Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۶ بهار ۱۳۹۴
DOI:10.22034/vj.2015.100916

مقایسه دو روش تزریق داخل پوستی و داخل وریدی تولید همولیزین ضد گوسفندی در خرگوش آزمایشگاهی

• روزبه فلاحی
استادیار بخش تحقیق، تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: دی ماه ۹۲ تاریخ پذیرش: آبانماه ۹۳
Email: r.fallahi@rvsri.ac.ir

چکیده

دستورالعمل های زیادی جهت تولید همولیزین وجود دارد ولی برای تولید آزمایشگاهی همولیزین با تیتر های بالاتر، استاندارد کردن روش ها، ضروری می باشد. در این تحقیق، برای اولین بار در کشور، همولیزین بوسیله تزریق خون کامل گوسفند به طریق داخل پوستی در خرگوش آزمایشگاهی تولید و با روش متداول که تزریق داخل وریدی گلبول های قرمز شسته شده گوسفند به میزان ۲٪ می باشد مقایسه گردید. همولیزین های تهیه شده بوسیله روش کلمر مورد تیتراسیون قرار گرفتند. تیتر بدست آمده در روش تزریق داخل پوستی، حداقل ۹۶۰۰ : ۱ بود، در حالیکه در روش تزریق داخل وریدی میزان ۱۲۰۰ : ۱ تعیین گردید. نتایج حاصل در ۳ تکرار بعمل آمده در مورد دو روش ذکر شده عیناً مانند قبل بود. جهت بررسی زمان پایداری، فرآورده های تولید شده را بصورت لیوفیلیزه در آورده و در درجه حرارت ۲۰- قرار داده شدند و به فواصل هر شش ماه یک بار و بمدت ۲ سال مجدداً مورد تیتراسیون قرار گرفتند. جهت بررسی فعالیت آزمایشگاهی نیز، از آنها در تست های سرولوژیک استفاده گردید. در این بررسی، همولیزین تهیه شده در روش تزریق داخل پوستی خون کامل گوسفند در تمام موارد و حتی بعد از ۲ سال از تاریخ تولید، هیچگونه کاهش تیتر نداشته و در تست های سرولوژیک نتایج بسیار مطلوب داشت ولی محصول تهیه شده در روش تزریق داخل وریدی کاهش شدید تیتر نشان داده و در تست های سرولوژیک نتایج قابل قبولی از آن بدست نیامد. با توجه به نتایج بدست آمده، تزریق خون کامل، به روش داخل پوستی و بر طبق دستورالعمل ارائه شده در این تحقیق می تواند جایگزینی مناسب برای روش متداول تزریق داخل وریدی به منظور تولید همولیزین ضد گوسفندی خرگوشی با تیتر و زمان پایداری و نحوه اثر بسیار بالاتر باشد.

کلمات کلیدی: همولیزین، خرگوش، روش‌های تولید

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 106 pp: 65-71

Comparison of intradermal and intravenous injection methods for laboratory rabbit anti-sheep hemolysin production

By: Fallahi, R., Assistant Professor, Department of Research, Breeding and Production of Laboratory Animals, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Email: r.fallahi@rvsri.ac.ir

Received: January 2013 **Accepted: November 2013**

There are many guidelines for hemolysin production, but for production with higher titers, standardization of procedures is essential. In this study, for the first time in the country, the hemolysin was produced by whole sheep blood intradermal injection to laboratory rabbits and was compared with the intravenous injection of 2% washed sheep red blood cells routine method. The produced hemolysins were titerd by kolmer method. In whole blood intradermal injection method, the rabbit anti-sheep hemolysin titer was at least 1:9600 whereas in 2% washed cells intravenous injection method, obtained 1:1200. The obtained results of the three replicates were taken on two methods listed were exactly the same as before. In order to increasing the products stability, they was lyophilized and were kept in -20°C. For survey in maintained products stability time, once every six months for 2 years, both the products, were tittered. To evaluate the in vitro activity, they were used in serological tests. In this survey, the hemolysin produced by whole sheep blood intradermal injection, in all cases, and even after 2 years of production, there is no reduction in titer and it was very favorable in serologic tests, but the product was prepared by intravenous injection, showed sharp decline in titer and it was not an acceptable result in serologic tests. According to the results, the whole blood intradermal method occording to this protocol can be replaced to routingly 2% washed cells intravenous injection for production of anti-sheep hemolysin with high titer, stability and effect.

Key words: Hemolysin, Rabbit, Production methods

مقدمه

همولیزین[1] ماده ایست که ایجاد همولیز[2] می کند. همولیزین ها پروتئین ها و لیپیدهای اختصاصی هستند که از طریق آسیب رساندن به غشاء سلولی، با شکستن فسفولیپیدها باعث لیز گلبول های قرمز خون می شوند. از این رو به آنها اریترولیزین[3] و اریتروسیتولیزین[4] نیز اطلاق می گردد. همولیزین باعث آزاد شدن هموگلوبین از گلبول های قرمز خون شده، این عمل بطور طبیعی در بدن و یا متعاقب تزریق گلبول های قرمز خارجی ایجاد می گردد. همولیزینی که متعاقب تزریق سلول های قرمز خون از دیگر حیوانات مشابه آن گونه جانوری ایجاد گردد، ایزوهمولیزین[5] و اگر از خود حیوان باشد، اتولیزین[6] و در صورتیکه از حیوانات گونه های دیگر تولید گردد، هترولیزین[7] نامیده می شود. (۱، ۱۶، ۲۵)

همولیزین ایمنی[8]، همولیزینی است که از طریق تحریک سیستم ایمنی یک حیوان، توسط خون کامل یا سلول های خونی حیوان دیگر تولید می‌گردد. مانند تولید همولیزین در خرگوش که به واسطه حضور گلبولهای قرمز گوسفند در این حیوان تولید می گردد. این فرآورده، کاربرد زیادی در آزمایش های سیستم های همولیتیک نظیر ثبوت عناصر مکمل[9] و دیگر سنجش های ایمونولوژیکی همولیتیک وابسته به سیستم کمپلمان دارد. (۱۱، ۱۴، ۱۷)

سنجش هماگلوتیناسیون[10]، روشی کمی برای ویروس ها و باکتریها و از طریق آگلوتیناسیون آنها می باشد. برخی از خانواده های ویروس ها و بسیاری از باکتریها، واجد پوشش (پاکت[11]) یا پروتئین های سطحی هستند که از طریق آنها قادر به چسبیدن و آگلوتینه کردن گلبول های قرمز خون انسان و باند شدن به ان- استیل نورامینیک اسید[12] می باشند. (۸، ۱۸)

همولیزین خرگوشی، در واقع آنتی بادی پلی کلونال[13] بر علیه گلبول‌های قرمز خون حیوانی مانند گوسفند است که قبلاً توسط ارلیچ[14] به آن آمبوسپتور[15] اطلاق شده بود. آمبو به معنی هر دو می باشد. زیراکه این ترکیب دارای دو محل اتصال برای آنتی ژن و مکمل می باشد. امروزه واژه همولیزین که یکی از آنتی بادی های IgM بر علیه گلبول های قرمز خون گوسفند می باشد، جایگزین آمبوسپتور شده است. (۷، ۱۱، ۱۳)

گرچه ظرفیت تولید آنتی بادی در خرگوش های آزمایشگاهی، نسبت به آنتی ژن های گوناگون از جمله آنتی ژن های پروتئینی، باکتریایی و گلبول های قرمز بیگانه، توسط محققین متعددی مورد مطالعه قرار گرفته است، ولی استاندارد کردن روش ها، برای تولید آزمایشگاهی همولیزین با

www.SID.ir

Archive of SID

تیتر های بالاتر، ضروری به نظر می رسد. (۳، ۱۵، ۲۳)

جهت تولید همولیزین با تیتر بالا، به مواد و معرف های خاص، حیوان آزمایشگاهی مناسب، رعایت شرایط استاندارد و نیز روش کاربردی مناسب نیاز می باشد. دستورالعمل های زیادی جهت تولید همولیزین وجود دارد که به انواع متفاوتی از روش های تزریقی مانند تزریق داخل وریدی، زیرپوستی و داخل پوستی مقادیر متفاوتی از خون گوسفند به خرگوش‌های آزمایشگاهی جوان اشاره شده است. از میان همه روش ها، روش تزریق داخل پوستی و داخل وریدی بصورت دفعات متعدد، سرمی با تیتر بالا تولید می کند. جهت تولید فرآورده همولیزین با افزایش تیتر و زمان ماندگاری بیشتر این تحقیق صورت گرفت. روش های متعددی برای تولید سرم با تیتر بالا توصیف شده اند. بطور تجربی مشخص شده، خون گوسفندانی که در هنگام ذبح در کشتارگاه جمع آوری می شود، همانند خون استریل گرفته شده از حیوان، تولید تیتر بالایی از همولیزین در حیوان آزمایشگاهی می کند. البته اگر خون در هنگام تهیه، آلوده گردد، در محل تزریق به خرگوش ها، ایجاد زخم های موضعی می کند. گرچه ممکن است موجب مرگ حیوان و یا کاهش تیتر همولیزین نشود، ولی بایستی سعی شود شرایط استریلیتی بطور کامل رعایت گردد. (۲، ۳، ۱۲، ۱۹)

در هر روش، سرم خرگوش، حاوی آنتی بادیهایی بر علیه سلولهای خونی گوسفند می شود. نهایتاً نمونه های خون از قلب حیوان گرفته شده و جمع آوری می گردد و پس از لخته شدن، سرم آن جدا می گردد. (۳، ۱۰) فعالیت این سرم ها که در واقع همولیزین هستند، بوسیله روش تیتراسیون کلمر[۱۶] مورد ارزیابی قرار می گیرد. همچنین مشخص گردیده که بعضی از عوامل در تولید آنتی بادی تأثیر می گذارند. بعنوان مثال اشعه دهی[۱۷] باعث مهار تولید آن می گردد. (۲۰) Talmage و همکاران (۱۹۵۶) دریافتند که تابش اشعه x به کل بدن خرگوش ها، کاهش معنی داری در میزان تولید همولیزین، متعاقب تزریق سلول های خونی گوسفند ایجاد می‌کند. اشعه‌دهی قبل و نیز بعد از دادن آنتی ژن (خون گوسفند) به خرگوش، باعث جلوگیری از افزایش تیتر همولیزین می گردد. (۳، ۴، ۹، ۲۴).

مواد و روش‌ها

آماده سازی خون گوسفند و تزریق به خرگوش های آزمایشگاهی

برای آماده سازی خون گوسفند، پس از جمع آوری خون در لوله آزمایش حاوی ماده ضد انعقاد (هپارین[۱۸])، ابتدا گلبول های قرمز خون شمارش شدند. در صورت مناسب بودن تعداد ($10^9 \times 5$-۱ در هر میلی لیتر) از آنها برای تزریق به خرگوش ها استفاده می شد. جهت پایداری بهتر گلبول های قرمز خون گوسفند، آنها را بمدت یک هفته در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگه داری کرده، این کار موجب لیز سلول های پیر و نیز جدا شدن آنتی ژن های سطحی می گردد. (۳، ۱۶)

در این تحقیق روش های زیر جهت تولید همولیزین ضد گوسفندی بر طبق دستورالعمل های استاندارد، انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند:

۱- روش جدید: تزریق داخل پوستی خون کامل گوسفند

۲- روش قدیمی: تزریق داخل وریدی سلول های شسته شده ۲٪

در هر روش تعداد ۸ سر خرگوش نر جوان نژاد هلندی (دوچ[۱۹]) با حدود وزنی ۲ کیلوگرم انتخاب شدند. حیوانات به میزان دلخواه از آب و غذا استفاده می کردند. در روش جدید (تزریق داخل پوستی)، خرگوش ها، یک سری شامل پنج تزریق داخل پوستی از خون کامل گوسفندی را بطور یک روز در میان دریافت می کردند. (جدول ۱) سپس دو تزریق داخل وریدی از گلبول های قرمز شسته شده گوسفند در غلظت ۲۰٪ بطور ۳ روز در میان صورت گرفت. برای شستشوی گلبول های قرمز، از سالین فیزیولوژیک[۲۰] که به آن به میزان ۱۰ میلی گرم سولفات منیزیم[۲۱] اضافه شده بود استفاده گردید. ۳ روز پس از پایان آخرین تزریق، یک خونگیری آزمایشی[۲۲] از وریدهای گوش خرگوش ها صورت می گرفت. بعد از جداسازی سرم از لخته، توسط سانتریفوژ، فعالیت سرم بوسیله روش تیتراسیون کلمر تعیین گردید. در صورت مناسب نبودن تیتر، تزریقات داخل وریدی ادامه پیدا می‌کرد. (جدول ۱)

در صورت مناسب بودن تیتر، از تمامی خرگوش ها بعد از بیهوشی کامل (با استفاده از تزریق داخل عضلانی مخلوط کتامین به میزان ۵۰ mg/kg و زایلازین به مقدار ۱۰ mg/kg و بر طبق اصول اخلاقی[۲۳]، خونگیری کامل بعمل می آمد و سپس خرگوش ها معدوم می گردیدند. بعد از جدا کردن لخته از دیواره لوله (دکوله کردن[۲۴])، لوله ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد برای مدت ۴۰-۳۰ دقیقه قرار گرفته و سپس با دور ۳۰۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ می شدند. مایع رویی بدقت برداشت و داخل لوله های دیگر ریخته می شد. سرم های بدست آمده در درجه حرارت مناسب قرارمی گرفتند. (۵، ۶)

جدول ۱- پروتکل روش تزریق داخل پوستی

روز تزریق	مقدار تزریق (میلی لیتر)	روش تزریق	ماده تزریقی
۱	۰/۵	داخل پوستی	خون کامل
۳	۱	داخل پوستی	خون کامل
۵	۱/۵	داخل پوستی	خون کامل
۷	۲	داخل پوستی	خون کامل
۹	۲/۵	داخل پوستی	خون کامل
۱۲	۱	داخل وریدی	گلبول های قرمز شسته شده ۲۰٪
۱۵	۱	داخل وریدی	گلبول های قرمز شسته شده ۲۰٪

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- پروتکل تزریق داخل وریدی سلول های شسته شده ۲٪

روز تزریق	مقدار تزریق (میلی لیتر)	روش تزریق	ماده تزریقی
۱	۱	داخل وریدی	سلول های شسته شده ۲٪
۳	۱	داخل وریدی	سلول های شسته شده ۲٪
۵	۱	داخل وریدی	سلول های شسته شده ۲٪
۷	۱	داخل وریدی	سلول های شسته شده ۲٪
۹	۱	داخل وریدی	سلول های شسته شده ۲٪

در روش دوم (تزریق داخل وریدی)، به خرگوش ها در ۵ نوبت به فاصله یک روز در میان گلبول های شسته شده ۲٪ گوسفند به طریق داخل وریدی تزریق گردید. یک خونگیری آزمایشی از گوش خرگوش ها، ۷ روز پس از آخرین تزریق بعمل می آمد. در صورتیکه تیتر، مناسب نبود تزریق تکرار می گردید. (جدول-۲)

در صورتیکه تیتر رضایت بخش بود از تمام خرگوش ها، بعد از بیهوشی کامل و بر طبق اصول اخلاقی، خونگیری کامل بعمل آمده و پس از مجزا کردن سرمها، در درجه حرارت مناسب قرار می گرفتند. جهت اطمینان از نتایج حاصل از روش های فوق تمام عملیات انجام گرفته ۲ تکرار دیگر بعمل آمد. (۵، ۶)

تیتراسیون[۲۵] همولیزین های تهیه شده

فعالیت سرم ها در هر دو روش، با روش تیتراسیون کلمر تعیین گردید. سیستم همولیتیک شامل ۰/۵ میلی لیتر از رقت های سرمی، ۰/۲۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون[۲۶] ۲٪ گلبول های گوسفندی و ۰/۵ میلی لیتر از رقت‌های کمپلمان خوکچه هندی بود. تمام رقت ها در تیتراسیون همولیزین و کمپلمان، با استفاده از محلول بافری ورونال[۲۷] کلرید سدیم به همراه یونهای کلسیم و منیزیم تهیه شدند. جهت تیتراسیون، تعدادی از لوله ها حاوی ۰/۵ میلی لیتر از رقت های دو برابر از سرم در نظر گرفته شد. سری رقت ها و مشتقات آنها محلولی حاوی سرم، گلبولهای قرمز گوسفند و کمپلمان خوکچه هندی بود که بوسیله سرنگ های نیمه اتوماتیک عمل پیپته کردن در آنها صورت می گرفت. پیپت ها در هر مرحله تعویض می شدند. خون گوسفند برای تیتراسیون با محلول آلسور[۲۸] مخلوط و در یخچال برای چندین هفته نگه داری می شد. در هر روز که تیتراسیون انجام می گرفت، ابتدا یک نمونه جدید برای ۳ مرتبه در سالین، شسته می شد و سپس با بافر، به میزان ۲٪ رقیق می گردید. برای تیتراسیون همولیزین، ۰/۲۵ میلی لیتر از سوسپانسیون به هر لوله حاوی رقت های سرمی اضافه و بمدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق انکوبه می گردید. پس از این مدت لوله ها سانتریفوژ شده و رسوب سلولی آن پس از تخلیه محلول رویی، برداشت می گردید. تعلیق مجدد آن در حجم اولیه از کمپلمان خوکچه‌هندی رقیق شده، صورت می گرفت و بمدت ۶۰ دقیقه در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده می شد. سپس لوله ها بدقت با چشم غیرمسلح مورد بازدید قرار گرفته و تیتر همولیتیک تعیین می‌گردید. بیشترین رقت، نشان دهنده کامل بودن همولیز بوده که بعنوان واحد همولیتیک[۲۹] در نظر گرفته می شد. همچنین درصد همولیز با میزان رقت نسبت معکوس دارد. تیتر ایده آل، اولین لوله بعد از لوله ای است که به میزان ۱۰۰٪ توسط عمل همولیزین، همولیز گردیده است. برای مشاهده بهتر همولیز می توان لوله ها را سانتریفوژ کرد و سپس آنها را خواند و با یک لوله ۱۰۰٪ همولیز شده مقایسه نمود. (بعنوان شاهد می توان مقدار مشابهی از گلبول های قرمز شسته شده را به آب مقطر اضافه کرد) (۲، ۳، ۴).

بررسی زمان پایداری[۳۰] و فعالیت آزمایشگاهی همولیزین‌های تهیه شده

بعد از تهیه همولیزین ها در هر دو روش به منظور بررسی زمان پایداری این محصول، با استفاده از بافر فسفات سالین[۳۱] ۰/۰۱ مولار در pH =۷/۲ و بدون هیچ ماده نگه دارنده ای، لیوفیلیزه[۳۲] گردیدند و سپس در درجه حرارت ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شدند. جهت بررسی زمان پایداری محصول نگه داری شده، به فواصل هر شش ماه یکبار و بمدت ۲ سال، هر دو محصول مورد تیتراسیون قرار گرفته و برای بررسی فعالیت آزمایشگاهی آنها، طی این فواصل نمونه هایی به آزمایشگاه برای انجام تست های سرولوژیک (ثبوت عناصر مکمل) ارسال گردید.

نتایج

آماده سازی خون گوسفند و تزریق به خرگوش‌های آزمایشگاهی

پس از تهیه خون گوسفند، تحت شرایط استاندارد، شمارش گلبول های قرمز صورت گرفت که در محدوده طبیعی (۴×۱۰^{۹} در هر میلی لیتر) قرار داشت. در طول دوره هر دو روش، هیچگونه آلودگی و بیماری در خرگوش های تحت آزمایش مشاهده نگردید و همگی از لحاظ سلامتی وضع بسیار مطلوبی داشتند.

تیتراسیون همولیزین های تهیه شده

در روش تزریق داخل پوستی خون کامل، تیتر همولیزین تولید شده، حداقل ۹۶۰۰ : ۱ بود، در حالیکه در روش تزریق داخل وریدی گلبولهای شسته شده ۲٪ میزان ۱۲۰۰ : ۱ بدست آمد. نتایج حاصل در۳ تکرار بعمل آمده در مورد دو روش ذکر شده عیناً مانند قبل بود. بنابر این نتایج حاصل از تزریق داخل پوستی خون کامل، بسیار رضایت بخش بوده و جهت تهیه همولیزین با تیتر بالا توصیه می شود. به منظور افزایش ماندگاری این

www.SID.ir

Archive of SID

محصولات، با استفاده از بافر فسفات سالین ۰/۰۱ مولار در pH= ۷/۲ و بدون هیچ ماده نگه دارنده ای لیوفیلیزه و سپس در درجه حرارت ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

بررسی زمان پایداری و فعالیت آزمایشگاهی همولیزین‌های تهیه شده

جهت بررسی زمان پایداری محصول نگه داری شده، به فواصل هر شش ماه یکبار و بمدت ۲ سال هر دو محصول مورد تیتراسیون قرار گرفتند. همولیزین تهیه شده در روش تزریق داخل پوستی خون کامل گوسفند در تمام موارد و حتی بعد از ۲ سال از تاریخ تولید، هیچگونه کاهش تیتر نداشته و در تیتر ۹۶۰۰ : ۱ باقی ماند ولی محصول تهیه شده در روش تزریق داخل وریدی سلول های شسته شده ۲٪ تا یک سال پس از تولید کاهش تیتر نداشته ولی در زمان های ۱/۵ و ۲ سال پس از تولید کاهش تیتر نشان داد و به تیتر ۶۰۰ : ۱ رسید. در تست های سرولوژیک آزمایشگاهی(ثبوط عناصر مکمل)، نتایج محصول با تیتر بالاتر بسیار مطلوب ولی محصول با تیتر پایین، نتایج قابل قبولی نداشت.

بحث

روش های متفاوت بسیاری برای تولید همولیزین ضد گوسفندی در خرگوش آزمایشگاهی توصیه گردیده، نظیر تزریق داخل وریدی، زیرپوستی و داخل پوستی، که با استفاده از مقادیر متفاوتی از سلول های خونی انجام می گیرد. در این تحقیق مشخص گردید روش تزریق داخل پوستی خون کامل گوسفند افزایش بسیار معنی داری نسبت به روش تزریق داخل وریدی سلول های شسته شده ۲٪ که بطور روتین در مراکز تحقیقاتی استفاده می شود نشان می دهد. با بررسی صورت گرفته در مورد زمان پایداری محصولات نگه داری شده در درجه حرارت ۲۰- درجه سانتی‌گراد مشخص گردید که همولیزین تهیه شده در روش تزریق داخل پوستی خون کامل گوسفند در تمام موارد و حتی بعد از ۲ سال از تاریخ تولید، هیچگونه کاهش تیتر نداشته و در تیتر ۹۶۰۰ : ۱ باقی ماند ولی محصول تهیه شده در روش تزریق داخل وریدی سلول های شسته شده ۲٪ تا یک سال پس از تولید کاهش تیتر نداشته ولی بعد از آن کاهش قابل ملاحظه‌ای در تیتر نشان داده است و از ۱۲۰۰ : ۱ به تیتر ۶۰۰ : ۱ رسیده است. البته تیتر اولیه این محصول نیز بسیار کمتر از محصول اول می باشد.

با توجه به بالا بودن تیتر همولیزین تهیه شده در روش تزریق داخل پوستی خون کامل گوسفند و اینکه تیتر مناسب قادر خواهد بود گلبول های قرمز خون را حساس کرده و تولید کمپلکس ایمنی[۳۳] مناسب و فعال سازی عناصر مکمل را نماید. این کار از طریق مسیر کلاسیک[۳۴]، جهت تولید کمپلکس مهاجم غشایی[۳۵] و لیز گلبول های قرمز گوسفند صورت می گیرد. بنابر این محصول تهیه شده در ظروف استریل ریخته شده و در درجه حرارت مناسب قرار گرفتند. (۵، ۶)

همچنین در تست های سرولوژیک آزمایشگاهی (ثبوت عناصر مکمل)، نتایج محصول با تیتر بالاتر بسیار مطلوب ولی محصول با تیترهای پایین‌تر (مربوط به روش تزریق داخل وریدی) نتایج قابل قبولی نداشت. با توجه به نتایج بدست آمده، تزریق خون کامل، به روش داخل پوستی و بر طبق دستورالعمل بکار رفته در این تحقیق، می تواند جایگزینی مناسب برای روش متداول تزریق داخل وریدی به منظور تولید همولیزین ضدگوسفندی خرگوشی با تیتر و زمان پایداری و نحوه اثر بسیار بالاتر باشد. (۲، ۳، ۴، ۱۶).

در مورد نحوه اثر آنتی ژن ها در روش های مختلف تزریق گزارشات زیادی وجود دارد. در مورد اثر بیشتر تزریق داخل پوستی نسبت به دیگر روش ها، Taliaferro و Talmage (۱۹۵۶) که در مورد واکسن های تیفوئید[۳۶] تحقیق می کردند، دریافتند که پاسخ های مناسب جهت تولید آنتی بادی از طریق تزریق داخل پوستی نسبت به سایر روش ها بیشتر می باشد. تجربیات بدست آمده در مورد تولید همولیزین ضدگوسفندی از طریق روش داخل پوستی نیز حاصل گردید. شاید جذب آرام آنتی ژن ها در روش تزریق داخل پوستی باعث این امر شود. Taliafe-ro و Taliaferro (۱۹۵۰) مشخص کردند که بعد از تزریق داخل وریدی گلبول‌های قرمز گوسفند، طحال، مسئول اولیه جهت تولید افزاینده ولی زودگذر و کوتاه مدت همولیزین می باشد. به نظر می رسد که طحال، تشکیل آنتی بادی را در حدود نقطه اوج منحنی تولید همولیزین، متوقف می کند. از آن جهت، تولید آنتی بادی فقط از منابع غیر از طحال صورت می گیرد. Rowley (۱۹۵۰) و Wissler و همکاران (۱۹۵۳) نشان دادند که در رت آزمایشگاهی، برداشتن طحال قبل از یک دز تزریق داخل صفاقی، از سوسپانسیون ۰/۵٪ گلبول های قرمز گوسفندی، به میزان یک میلی لیتر، تغییری در پاسخ همولیزین ایجاد نمی کند. مقادیر بیشتر، مورد آزمایش قرار نگرفته است. در مورد انتخاب حیوان برای تولید همولیزین گزارشات زیادی وجود دارد مبنی بر اینکه خرگوش آزمایشگاهی بهترین حیوان برای تولید همولیزین می باشد. گرچه امکان تولید همولیزین در تیتر بالا و حجم زیاد در اسب نیز وجود دارد (۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴).

با توجه به نتایج بدست آمده، تزریق خون کامل، به روش داخل پوستی و بر طبق دستورالعمل بکار رفته در این تحقیق می تواند جایگزینی مناسب برای روش متداول تزریق داخل وریدی به منظور تولید همولیزین ضدگوسفندی خرگوشی با تیتر و زمان پایداری و نحوه اثر بسیار بالاتر باشد.

تشکر و قدردانی

نویسنده این مقاله مراتب قدردانی خود را از پرسنل بخش تحقیق و تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی، کنترل کیفی و تب برفکی موسسه رازی بخاطر همکاری صمیمانه در انجام آزمایشات این تحقیق اعلام می دارد.

پاورقی ها

1-Hemolysin
2-Hemolysis
3- Erythrolysin
4- Erythrocytolysin
5-Isohemolysin
6-Autolysin
7-Heterolysin
8-Immune hemolysin
9-Complement Fixation

www.SID.ir

Archive of SID

10-Haemagglutination assay
11-Envelope
12-N-acetylneuraminic acid
13-Polyclonal antibody
14-Erlich
15-Ambo ceptor
16-Kolmer
17-Irradiation
18-Heparin
19-Dutch
20-Physiologic saline
21-Magnesium sulphate
22-Trial bleeding
23-Ethics
24-Decollate
25-Titration
26-Suspension
27-Veronal Buffered Solution
28-Alsever
29-Hemolytic unit
30-Stability time
31- Phosphate buffered saline
32-Lyophilization
33-Immune complex
34-Classical pathway
35-Membrane Attack Complex
36-Typhoid

منابع مورد استفاده

1-Archetti, I., Tittarelli, C., Cerioli, M., Brivio, R., Grilli, G. and Lavazza, A.(2008) Serum chemistry and hematology values in commercial rabbits: preliminary data from industrial farms in northern Italy, 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy.

2-Berglund, K. (1956) Hemolysin response in the rat after a single intraperitoneal injection of sheep erythrocytes. Acta Pathology and Microbiology of Scandinavy 38(3): 220-230.

3-Bratcher, R.L. (1979) High responder rabbits to SRBC, A familiar incidence, The Journal of Immunology, 122 (1) 49-53.

4-Darter, L.A. (1953) Procedure for production of anti-sheep hemolysin. Journal of Laboratory Clinical Medicine 41: 653-654.

5- Ethics of research involving animals, (2005) Published by Nuffield Council on Bioethics, 28 Bedford Square London, WC1B 3JS.

6-Fish, R.R.E., Brown, M.J., Danneman, P.J. and Karas, A.Z. (2008) Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals, Second Edition , American College of Laboratory Animal Medicine.

7-Harkness, J.E., Turner,P.V.and Woude,S,V. (2010) Harkness and Wagner's Biology and Medicine of Rabbits and Rodents, 5th revised edition, Iowa State University Press.

8-Henry, J.B. (2001) Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 20th ed. USA Press, 908.

9-Kohn, H.I. (1951) Effect of x rays upon hemolysin production in the rat. Journal of Immunology 66(5): 525-533.

10-Koyama, J. and Nashimoto, H. (1959) Immunological studies on rabbit hemolysin to sheep red cells. I. The electrophoretic separation of rabbit antisera to sheep red cells. Japanese Journal of Experimental Medicine 29: 551-559.

11- Koyama, J. and Nashimoto, H. (1959) Immunological studies on rabbit hemolysin to sheep red cells. II. The separation and purification of the hemolysin with an anion exchanger: diethylaminoethyl cellulose. Japanese Journal of Experimental Medicine 29: 561-570.

12- Manning, P.J., Ringler, D.H. and Newcomer, C. E. (1994) The Biology of the Laboratory Rabbit, 2nd edition, Academic Press, Orlando, Florida.

13- Mark A. Suckow,M.A., Schroeder, V. and. Douglas, F.A. (2010) The Laboratory Rabbit, Second Edition, CRC Press.

14-Mukani, W.O., Nyangao, J.N.M., Kiamani, J.K., Omuse, J.K. (1995) Studies on the haemolytic complement of the dromedary camel (Camelus dromedaries), I. Classical pathway haemolytic activity in serum, Veterinary Immunilogy and Immunopathology, 46: 339.

15-Nakamura, R. M., Burek, C.L., Cook, L., Folds, J.D. (1998) Clinical diagnostic immunology: Protocols in quality assurance and standardization, USA Press, 94-95.

16-Oyama, J., Nashimoto, Y. and Masuyoshi, T. (1961) Immunological studies on the anti-sheep-erythrocyte hemolysin of the rabbit. Nippon Saikingaku Zasshi 16: 641-642.

17-Palmer, D.F. (1980) Complement fixation test, Manual of clinical immunology (2nd edition), 35-47.

18-Pike, R.M. and Schulze, M. L. (1960) Agglutination in rheumatoid arthritis serum of sheep cells sensitized with hemolysin and infectious mononucleosis agglutinins. Journal of Immunology 85: 523-529.

19-Rowan, A.N. (1995) Animals in research,Cardiovascular Research, 29(4):583.

20-Smith, F. and Ruth, H.J. (1955) Hemolysin production in irradiated mice given spleen or bone-marrow homogenate. Proceeding of Society in Experimental Biological Medicine 90(1): 187-191.

21- Suckow,M.A., Stevens, K.A.and Wilson, R.P. (2012) The Lab-

www.SID.ir

Archive of SID

oratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents, American College of Laboratory Animal Medicine, Academic Press.
22-Taliaferro, W.H. and Taliaferro, L.G. (1950) The dynamics of hemolysin formation in intact and splenectomized rabbits. Journal of Infectious Diseases 87: 37-62.
23-Taliaferro, W.H. and Talmage, D.W. (1956) Antibodies in the rabbit with different rates of metabolic decay. Journal of Infectious Diseases 99: 21-33.
24-Talmage, D.W., Freter, G.G. and Taliaferro, W.H. (1956). The effect of whole body x radiation on the natural sheep cell hemolysin of the rabbit. Journal of Infectious Diseases 99(3): 241-245.
25 - UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals, (2010) 8th edition,Wiley-Blackwell.

www.SID.ir