

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 $10^{6.7}$ TCID₅₀ 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 ختنی‌کننده علیه ویروس ۱۶۲۵ 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

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 واکنش‌هایی 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 -

در سال‌های اخیر تولید آنتی‌بادی در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی گسترش یافته و کاربردهای مختلفی در زمینه‌های پژوهشی پیدا کرده است. بعنوان نمونه می‌توان به درمان و انجام آزمایش‌های تشخیصی نظیر ختنی‌سازی و ایذا، و سترن بلات، روش‌های ایمنو هیستوشیمیایی، 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 لنفوسیت‌های B تمایز یافته‌اند. بدین‌صورت که پس از عرضه‌ی

مواد و روشها

۱- آماده‌سازی ویروس جهت تزریق: تکثیر ویروس در کشت سلول Vero و محیط کشت DMEM= Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco,) /۲ حاوی (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) و محلول FBS (سرم جنین گوساله / Gibco, Invitrogen) و 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 C ۳۷ و CO₂ ۵٪ نگهداری شد. با خوانش تعداد چاهک‌های حاوی اثرات سایتوپاتیک مثبت و منفی در هر رقت، تیترو ویروس به روش رید و مانچ (۱۲) محاسبه گردید. برای انجام این کار ابتدا با ثبت موارد مثبت و منفی، فراوانی جمععی و سپس درصد موارد مثبت بدست آمد.

$$\text{End point} = 10^{-X} \text{ (تیترو نهایی ویروس)}$$

$$X = \frac{\text{درصد موارد مثبت بالای } 50\% - \text{درصد موارد مثبت زیر } 50\%}{\text{تکثیرم رقت بالای } 50\% + \text{درصد موارد مثبت بالای } 50\%}$$

پس از این‌که ویروس به عیار مناسب (TCID₅₀ ۱۰^{۶.۷}) رسانده شد، سلول‌ها و محیط کشت حاوی ویروس برداشت گردید. سپس با انجام ساترفیوژ (International Equipment, Co-Needham HTC Massachusetts) در ۳۰۰۰RPM و دمای C ۴ 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

کلونال باشد که توسط کلون‌های مختلف لنفوسیت B ساخته می‌شوند (۱۰). تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال نسبت به آنتی‌بادی مونوکلونال زمان، هزینه و زحمت کمتری صرف می‌کند و مواد و وسایل موردنیاز آن نیز در دسترس‌تر است (۳). این نوع آنتی‌بادی در زمینه‌های تحقیقاتی از جمله 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 از سرمی 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 از جمله 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. در نتیجه خسارات اقتصادی فراوان به صنعت گاوداری وارد شده که با ایجاد محدودیت صادرات دام و فرآورده‌های آن همراه است. عامل ویروسی این بیماری در جنس *Ephemerovirus* و خانواده‌ی *Rhabdoviridae* قرار گرفته 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 جدا شده (۲) و مطالعات ویروس‌شناسی، اپیدمیولوژی و ساخت واکسن آن در جریان است. در همین راستا این تحقیق برحسب نیاز به آنتی‌بادی پلی‌کلونال به منظور انجام مطالعات روی این ویروس طراحی گردید.

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 10^6 TCID₅₀ 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 قرار داده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس سوسپانسیون سلولی Vero با تراکم 10^6 cell/ml به چاهک‌ها اضافه شده و در گرم‌خانه‌ی 37°C حاوی $5\% \text{CO}_2$ قرار گرفت. خوانش میکروپلیت پس از ۴ تا ۵ روز براساس مشاهده‌ی اثرات سایتوپاتیک (cytopathic effect) بدنال 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 انجام شده و برای هر سرم سه بار تکرار گردید. سپس میانگین هندسی عیار آنتی‌بادی و انحراف معیار عیار آنتی‌بادی برای هر کدام از خرگوش‌ها و نهایتاً بین هر پنج خرگوش تعیین شد (جدول ۱).

(میانگین هندسی)

$$\bar{X} = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot \dots \cdot x_n}$$

به دنبال ایمن‌سازی خرگوش‌ها در فواصل زمانی گفته شده با دوز بالای ویروس، سیستم ایمنی هومورال هر یک از خرگوش‌ها برانگیخته شد و در نتیجه میزان قابل ملاحظه‌ای 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.

نمونه انتخاب شده 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. در این 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 تزریق شده اطمینان حاصل شود (سرم پیش ایمن). نوبت اول با تزریق ۲ سی‌سی از مایع حاوی ویروس با عیار $10^{6.7}$ TCID₅₀ 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 تزریق شده 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°C ، به مدت ۱۰ دقیقه در 3000RPM سانتریفیوژ شدند. سرم‌های بدست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری 56°C قرار گرفت تا اجزای کمپلمان غیرفعال شوند.

۳- اندازه‌گیری تیتراژ آنتی‌بادی: اندازه‌گیری میزان آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده علیه ویروس، با آزمایش خنثی‌سازی ویروس (Virus Neutralization Test) انجام شد. این کار

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
۱۰۲۴	۱۰۲۴	۵۱۲	۸۱۲	۲۴۴
۱۰۲۴	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۱۶۲۵	۲۳۹
۴۰۹۶	۴۰۹۶	۴۰۹۶	۴۰۹۶	۰
۱۰۲۴	۱۰۲۴	۱۰۲۴	۱۰۲۴	۰
۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۰
۱۵۵۲	۱۷۸۲	۱۵۵۲	۱۶۲۵	۹۶/۶
۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰

بحث

در راستای دستیابی به سرم‌های پیرایمن با عیار بالا علیه ویروس‌های مختلف مطالعات متنوعی صورت گرفته است که در آن‌ها از روش‌ها، فواصل زمانی و یاورهای مختلف (از جمله یاور کامل فروند و هیدروکسید آلومینیوم) استفاده شده است. در هر کدام از مطالعات باتوجه به هدف تولید سرم، عیار متفاوتی بدست آمده است. باین حال تولید آنتی‌بادی فرایندی پیچیده است و همیشه امکان کسب نتایج مشابه وجود ندارد (۱۳). گاهی برای دستیابی به اهدافی خاص تزریق یک دوز کافی است، اما اصولاً تیترا بالاتر آنتی‌بادی با چند تزریق به صورت یادآور بدست می‌آید. در مطالعه‌ی حاضر باتوجه به نیاز به سرم‌های پیرایمن 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 سرم‌های پیرایمن با استفاده از روش تزریق وریدی ویروس قبلاً نیز تجربه شده است. در مطالعه‌ی 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 مورد نظر ایجاد کند (۱۱).

در غالب مطالعاتی که بمنظور تهیه‌ی سرم‌های پیرایمن علیه سایر ویروس‌ها صورت پذیرفته است، تزریق ویروس به شکل زیر جلدی و یا عضلانی انجام شده، بعلاوه اینکه در بیشتر موارد از یاور هم برای عرضه‌ی آنتی‌ژن استفاده شده است (۱، ۷، ۸ و ۱۳). 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 انجام شده (۴، ۶ و ۹) با استفاده از روش‌های ذکر شده، 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 سرم‌های پیرایمن تهیه کردند. این روش به صورت وریدی و بدون یاور، در دو دوز تزریق به فاصله‌ی سه هفته و

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 از جمله مطالعه‌ی اپیتوپ‌های آنتی‌ژنیک استفاده می‌شود (۱۶)، همچنین بعلاوه احتمال پائین ایجاد واکنش‌های متقاطع با پروتئین‌ها و اجرام بیماری‌زای گاو برای آزمایشاتی نظیر میزان خشتی‌کنندگی جدایه‌های مختلف، جداسازی ویروس‌های جدید یا مطالعات سرواپیدمیولوژی و... کاربرد دارد. بعلاوه در مقیاس وسیع‌تر ممکن است بتوان با بهینه نمودن روش کار از سرم‌های پیرایمن باهدف ایجاد ایمنی غیرفعال برای مقابله با این بیماری استفاده کرد.

خونگیری پس از ده روز، طراحی شده 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 سرم‌های پیرایمن 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 (سرم‌های پیرایمن) با عیار

منابع

- 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
- 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.
- Cooper, H. M., and Paterson, Y., 2009. "Production of polyclonal antisera." *Current protocols in neuroscience*, 5.5. 1-5.5. 10.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Protocol-Rabbits, P.A.P. 2007. Polyclonal Antibody production Protocol-Rabbit Florida State University. www.research.fsu.edu/media/1851/antibody-production_polyclonal.pdf.
- 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.
- Samiullah, M., Rizvi, F., Anjum A., and Shah M., 2006. "Raising hyperimmune serum against

- 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, section 1, 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 $10^{6.7}$ TCID₅₀ 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