Archive of SID

تهیه آزمایشگاهی سرم هایپرایمن علیه ویروس تب سه‌روزه گاو جداشده در ایران

شکوفه الماسی و مهران بخشش*

ایران، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی کرج، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، بخش تحقیق و تشخیص بیماری-های ویروسی دام

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۲۳

چکیده

باتوجه به کاربردهای متعدد آنتی‌بادی پلی‌کلونال در زمینه‌های تحقیقاتی و بالینی، ابداع روش‌های تهیه‌ی سرم هایپرایمن علیه عوامل بیماری‌زا از اهمیت بسیار برخوردار است. در تحقیق انجام‌شده سعی بر تولید آنتی‌بادی علیه ویروس تب سه‌روزه‌ی گاو، روشی برای تولید سرم هایپرایمن ابداع گردید. بدین منظور ویروس کامل با عیار $10^{6.7}$ $TCID_{50}$ در سه دوز و با در نظر گرفتن فواصل زمانی صفر، یک و چهار هفته، به روش وریدی و بدون استفاده از یاور(Adjuvant) به خرگوش تزریق شد. دست‌یابی به سرم هایپرایمن با عیار بالا نتیجه‌ی مطلوب این تحقیق است، بطوریکه میانگین آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده علیه ویروس۱۶۲۵ برآورد گردید. که در مقایسه با مطالعات گذشته، کارایی بالای خود را در تولید آنتی‌بادی علیه عامل ویروسی نشان می‌دهد. سرم هایپرایمن بدست آمده از این مطالعه قطعاً بعنوان یک ماده بیولوژیک در زمینه‌های تحقیقاتی و در صورت لزوم تجاری، مفید و راهبردی خواهد بود. همچنین به عنوان یک روش در تولید سرم‌های هایپرایمن علیه ویروس‌های دیگر می‌تواند موردتوجه محققین و صاحب‌نظران قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بادی پلی‌کلونال، خرگوش، رابدوویروس

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۶۳۴۵۷۰۰۳۸، پست الکترونیکی: m.bakhshesh@rvsri.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر تولید آنتی‌بادی در آزمایشگاههای تحقیقاتی گسترش‌یافته و کاربردهای مختلفی در زمینه‌های پژوهشی پیداکرده است. بعنوان نمونه می‌توان به درمان و انجام آزمایش‌های تشخیصی نظیر خنثی‌سازی و الایزا، وسترن بلات، روش‌های ایمنوهیستوشیمیایی، میکروسکوپ ایمنوفلورسانس، ایمنوالکترون و کنترل کیفی واکسن اشاره نمود (۱۰). محققان بمنظور تولید آنتی‌بادی با روش‌های متعددی روبرو هستند که انتخاب بهترین و کاربردی‌ترین روش از اهمیت بالایی برخوردار است (۵). آنتی‌بادی‌ها بواسطه‌ی سیستم ایمنی در پاسخ اختصاصی به یک ایمنوژن تولیدشده و از پلاسماسل‌هایی ترشح می‌شوند که در پی انگیزش مناسب با ایمنوژن خارجی، از لنفوسیت-های B تمایزیافته‌اند. بدین‌صورت که پس از عرضه‌ی اولیه‌ی آنتی‌ژن بیگانه پاسخ اولیه شکل می‌گیرد. این پاسخ به دنبال واکنش‌های خارج فولیکولی بوده و آنتی‌بادی تولیدشده غالباً از کلاس IgM است. اما در ادامه با واکنش-هایی که در مراکز زایا صورت می‌گیرد، دو رخداد عمده به وقوع می‌پیوندد: اول، تغییر کلاس آنتی‌بادی از IgM به IgG یا IgA، و دوم بلوغ (افزایش) افینیتی در لنفوسیت‌های B برای آنتی‌ژن اختصاصی‌شان. نتیجه‌ی این تغییرات تولید بیشتر آنتی‌بادی با ظرفیت بالاتر برای اتصال به آنتی‌ژن است. طی واکنش‌های صورت گرفته در مراکز زایا شمار بسیاری از پلاسماسل‌های اختصاصی ساخته می‌شوند. مقدار IgG تولیدشده در مقابل آنتی‌ژن طی ۴ تا ۶ هفته پس از ایمن‌سازی اولیه به بیشترین مقدار خود می‌رسد (۱۴). پاسخ هومورال می‌تواند به‌صورت تولید آنتی‌بادی‌های پلی-

www.SID.ir

Archive of SID

کلونال باشد که توسط کلون‌های مختلف لنفوسیت B ساخته می‌شوند (۱۰). تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال نسبت به آنتی‌بادی منوکلونال زمان، هزینه و زحمت کمتری صرف می‌کند و مواد و وسایل موردنیاز آن نیز در دسترس‌تر است (۳). این نوع آنتی‌بادی در زمینه‌های تحقیقاتی ازجمله مقایسه‌ی شباهت آنتی‌ژنی، کنترل مثبت در تست‌های خنثی‌سازی، مطالعات بالینی و سرولوژی (تعیین هویت ویروسهای جدا شده و تهیه‌ی کیت تشخیصی از جمله الایزا)، پیشگیری از بیماری و... کاربردهای فراوان دارد. در آزمایش‌های تشخیصی و تحقیقاتی استفاده ازسرمی که در حیوانی بافاصله‌ی تکاملی بیشتر از میزبان اصلی تهیه‌شده باشد، واکنش ناخواسته با پروتئین‌های مشابه و غیراختصاصی را کاهش می‌دهد (۳).

این مطالعه باهدف تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه ویروس تب سه روزه‌ی گاو (Bovine ephemeral fever) انجام شد. بیماری تب سه روزه ازجمله بیماریهای منتقل‌شونده از طریق بندپایان است که در گاو و گاومیش نوعی بیماری ناتوان‌کننده را منجر می‌شود و بدنبال آن کاهش میزان شیردهی در گاوها، سقط‌جنین، ناباروری موقت و کاهش کیفیت محصول گوشت دیده می‌شود. درنتیجه خسارات اقتصادی فراوان به صنعت گاوداری وارد شده که با ایجاد محدودیت صادرات دام و فراورده‌های آن همراه است. عامل ویروسی این بیماری در جنس *Ephemerovirus* و خانواده‌ی *Rhabdoviridae* قرارگرفته است. گلیکوپروتئین G این ویروس که تنها پروتئین سطحی آن است، عمده‌ترین پروتئین ایمنی‌زای آن بوده و علیه اپیتوپ‌های مختلف آن آنتی‌بادی خنثی‌کننده تولید می‌شود. این ویروس طی سال‌های اخیر در ایران جداشده (۲) و مطالعات ویروس‌شناسی، اپیدمیولوژی و ساخت واکسن آن در جریان است. در همین راستا این تحقیق برحسب نیاز به آنتی‌بادی پلی‌کلونال به‌منظور انجام مطالعات روی این ویروس طراحی گردید.

مواد و روشها

۱- آماده‌سازی ویروس جهت تزریق: تکثیر ویروس در کشت سلول Vero و محیط کشت DMEM= Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) حاوی ۲٪ FBS (سرم جنین گوساله/ Gibco, Invitrogen) و محلول ذخیره‌ی آنتی‌بیوتیک (شامل ۱۰۰U پنی‌سیلین G و ۵۰µg استرپتومایسین به ازای هر میلی‌لیتر از محیط کشت) انجام شد و پس از شش پاساژ متوالی، عیار آن با روش ۵۰ TCID= Tissue culture infectious dose 50% اندازه‌گیری گردید. به این ترتیب که رقتهای $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۸}$ از سوسپانسیون ویروس در میکروپلیت ۹۶ خانه و در تکرارهای هشت‌تایی با بستر سلولی (سلول Vero) مواجه شده، سپس بمدت چهار روز در دمای ۳۷° C و ۵٪ $CO_۲$ نگهداری شد. با خوانش تعداد چاهک‌های حاوی اثرات سایتوپاتیک مثبت و منفی در هر رقت، تیتر ویروس به روش رید و مانچ (۱۲) محاسبه گردید. برای انجام این کار ابتدا با ثبت موارد مثبت و منفی، فراوانی تجمعی و سپس درصد موارد مثبت بدست آمد.

$$\text{End point} = ۱۰^{-X} \quad \text{(تیتر نهایی ویروس)}$$

$$X = \text{لگاریتم رقت بالای ۵۰٪} + \frac{\text{۵۰ – درصد موارد مثبت بالای ۵۰ ٪}}{\text{درصد موارد مثبت زیر ۵۰٪ – درصد موارد مثبت بالای ۵۰ ٪}} \times \text{فاصله‌ی لگاریتمی}$$

پس از این‌که ویروس به عیار مناسب ($۱۰^{۶.۷}$ $TCID_{۵۰}$) رسانده شد، سلول‌ها و محیط کشت حاوی ویروس برداشت گردید. سپس با انجام سانتریفیوژ (International Equipment, Co-Needham HTC Massachusetts) در ۳۰۰۰RPM و دمای ۴°C به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه، اجزاء سلولی رسوب داده شده و مایع رویی برای تزریق برداشت گردید.

۲- تزریق به خرگوش و تهیه‌ی سرم هایپرایمن: بدین منظور پنج خرگوش سفید ماده از نژاد Ducth برای تزریق

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه انتخاب‌شده و چهار خرگوش دیگر بعنوان شاهد در نظر گرفته شدند. برای تولید آنتی‌بادی باید از خرگوش‌های جوان (۱۶-۱۰ هفته، به وزن ۲ تا ۲,۵ کیلوگرم) استفاده کرد. دراین سن سطح آنتی‌بادی مادری تقریباً از بین رفته و سیستم ایمنی خود خرگوش به حد بزرگسال رسیده است (۱۱). خرگوش‌های سفید یا قرمز نیوزیلندی بهترین منبع برای بدست آوردن آنتی‌سرم اختصاصی‌اند، زیرا هر بار می‌توان ۳۰ تا ۵۰ سی‌سی از آن‌ها خون گرفت (۳).

قبل از آغاز تزریق ابتدا از خرگوش‌های مورد آزمایش خونگیری شد تا از عدم وجود آنتی‌بادی علیه ویروس‌های تزریق‌شده اطمینان حاصل شود (سرم پیش ایمن). نوبت اول با تزریق ۲ سی‌سی از مایع حاوی ویروس با عیار $10^{6,7}$ $TCID_{50}$، بدون استفاده از یاور، به داخل ورید حاشیه‌ای گوش (Marginal ear vein) صورت پذیرفت. به سه خرگوش شاهد، دو سی‌سی مایع رویی کشت سلول پس از سانتریفیوژ (Supernatant)، بدون ویروس تزریق‌شده و خرگوش شاهد دیگر بدون تزریق باقی ماند. بمنظور یادآوری و افزایش عیار آنتی‌بادی، تزریقات بعدی به همان مقدار و با برنامه زیر تکرار شد:

روز ۰ : اولین تزریق و عرضه‌ی آنتی‌ژن

روز ۷ : تزریق اولین یادآور

روز ۲۸ : تزریق دومین یادآور

روز ۴۲ : خونگیری و تهیه‌ی سرم به شرح زیر

پس از نیم ساعت انکوباسیون نمونه‌های خون در لوله‌ی حاوی ماده فعال کننده لخته در دمای 37^{o} C، به مدت ۱۰ دقیقه در۳۰۰۰RPM سانتریفیوژ شدند. سرم‌های بدست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری 56^{o} C قرار گرفت تا اجزای کمپلمان غیرفعال شوند.

۳- اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی: اندازه‌گیری میزان آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولیدشده علیه ویروس، با آزمایش خنثی‌سازی ویروس (Virus Neutralization Test) انجام شد. این کار در میکروپلیت ۹۶ خانه صورت گرفت و برای هر رقت سرمی چهار چاهک در یک ردیف اختصاص یافت. در هر چاهک ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی ۱۰۰$TCID_{50}$. ویروس با حجم مساوی سرم (۵۰ میکرولیتر از رقت‌های سریالی ۱/۲ تا ۱/۸۱۹۲) مواجه شد. در کنار چاهک‌های نمونه، کنترل سلول، کنترل ویروس و کنترل مثبت و منفی سرم قرارداده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس سوسپانسیون سلولی Vero با تراکم 10^{6} cell/ml به چاهک‌ها اضافه‌شده و در گرم‌خانه‌ی 37^{o}C حاوی ۵٪ CO_2 قرارگرفت. خوانش میکروپلیت پس از ۴ تا ۵ روز براساس مشاهده‌ی اثرات سایتوپاتیک (cytopathic effect) بدنبال تکثیر ویروس انجام پذیرفت و مقدار عیار آنتی‌بادی بدست آمده به روش رید و مانچ (۱۲) محاسبه شد.

نتایج

به منظور اطمینان از نتایج بدست آمده، عیار آنتی‌بادی با روش VNT انجام‌شده و برای هر سرم سه بار تکرار گردید. سپس میانگین هندسی عیار آنتی بادی و انحراف معیار عیار آنتی بادی برای هرکدام از خرگوش‌ها و نهایتاً بین هر پنج خرگوش تعیین شد (جدول ۱).

(میانگین هندسی)

$$\bar{X} = \sqrt[n]{x1.x2 \dots .xn}$$

به دنبال ایمن‌سازی خرگوش‌ها در فواصل زمانی گفته‌شده با دوز بالای ویروس، سیستم ایمنی هومورال هریک از خرگوش‌ها برانگیخته شد و درنتیجه میزان قابل‌ملاحظه‌ای از آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده علیه ویروس تب سه‌روزه بدست آمد. میانگین عیار آنتی‌بادی در خرگوش‌ها بین ۸۱۲ تا ۴۰۹۶ و به‌طور میانگین ۱۶۲۵ در کنار انحراف معیار برآورد گردید. تمام خرگوش‌های شاهد فاقد عیار آنتی‌بادی علیه این ویروس بودند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ – عیار آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولیدشده علیه ویروس تب سه‌روزه در هریک از خرگوش‌ها و میزان آنتی‌بادی تولیدشده در هر یک از تکرارها

	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	میانگین هندسی	انحراف معیار
خرگوش ۱	۱۰۲۴	۱۰۲۴	۵۱۲	۸۱۲	۲۴۴
خرگوش ۲	۱۰۲۴	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۱۶۲۵	۲۳۹
خرگوش ۳	۴۰۹۶	۴۰۹۶	۴۰۹۶	۴۰۹۶	۰
خرگوش ۴	۱۰۲۴	۱۰۲۴	۱۰۲۴	۱۰۲۴	۰
خرگوش ۵	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۰
میانگین	۱۵۵۲	۱۷۸۲	۱۵۵۲	۱۶۲۵	۹۶/۶
خرگوش‌های شاهد	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰

بحث

در راستای دست‌یابی به سرم هایپرایمن با عیار بالا علیه ویروس‌های مختلف مطالعات متنوعی صورت گرفته است که در آن‌ها از روش‌ها، فواصل زمانی و یاورهای مختلف (ازجمله یاور کامل فروند و هیدروکسید آلومینیوم) استفاده‌شده است. در هرکدام از مطالعات باتوجه به هدف تولید سرم، عیار متفاوتی بدست آمده است. بااین‌حال تولید آنتی‌بادی فرایندی پیچیده است و همیشه امکان کسب نتایج مشابه وجود ندارد (۱۳). گاهی برای دست‌یابی به اهدافی خاص تزریق یک دوز کافی‌ست، اما اصولاً تیتر بالاتر آنتی‌بادی با چند تزریق به‌صورت یادآور بدست می‌آید. در مطالعه‌ی حاضر باتوجه به نیاز به سرم هایپرایمن علیه ویروس تب سه‌روزه در کشور روشی بر مبنای تزریق دوزهای یادآور با عیار بالای ویروس ابداع گردید و به شکلی مؤثر کارایی خود را در تولید آنتی‌بادی نشان داد. از مزیت‌های این روش و تولید آنتی‌بادی در خرگوش این است که احتمال واکنش ناخواسته با پروتئین‌های گاوی به حداقل می‌رسد.

تهیه‌ی سرم هایپرایمن با استفاده از روش تزریق وریدی ویروس قبلاً نیز تجربه‌شده است. در مطالعه‌ای Webster (۱۵) بر مبنای پاسخ آنتی‌بادی در خرگوش‌ها طی یک دوره‌ی حدوداً سه‌ماهه نشان داد که تزریق مقادیر یکسان ویروس آنفلوانزا به روش درون وریدی نسبت به روش درون صفاقی یا زیرجلدی ارجحیت دارد. در روش درون وریدی، آنتی‌ژن ابتدا وارد طحال (به عنوان بافت لنفاوی اولیه) و سپس گره‌های لنفاوی شده و تمام اجزای سیستم ایمنی را فعال می‌نماید. در این روش، هیچ‌گاه نباید از یاور استفاده کرد. البته باید توجه شود که در این روش، خطر آمبولی ریوی یا شوک آنافیلاکتیک کشنده در حیوان حساس به میزان پایین وجود دارد. همچنین از عدم آلودگی آنتی‌ژن باید اطمینان حاصل شود. آلودگی بسیار ناچیز با سایر اجرام گاهی می‌تواند ایمنی بیشتری نسبت به آنتی‌ژن موردنظر ایجاد کند (۱۱).

در غالب مطالعاتی که بمنظور تهیه‌ی سرم هایپرایمن علیه سایر ویروس‌ها صورت پذیرفته است، تزریق ویروس به شکل زیر جلدی و یا عضلانی انجام‌شده، بعلاوه اینکه در بیشتر موارد از یاور هم برای عرضه‌ی آنتی‌ژن استفاده‌شده است (۱، ۷، ۸ و۱۳). حاصل به‌کارگیری این روش‌ها با افزایش دفعات تزریق یادآور حتی تا شش بار (۷)، بدست آمدن مقدار آنتی‌بادی تا عیار ۱/۱۰۲۴ بوده است.

همین‌طور در مطالعاتی که روی ویروس تب سه‌روزه انجام‌شده (۴، ۶و ۹) با استفاده از روش‌های ذکرشده، حاصل کار مقادیر متفاوتی از آنتی‌بادی خنثی‌کننده بوده است. کاتو و همکاران (۹) در راستای تحقیق خود روی این ویروس، با بهره‌گیری از روش تعریف‌شده توسط بنیاد ملی سلامت حیوانات در سال ۲۰۰۷، علیه تب سه‌روزه سرم هایپرایمن تهیه کردند. این روش به‌صورت وریدی و بدون یاور، در دو دوز تزریق به فاصله‌ی سه هفته و

www.SID.ir

Archive of SID

خونگیری پس از ده روز، طراحی‌شده و نتیجه‌ی آن دست-یابی به عیار تقریبی ۱/۱۴۰۰ بود.

اطلاعات بدست آمده از تحقیقات گذشته بسته به نوع ویروس، نوع حیوان مورد آزمایش، دوز تزریق، استفاده از انواع یاورها، فواصل تزریق و... نتایج متفاوتی بدنبال داشته است. اما بنیان‌گذاری روش‌هایی که با امکانات موجود بهترین نتیجه را بدست دهد نیاز به علم، تجربه و بررسی همه‌جانبه دارد. در مطالعه‌ی پیش رو نیز که باهدف دست-یابی به سرم هایپرایمن جهت ادامه‌ی مطالعات تحقیقاتی روی ویروس تب سه‌روزه انجام شد، با در نظر گرفتن همه‌ی جوانب و در مقایسه با سایر تحقیقات، روش ابداع‌شده منجر به تولید محصول (سرم هایپرایمن) با عیار و کارایی بالا گردید که می‌تواند نیازهای تحقیقاتی موردنظر را برآورده کند و راه‌گشای تولید آنتی‌بادی در تحقیقات ویروس‌شناسی باشد.

سرم تهیه‌شده برای اهداف مختلف تحقیقاتی ازجمله مطالعه‌ی اپیتوپ‌های آنتی‌ژنیک استفاده می شود (۱۶)، همچنین بعلت احتمال پائین ایجاد واکنشهای متقاطع با پروتئین‌ها و اجرام بیماری‌زای گاوی برای آزمایشاتی نظیر میزان خنثی‌کنندگی جدایه‌های مختلف، جداسازی ویروس‌های جدید یا مطالعات سرواپیدمیولوژی و...کاربرد دارد. بعلاوه در مقیاس وسیع‌تر ممکن است بتوان با بهینه نمودن روش کار از سرم هایپرایمن باهدف ایجاد ایمنی غیرفعال برای مقابله با این بیماری استفاده کرد.

منابع

1- Attyat, M. K., and Wafaa, R., 2015."Efficacy of canine parvovirus hyperimmune serum prepared in horses for treatment of canine parvo and feline panleucopenia infections." Behna veterinary medical journal, 28(2), PP: 34-39

2- Bakhshesh, M, and Abdollahi, D., 2015. "Bovine Ephemeral fever in Iran: Diagnosis, isolation and molecular characterization." Journal of arthropod-borne diseases 9(2), 195 p.

3- Cooper, H. M., and Paterson, Y., 2009. "Production of polyclonal antisera." Current protocols in neuroscience, 5.5. 1-5.5. 10.

4- Cybinski, D., and H., Zakrzewski, 1983. "The isolation and preliminary characterization of a rhabdovirus in Australia related to bovine ephemeral fever virus." Veterinary Microbiology 8(3), PP: 221-235.

5- Hanly, W. C., Artwohl, J. E., and Bennett, B. T., 1995. "Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry." ILAR journal 37(3), PP: 93-118.

6- Hsieh, Y. C., Wang, S. Y., Lee, Y., Chen, S. H., Mak, P. O., and Chu, C. Y., 2006. "DNA sequence analysis of glycoprotein G gene of bovine ephemeral fever virus and development of a double oil emulsion vaccine against bovine ephemeral fever." Journal of veterinary medical science 68(6), PP: 543-548.

7- Hussain, I., Rasool, M., and Mahmood, M., 2004. "Production of hyperimmune serum against infectious bursal disease virus in rabbits." Pak. Vet. J 24, PP: 179-183.

8- Islam, M., Parvin, M., Akhter, J., Islam, M., Siddique, M., and M.Rashid 2014. "Clinical Evaluation of Hyperimmune Serum for the Treatment of Newcastle Disease in Indigenous Layer Birds." Progressive Agriculture 24(1-2), PP: 79-84.

9- Kato, T., Aizawa, M., Takayoshi, K., Kokuba, T., Yanase, T., Shirafuji, H., Tsuda T., and Yamakawa M., 2009. "Phylogenetic relationships of the G gene sequence of bovine ephemeral fever virus isolated in Japan, Taiwan and Australia." Veterinary microbiology 137(3), PP: 217-223.

10- Leenaars, M., and Hendriksen C. F., 2005. "Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations." Ilar Journal 46(3), PP: 269-279.

11- Protocol-Rabbits, P.A.P. 2007. Polyclonal Antibody production Protocol-Rabbit Florida State University. www.research.fsu.edu/media/1851/antibody-production_polyclonal.pdf.

12- Reed, L. J., and Muench, H., 1938. "A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS." American journal of epidemiology 27(3), PP: 493-497.

13- Samiullah, M., Rizvi, F., Anjum A., and Shah M., 2006. "Raising hyperimmune serum against

www.SID.ir

Archive of SID

Avian Paramyxovirus (APMV-1) and Pigeon Paramyxovirus (PPMV-1) in rabbits and their cross reactivity." Pakistan Journal of Biological Sciences 9(11), PP: 2184-2186.

14- Siegrist, C. A., 2012. Vaccine immunology, section1, Chapter 2 in Vaccines, 6th edition; Edited by Plotkin,S., W,Orenstein., P, Offit. Saunders Elsevier, Philadelphia, USA, PP: 17-37.

15- Webster, R., 1965. "The immune response to influenza virus: I. Effect of the route and schedule of vaccination on the time course of the immune response, as measured by three serological methods." Immunology 9(6), 501 p.

16- Yazdani, F., Bakhshesh, M., Esmaelizad, M., Sadigh, Z.A., 2017. "Expression of G1-epitope of bovine ephemeral fever virus in E. coli: A novel candidate to develop ELISA kit". Veterinary Research Forum 8 (3): 209-213

Laboratory production of hyperimmune serum against Bovine ephemeral fever virus isolated in Iran

Almasi S. and Bakhshesh M.

Dept. of animal virology, research and diagnosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, I.R. of Iran

Abstract

Considering the numerous applications of polyclonal antibodies in research and clinical fields, the development of methods for preparation of hyperimmune serum against pathogens is very important. In this research, a method for producing hyperimmune serum against bovine ephemeral fever virus was introduced. The hyperimmune serum was raised in rabbit using at least $10^{6.7}$ $TCID_{50}$ of the whole viral particle which was administered intravenously without adjuvant. Antigen presentation was carried out at 0, 1 and 4 weeks intervals. In comparison to the previous studies, this schedule resulted in a high titer of hyperimmune serum against the virus as the mean of neutralizing antibodies was determined at 1625. The hyperimmune serum as a biological product of this research will definitely be exploited in the experiments required for research as well as possible commercial applications in the future. This method is also introduced for producing hyperimmune serum against other viruses, especially rhabdoviruses.

Key words: Polyclonal antibody, rabbit, Rhabdovirus

www.SID.ir