05$). میزان OD آنتی‌بادی تولیدی در دومین مرحله خونگیری در سطح گروه‌های تعریف شده اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P<0.05$). در همین راستا حداقل و حداکثر میزان OD آنتی‌بادی تولیدی

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.6.8]

در روز دوم نمونه برداری به‌ترتیب ۰/۴۹±۰/۰۳ و ۲/۰±۴۱/۰۱ در گروه‌های شاهد و ۳ با ۷۵٪ 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 ۰/۰±۷۱/۰ و ۰/۰±۲/۱۸ (با اختلاف معنی‌دار با گروه ۳ به مقدار۰/۰۳± ۱/۷۹) به‌ترتیب در گروه‌های شاهد و گروه ۲ بوده است (P<0.05). در خونگیری چهارم بر اساس نتایج حاصله و به منظور کاهش هزینه‌ها، تنها گروه‌های ۲ و۳ که دارای بیشترین مقدار OD بودند، به همراه گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفت. بیشینه OD آنتی‌بادی تولیدی در روز چهارم خونگیری ۰/۰۰±۲/۲۱ با اختلاف معنی‌دار (P<0.05) با گروه‌های شاهد و ۳ به مقادیر ۰/۰۲±۰/۷۳ و۰/۰۳± ۱/۷۸ بوده است.

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	تیمار۱	تیمار۲	تیمار۳	تیمار۴
مرحله اول	OD	۵۹/۰۲ ± ۰/۰^{a}	۵۲/۰۳ ± ۰/۰^{a}	۵۹/۰۰ ± ۰/۰^{a}	۵۹/۰۱ ± ۰/۰^{a}	۵۶/۰۰ ± ۰/۰^{a}
مرحله دوم	OD*	۴۹/۰۳ ±۰/۰^{a}	۴۶/۴۹ ± ۱/۰^{bd}	۲۰/۲۷ ± ۲/۰ ^{cd}	۴۱/۰۱ ± ۲/۰ ^{c}	۷۰/۰۰ ± ۱/۰^{ab}
مرحله سوم	OD*	۷۱/۰۰ ± ۰/۰^{a}	۷۱/۱۹ ± ۰/۰^{a}	۱۸/۰۰ ± ۲/۰ ^{b}	۷۹/۰۳ ± ۱/۰^{b}	۲۸/۰۷ ± ۱/۰^{c}
مرحله چهارم	OD*	۷۳/۰۲ ± ۰/۰^{a}		۲۱/۰۰ ± ۲/۰ ^{b}	۷۸/۰۳ ± ۱/۰^{c}	

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 ایمنوژن (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 اپی‌توپ‌های 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 رابدویروس 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، تیتر آنتی‌بادی در گروه‌های T2 وT3 و T4، افزایش یافت که نشان از ایمن شدن خرگوش‌ها و فعال شدن پاسخ ایمنی نسبت به حضور عامل

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.6.8]

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 OD[1] ۲/۵ و خرگوش T3-1 بامیانگین 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 درجدول ۴ مشخص است، گروه‌های t3 و t2 به طور کلی در ۴ بار خونگیری، تیتر آنتی‌بادی بالاتری داشتند و از این بین تیترآنتی‌بادی 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 رابه صورت پایدارتری درخرگوش 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 ۲/۶۰در 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 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 GTPV A27 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 به‌ترتیب ۲/۲۹میکروگرم بر میکرولیتر و ۲/۱۸ میکروگرم بر میکرولیتر در برابر ویروس آبله بز و ویروس sheeppox 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 تحلیص شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر بیشترین شباهت را به تحقیق حاضر داشت.

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

[1] Optic density

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-16]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.6.8]

سازی و خواص ایمونوشیمیایی در برابر سویه‌های همولوگ و هترولوگ مقایسه شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تزریق‌های داخل وریدی مکرر (IV) خرگوش‌ها با آنتی‌ژن‌های ویروسی نسبت به تزریق‌های زیرجلدی و داخل صفاقی (SC/IP) با واسطه کمکی برای تولید آنتی‌سرم‌های خنثی‌کننده برتر بود. در تحقیق انجام گرفته از روش تزریق داخل عضلانی در عضله ران خرگوش‌ها بهره گرفته شد. علت انتخاب روش عضلانی می‌تواند کاهش واکنش‌های ایمونولوژیک احتمالی به صورت شوک و ازدیاد حساسیت شدید با مقادیر متفاوت از ادجوانت و ویروس باشد. همچنین تزریق داخل رگی برای خرگوش‌ها بسیار استرس زا می‌باشد (رهبری زاده و همکاران ،۱۳۹۵).

ویروس سپتی‌سمی خونریزی دهنده ماهی قزل‌آلا منجر به ایجاد بیماری برای مدل حیوانی خرگوش نمی شود اما به عنوان یک آنتی ژن[1] می‌تواند منجر به تحریکات سیستم ایمنی و فعال سازی MHC class1 شود (Olesen *et al.*, 1999) که در نهایت منجر به تولید آنتی‌بادی شود.

از نتایج به‌دست آمده در این تحقیق می‌توان دریافت که تزریق ویروس سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده ماهی قزل‌آلا به همراه مقادیر مختلف ادجوانت در خرگوش با تحریک سیستم ایمنی هومورال و تحریک پلاسماسل ها منجر به تولید آنتی‌بادی در دوزهای متفاوت می شود که با توجه به نتایج جدول ۴ که میزان جذب نوری و غلظت آنتی‌بادی‌ها را پس ار تخلیص نشان می‌دهد، می‌توان 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 آنتی‌بادی بالاتری برخوردار بود.

منابع

بکایی، س.، آبسالان فرد، ک.، فلاح مهرآبادی، م.، ابراهیم‌زاده موسوی، ح.، قاجاری، ا. و شهبازی، ن.، ۱۳۹۶. بررسی طغیان های سپتی سمی خونریزی دهنده ویروسی (Viral Hemorrhagic Septicemia) و عوامل موثر بر آن در مزرعه های ماهی قزل آلای 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 بیماری‌های ویروسی اخطار کردنی (IPN، VHS و IHN) در مولدین قزل‌آلای 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. آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و منوکلونال (از تولید تا کاربرد). دانشگاه تربیت مدرس. ۲۵۴ ص.

فولادساز، ک.، رسایی، م.ج. و انصاری، م.، ۱۳۷۸. تولید و تخلیص آنتی‌بادی پلی‌کلونال 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 quantitites 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 septicaemia virus

[1] Foreign body

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.6.8]

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 l, 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 Immonology:Oxford, England: Black well Sci.271 pp.

Tesgera Hurisa,T. Jia, H., Chen, G., Yong Xiang, F., Bing He, X., oxia 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 vaccinnes 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.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.6.8]

Evaluation of polyclonal IgG antibody in Response to injection of viral Hemorrhagic Septicemia killed virus (VHSv) of trout fish (*Oncorhyncus 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

[Downloaded from isfj.ir on 2025-12-16]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.6.8]