**پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)**
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۶، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱، صفحات ۱۶۷ تا ۱۷۲

**مقاله اصلی**
**(Original Article)**

# ساخت آنتی بادی فلورسنت علیه ویروس هاری و بررسی کارایی آن

**وحید غلامی ارجنکی[۱]، سید حمید رضا مژگانی[۲]، نرگس میاندهی[۲]، علیرضا جنانی[۲]، مهدی آجورلو[۲]، علیرضا زواره[۳]، سید محمد اطیابی[۴]، نبی الله نامور اصل[۵]، سعید جدیری اسلامی[۲]، علی مرادی جوشقان[۲]، فرزانه احمد نژاد[۲]، بهرام روشنایی[۲]، مصطفی غلامی ارجنکی[۶]، علیرضا غلامی[۲*]**

[۱] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
[۲] بخش تولید واکسن های ویروسی، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران
[۳] بخش تحقیقات و مرکز رفرانس هاری، انستیتو پاستور ایران
[۴] بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
[۵] بخش علوم حیوانات آزمایشگاهی، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران
[۶] بخش زیست شناسی سلولی مولکولی، انستیتو رویان اصفهان

## چکیده

**سابقه و هدف:** با توجه به مطرح بودن بیماری هاری و اهمیت آنتی‌بادی ضد ویروس هاری کونژوگه شده با ماده فلورسنت و اینکه آنتی‌بادی فعلی کشور وارداتی و دارای قیمت نسبتاً بالایی می‌باشد و برای پاسخ به این سوال که آیا امکان ساخت آنتی بادی فلورسنت ضد ویروس هاری وجود دارد یا خیر، و در صورتی که پاسخ مثبت باشد آیا کارایی لازم را دارد، تحقیق حاضر انجام گرفت.

**روش بررسی:** *تحقیق در مرحله اول به روش اکتشافی و در مرحله بعد به روش تجربی انجام گرفت. بعد از خونگیری و جدا سازی سرم خرگوش های ایمن شده با واکسن هاری، سرم بدست آمده توسط آمونیوم سولفات رسوب داده شده و تحت فیلتراسیون به کمک ژل قرار گرفت. در قدم بعدی برای تخلیص IgG، کروماتوگرافی تعویض یونی انجام گرفت. در مرحله بعد برای تایید وجود آنتی بادی و اختصاصیت آن از تکنیک Dot blotting استفاده شد. بعد از تایید در این مرحله، آنتی بادی تخلیص شده با فلورسئین ایزو تیوسیانات(FITC) کونژوگه شده و در تست ایمونو فلورسنت اختصاصیت، درخشندگی و شفافیت کافی، به عنوان قابل قبول تلقی شد.*

**یافته‌ها:** *بیشترین میزان IgG در بافر با غلظت ۱۰۰mM نمک NaCl (Flow Through) از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی خارج شد. نمونه ۱۰۰ میلی مولار حاوی IgG بهتر و بیشتر با فلورسئین ایزو تیوسیانات پیوند کووالان برقرار کرده وکونژوگه شد.*

**نتیجه‌گیری:** *نتایج نشان می‌دهد که این آنتی بادی قادر به نشان دادن علائم حضور ویروس در نمونه مغز حیوان هار است. به نظر می‌رسد که می توان تهیه آنتی بادی فلورسنت ضد ویروس هاری را در پژوهش های بعدی بهینه و در صورت تایید برای تولید انبوه اقدام کرد.*

**واژگان کلیدی:** *فلورسئین ایزوتیوسیانات، تست ایمونوفلورسنت، فیلتراسیون به کمک ژل، Dot blotting، کروماتوگرافی تعویض یونی.*

## مقدمه

هاری یک بیماری ویروسی و یک آنسفالیت حاد در انسان یا حیوان (بیماری مشترک بین انسان و حیوان) است و سیستم عصبی مرکزی فرد مبتلا را تحت تاثیر قرار می‌دهد که به دو شکل خشمگین و فلجی ظاهر می شود. ویروس عامل بیماری عصب دوست (Neuro tropic)، از خانواده رابدوویریده و جنس لیساویروس می باشد (۲،۱). اصلی‌ترین راه انتقال بیماری، گزیده شدن توسط حیوان هار است. ویروس بعد از ورود به بدن میزبان به سرعت در بافت عضلانی تکثیر یافته و سپس با اتصال به رسپتورهای موجود در سطح سلول عصبی وارد آنها شده و در نهایت وارد سلول های دستگاه عصبی مرکزی شده و مغز را

**آدرس نویسنده مسئول:** کرج، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، بخش واکسن های ویروسی
**علیرضا غلامی** (**e-mail:** agholami@pasteur.ac.ir)
**تاریخ دریافت مقاله:** ۱۳۹۱/۵/۱۱
**تاریخ پذیرش مقاله:** ۱۳۹۱/۷/۳۰

درگیر می کند (۲). بعد از تشخیص و تایید وجود این بیماری در جانور گزنده اقدامات بعدی برای درمان و نجات هار گزیدگان انجام می شود. تشخیص قطعی این بیماری به صورت آزمایشگاهی انجام می شود. در تشخیص آزمایشگاهی می توان از تکنیک‌های Polymerase Chain Reaction (PCR)، Mouse Inoculation Test (MIT)، Fluorescent-Antibody Test (FAT) ، Immuno Enzymatic Test (IEA) و Rapid Rabies Enzyme Immune Diagnosis (RREID) بهره برد. استاندارد طلایی در تشخیص هاری تست FAT (Fluorescent Antibody Test) یا ایمونوفلورسانس مستقیم DIF (Direct Immuno florescent) است که عبارت از مشاهده مستقیم گنجیدگی های درون سیتوپلاسمی در نمونه می باشد (۳). با توجه به مطرح بودن بیماری هاری و اهمیت آنتی بادی ضد ویروس هاری کونژوگه شده با ماده فلورسنت در تشخیص بیماری و این مطلب که عمده آنتی بادی فعلی کشور وارداتی و دارای قیمت نسبتاً بالایی می باشد همچنین برای پاسخ به این سوال که آیا امکان ساخت آنتی بادی کونژوگه ضد ویروس هاری وجود دارد یا خیر، تحقیق حاضر در سال ۱۳۹۰ در انستیتو پاستور ایران انجام گرفت. مطالعهٔ پژوهش های قبلی نشان داد که تا بحال مقاله ای در ایران دیده نشده است که ساخت و تایید این آنتی بادی را نشان دهد.

## مواد و روشها

این تحقیق در مر حله اول به روش اکتشافی برای امکان ساخت آنتی بادی کونژوگه و در مرحله دوم به روش تجربی برای مقایسه با آنتی بادی تجاری (ساخت شرکت BioRad) به عنوان استاندارد انجام گرفت، به این صورت که از دو سر خرگوش نر نیوزلندی هر یک به وزن ۳ کیلو گرم استفاده شد. چهار مرتبه تزریق واکسن هاری همراه با ادجوانت هیدروکسید آلومینیم به هر حیوان در فواصل یک هفته انجام گرفت. به منظور جدا کردن سرم، خون گرفته شده از حیوان به مدت ۳-۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و سپس به مدت یک شبانه روز در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. نمونه خون مذکور سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شده، سرم جدا شده (حدود ۳۸ میلی لیتر) و به یک لوله استریل منتقل و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شد. به منظور شفاف سازی سرم ۱۴ میلی لیتر از سرم در سرعت g ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. در مرحله رسوب پروتئین های سرم با سولفات آمونیوم برای جلوگیری از اسیدی شدن سرم قبل از افزودن آمونیوم سولفات، ۰/۱حجم سرم (۱/۴ میلی لیتر) Tris-Base (1M) با pH= ۸ به سرم افزوده شد. در ادامه به منظور رسوب دادن پروتئین های سرم ۱۰ میلی لیتر محلول آمونیوم سولفات اشباع قطره قطره به آن افزوده شد. در نتیجه محلول به غلظت ۴۰٪ اشباع آمونیم سولفات رسید. این مراحل درون ظرف یخ انجام می شود. این محلول (۴۰٪ اشباع ) سانتریفوژ و رسوب حاصل جمع آوری شده و تا انجام مراحل بعدی تخلیص در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. رسوب حاصل از نمک آمونیوم سولفات ۴۰٪ اشباع در ۴ میلی لیتر بافر شامل: Tris 25mM - EDTA 2mM - NaCl 100mM - Triton 0.20% - PMSF 1mM حل شده و سپس در سرعت g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفوژ شد. به منظور حذف نمک آمونیوم سولفات از فیلتراسیون به کمک ژل حاوی رزین سفادکس G-25 (۱۸ در ۱۲۰ میلی متر) استفاده شد. بدین ترتیب که نمونه اخیر وارد ستون شده، سپس بافر فوق الذکر به ستون تزریق می‌شود. همزمان، نمونه گیری از محلول خروجی ستون در حجم های ۴ میلی لیتر انجام شد. برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین فرکشن های خارج شده از ستون از روش برادفورد مطابق روش استاندارد استفاده شد (۴). جهت تایید وجود ایمنوگلبولین ها الکتروفورز پروتئین در ژل پلی‌آکریل‌آمید در حضور SDS (SDS-PAGE) انجام گرفت. برای شناسایی آنتی بادی از ژل ۱۰ درصد برای قسمت جداکننده و از ژل ۵ درصد برای قسمت متراکم‌کننده، استفاده شده و بعد رنگ‌آمیزی با کوماسی آبی G-250 انجام گرفت. در مرحله بعد برای تخلیص IgG از روش کروماتوگرافی تعویض یونی استفاده شد. بافر کروماتوگرافی شامل ۲۵ میلی مولار Tris با pH=۸ ، ۲ میلی مولار EDTA، ۲/ درصد تریتون X ۱۰۰ و یک میلی مولار PMSF(PhenylMethyl Sulfonyl Fluoride) می باشد. برای شستشوی اولیه ستون از غلظت ۱۰۰ میلی مولار NaCl (Flow Through) در این بافر استفاده شد. برای خارج کردن نمونه ها از ستون نیز از غلظت های ۲۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی مولار استفاده شد. ستون کروماتوگرافی به طول ۲x۲۰cm با رزین دی اتیل آمینو اتیل سفاروز (DEAE-Sepharose) پر شد. از نمونه های حاصل از ستون کروماتوگرافی فیلتراسیون به کمک ژل، ۸ میلی لیتر (محلول خروجی از حجم ۴ تا ۷ میلی لیتر) درون ستون اخیر ریخته شده و با افزودن بافرهای تهیه شده، نمونه ها بعد از خارج شدن از ستون جمع آوری شدند. غلظت پروتئین نمونه های خارج شده از ستون دی اتیل آمینو اتیل سفاروز نیز با روش

برادفورد سنجش شد. برای تایید وجود آنتی بادی از نمونه های خارج شده از ستون کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سفاروز تست Dot Blot انجام شد. بطور خلاصه، از هر کدام از نمونه های بالا ۴µl بر روی غشای نیترو سلولزی نقطه گذاری شد. بعد از خشک شدن نمونه های نقطه گذاری شده، غشاء نیترو سلولزی در بافر مسدود کننده گذاشته و به مدت یک ساعت در دمای اتاق به آرامی تکان داده شد. سپس این غشاء ۳ دفعه و هر بار به مدت ۳ دقیقه با PBS، pH= ۷/۴، شستشو داده شد. در مرحله بعد، غشای نیترو سلولزی در محلول تهیه شده از آنتی بادی خرگوشی ضد IgG و بافر مسدود کننده با نسبت ۱/۱۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شده و هر ۱۵ دقیقه به آرامی چند بار تکان داده شد. این غشاء مجددا ۳ دفعه به مدت ۲ دقیقه با PBS، ۷/۴ =pH، شستشو داده شده، در محلول آنتی بادی ثانویه کونژوگه با آنزیم Horse Raddish Peroxidase (HRP) قرار داده شد. پس از شستشوی مجدد با بافر، غشای مذکور با سوبسترای آنزیمی DAB (3,3-Diaminobenzidin) مجاور شد. به منظور نشان دادن اختصاصیت آنتی بادی، آزمایش Dot Blot با پروتئین های سلول آلوده و غیرآلوده نیز انجام شد. در ابتدا آنتی ژن بر روی غشای نیترو سلولزی نقطه گذاری شد. به این منظور سلولهای BHK-21 C13 کشت شده سپس توسط ویروس هاری سویه پاستورPV آلوده گردید. در روز سوم پس از آلودگی، تعداد ۱۰ میلیون سلولهای آلوده شده با ویروس برداشت و در CC /۵ از بافر شستشوPBST (Phosphate Buffered Saline Solution with Tween) حاوی ۵µl PMSF حل و فریز، دی فریز گردید تا غشاء سلولی شکسته شده و محتویات سلولی و پروتئین های ویروسی خارج شوند. در ادامه محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰در دمای ۴ درجهٔ سانتیگراد سانتریفوژ شد. سلول های BHK-21 غیر آلوده به ویروس نیز به موازات به عنوان شاهد تهیه شد. در ادامه از غلظت های مختلف نمونه های خارج شده از ستون دی اتیل آمینو اتیل سفاروز به صورت زیر جهت انجام آزمایش استفاده شد.

نمونه شماره ۱- ۵۰ میکرولیتر سرم خرگوش + ۹۵۰ میکرولیتر محلول مسدود کننده

نمونه شماره ۲- ۵۰ میکرولیتر محلول Flow Through خارج شده + ۹۵۰ میکرولیتر محلول مسدود کننده

نمونه شماره ۳- ۵۰ میکرولیتر محلول خارج شده در غلظت ۲۰۰ mM NaCl + ۹۵۰ میکرولیتر محلول مسدود کننده

کنترل مثبت - ۱۰ میکرولیتر (آنتی بادی ضد نوکلئوکپسید ویروس هاری) + ۹۹۰ میکرولیتر محلول مسدود کننده

با توجه به غلظت‌های به دست آمده از سنجش پروتئین، نقطه گذاری، از هر دو نمونه سلول آلوده و غیرآلوده بر روی غشاء نیترو سلولزی انجام شد تا میزان آنتی ژن در هر دو حالت یکسان باشد. انکوباسیون و تیمار غشاء به روشی که پیشتر توضیح داده شد انجام شد.

به ازای هر ۱۰۰ میلی گرم آنتی بادی ۱میلی گرم FITC استفاده شد. از این رو ۲میلی گرم FITC در ۸۵۰ میکرولیتر بافرکربنات ۰۵/ مولار با ۹ =pH حل شد وحجم آن به ۱ml رسید که غلظت نهایی آن ۲mg/ml می شود. صد و بیست و پنج میکرولیتر از محلول فلورسین ایزوتیوسیانات FITC تهیه شده به محلول حاوی آنتی بادی افزوده و به خوبی مخلوط شد. بعد از مخلوط کردن، pH آن با استفاده از محلول کربنات بافر ۵/ مولار به ۹ رسید و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هم زده شد. برای حذف کردن FITC های کونژوگه نشده از ستون کروماتوگرافی فیلتراسیون به کمک ژل پک شده با رزین سفادکس G-25 استفاده شد. محلول حاصل در ۱ ml از بافر PBS, pH= ۷ mol/lit ۰/۱ حل شده و فیلتراسیون به کمک ژل روی آن انجام شد، با این تفاوت که جهت آماده سازی ستون وحل کردن رسوب از PBS, pH= ۷ mol/lit ۰/۱ استفاده گردید. نمونه جمع آوری شده از ستون با فیلتر ۲۲/ میکرومتر فیلتر شد. در آخر از نمونه جمع آوری شده از ستون، سنجش پروتئین با روش برادفورد انجام شد.

جهت تایید کونژوگه شدن آنتی بادی تخلیص شده و تهیه نمونه های آلوده شده، از هر ۲ فلاسک شامل سلول آلوده و غیر آلوده ۲ میلی‌لیتر نمونه برداشته شده و در RPM ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید . رسوب سلولی حاصل جمع آوری شد. ۲ لام شیشه‌ای را شسته و با قلم الماسی نقاط مورد نظر برای نمونه‌گذاری علامت‌گذاری گردید. سپس از رسوب سلولی غیرآلوده و آلوده به ویروس گسترش تهیه شد. برای فیکس کردن سلولها، لام‌ها را در ظرف استون سرد قرار داده و در فریزر به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. در ادامه بر روی یکی از گسترش ها آنتی بادی کونژوگه شده از نمونه Flow Through (100mM NaCl) و بر روی گسترش دیگر به میزان یکسانی از آنتی بادی کونژوگه شده از نمونه NaCl 200mM ، افزوده شد. همچنین آنتی بادی کونژوگه تجاری و استاندارد(ضد ریبونوکلئوپروتئین ویروس هاری) به عنوان شاهد بر روی گسترش های دیگری از سلول آلوده و غیرآلوده فیکس شده به میزان مشابه از آنتی بادی مورد بررسی افزوده

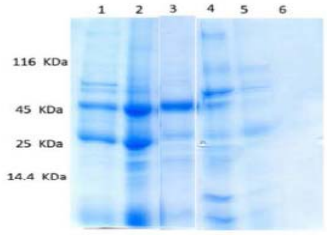
شد. سپس لام ها در درون ظرف شیشه ای درب دار مرطوب به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در ادامه لام‌ها از انکوباتور خارج شده و به مدت ۵ دقیقه درون محلول مخصوص شستشوی لام (PBS) قرار گرفت. بعد از خشک شدن لامها آنها در زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر سلول آلوده از مغز حیوان مبتلا به هاری نیز گسترش تهیه شده و مانند روش فوق تحت فرایند فیکساسیون قرار گرفته و بعد از آماده شدن در کنار کنترل مثبت و منفی با آنتی بادی کونژوگه تولیدی رنگ آمیزی شد.

## یافته‌ها

پس از رسوب دهی با آمونیوم سولفات و سپس فیلتراسیون به کمک ژل میزان پروتئین از غلظت mg/ml ۲۸/۹۱ در نمونه سرم به حدود mg/ml ۱۰ و با انجام کروماتوگرافی تعویض یونی، این غلظت باز هم کاهش یافته و به مقدار حدود mg/ml ۳ رسید(جدول ۱،ردیف ۵-۱). شکل یک نشان دهنده الکتروفورز به عمل آمده از فرکشن های خارج شده از فیلتراسیون به کمک ژل، بر روی ژل پلی آکریلامید در حضور SDSمی باشد (شکل ۱).

بعد از سنجش میزان غلظت پروتئین، بیشترین میزان IgG در بافر Flow Through از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی خارج شد و میزان آن در دیگر فرکشن ها نسبت به فرکشن Flow Through قابل توجه نبود (جدول ۱، ردیف۹-۶).

بعد از این عمل نیز باند های 25KDa و 50KDa در نتیجه الکتروفورز فرکشن ۱۰۰mM روی ژل پلی آکریلامید در حضور SDS مشاهده شدند (شکل ۱).




۱- بعد از ژل فیلتراسیون
۲- نمونه Flow Through
۳- نمونه ۲۰۰ Mm Nacl
۴- نمونه ۳۰۰ Mm Nacl
۵- نمونه ۵۰۰ Mm Nacl
۶- نمونه ۷۵۰ Mm Nacl

**شکل ۱**- باندهای 25KDa و 50KDa متعلق به زنجیره‌های سبک و سنگین ایمنوگلبولین‌ها

**جدول ۱**- غلظت پروتئین در کروماتوگرافی توسط روش

| ردیف | نمونه | غلظت |
|---|---|---|
| ۱ | سرم قبل از تخلیص | ۲۸/۹۱mg/ml |
| ۲ | فرکشن ۱ | ۱۰mg/ml |
| ۳ | فرکشن ۲ | ۹/۳۸mg/ml |
| ۴ | فرکشن ۳ | مقدار پروتئین ناچیز است |
| ۵ | Flow Trough | ۲/۹۲ mg/ml |
| ۶ | ۲۰۰mM | /۵ mg/ml |
| ۷ | ۳۰۰ mM | /۷۴ mg/ml |
| ۸ | ۵۰۰mM | ناچیز |
| ۹ | ۷۵۰mM | ناچیز |
| ۱۰ | نمونه Ab-FITC | /۶۵ mg/ml |

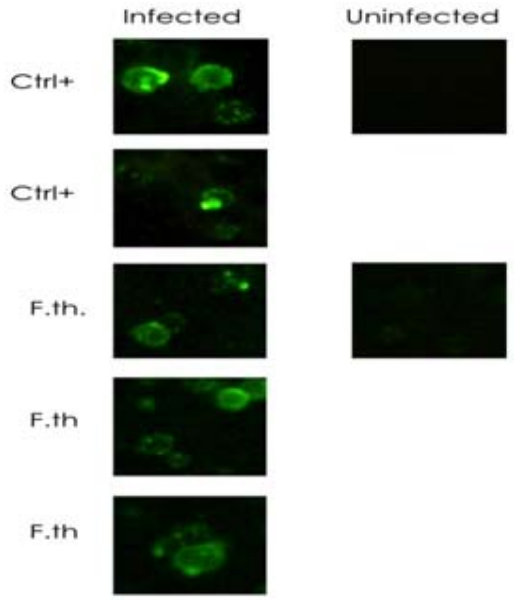
تست Dot Blot با استفاده از DAB وجود آنتی بادی تخلیص شده را تایید کرد. آنتی بادی کونژوگه شده بعد از نمک زدایی با فیلتراسیون به کمک ژل میزان mg/ml ۶۵/ پروتئین را نشان داد(جدول شماره-۱، ردیف ۱۰). بعد از مقایسه نمونه کونژوگه ۲۰۰ میلی مولار و نمونه ۱۰۰ میلی مولار نمک NaCl (Flow Through) نشان داده شد که نمونه Flow Through شامل IgG بهتر با FITC پیوند برقرار کرده وکونژوگه شده است. نتایج رنگ آمیزی لام های تهیه شده از سلول آلوده و غیر آلوده به ویروس هاری و همچنین بافت مغز گاو مبتلا و غیر مبتلا با آنتی بادی تجاری و نمونه Flow Through کونژوگه شده در زیر میکروسکوپ در شکل ۲ و شکل ۳ نشان داده شده است.

## بحث

هاری یکی از قدیمی‌ترین و خطرناک ترین بیماری های عفونی مشترک بین انسان و حیوان است. عامل بیماری هاری ویروسی متعلق به خانواده رابدویریده است، که در پنج قاره دنیا انتشار دارد (۲).

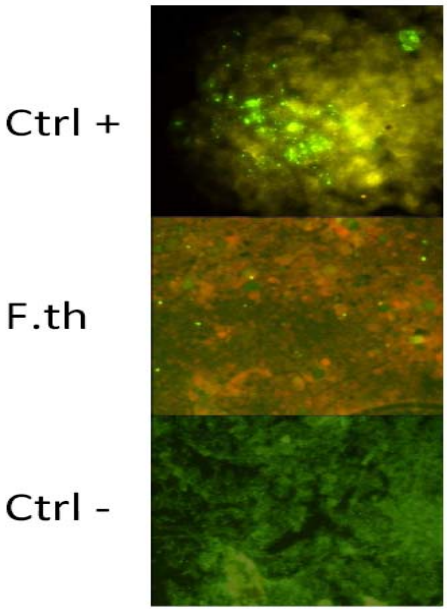
برای تشخیص بیماری هاری از روش‌های مختلفی استفاده می کنند. از جمله این روشها می توان به روش هیستوپاتولوژیک، تلقیح به حیوان آزمایشگاهی، تست ایمونوفلورسنت، روشهای آنزیماتیک و روشهای مولکولی اشاره کرد (۵،۶). روش ایمونو فلورسنت به کار رفته در تشخیص هاری یا FAT دقیق ترین و قابل اعتمادترین روش و استاندارد طلایی در تشخیص بیماری هاری بوده و علاوه بر این مورد تایید WHO و OIE جهت استفاده گسترده در تشخیص هاری

می باشد(۷,۸,۹). دقت این روش در صورت استفاده از بافت مغزی تازه ۹۹-۹۵ ٪ است که بستگی به کیفیت تهیه نمونه، کیفیت آنتی بادی مورد استفاده، مهارت تکنیسین و تجهیزات مرتبط دارد(۸,۹).




**شکل ۲** . مقایسه بین سلولهای آلوده شده و غیر آلوده توسط آنتی بادی کونژوگه تجاری به عنوان کنترل مثبت و نمونه خارج شده Flow Through به عنوان تست در کنار کنترل منفی

نظر به اهمیت این روش در تشخیص هاری و نیاز آزمایشگاهی تشخیص هاری در کشور به این محصول و همچنین صرف زمان و هزینه برای تامیین این محصول از خارج از کشور، پژوهش حاضر ساخت آنتی بادی تشخیصی هاری با روش FAT یا (IF) را هدف گذاری نموده است، استفاده شد. نظر به اینکه پروتئین سطحی ویروس هاری از اصلی ترین عوامل ایجاد پاسخ ایمنی ضد ویروس است (۲)، در پژوهش حاضر از کل ذره ویروسی (واکسن هاری) برای تولید آنتی بادی استفاده شده است. در پژوهش حاضر نسبت به روش های مشابه(۱۰)، فاصله زمانی بیشتری بین ایمن کردن خرگوش و خونگیری از حیوان وجود داشت که بر اساس تجربه های قبلی در زمینه تهیه آنتی بادی ضد نوکلئوکپسید ویروس هاری بوده است (دکتر علیرضا جنانی، بر اساس داده های منتشر نشده). نتایج حاصل از این کار اختلاف قابل ملاحظه ای در میزان آنتی بادی تام بدست آمده را در مقایسه با مطالب منتشره قبلی نشان می دهد به نحوی که Zhu و همکاران از هر ۱۰۰ میلی لیتر سرم خرگوش ۱۲۶ میلی گرم IgG را تخلیص کرده اند (۱/۲۶ mg/ml) حال آنکه در پژوهش حاضر در ۳۸ میلی لیتر سرم خرگوش حدود ۷۲ میلی گرم IgG جدا شد (۱/۹۲ mg/ml). در روش حاضر از واکسن دارای ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم استفاده شده است.




**شکل ۳.** مقایسه بین نمونه مغز گاو مبتلا و غیر مبتلا توسط آنتی بادی کونژوگه تجاری به عنوان کنترل مثبت و نمونه خارج شده Flow Through به عنوان تست در کنار کنترل منفی

آنتی ژن جذب شده به ادجوانت در محل تزریق باقی مانده و به آرامی آزاد می شود، همچنین این ادجوانت ها باعث التهاب و فراخوانی سلولهای ایمنی به محل تزریق می شوند و ضمناً آنتی ژنهای محلول بعد از اتصال به حالت جامد تبدیل شده و توسط سلولهای عرضه کننده آنتی ژن راحتر پردازش می شوند، لذا تفاوت مشاهده شده می تواند ناشی از این ویژگی ها باشد(۱۰,۱۱). در این تحقیق با انجام تست Dot Blot نتایج ارزیابی و با بکارگیری آنتی بادی نشان دار ضد آنتی بادی خرگوش حضور IgG در نمونه های مورد آزمایش تایید شد. در سال ۲۰۰۴، Madhusudana و همکاران (۸)، برای دات بلات از مغز موش های آلوده به ویروس هاری استفاده کردند. در مطالعهٔ حاضر آنتی ژن های مورد استفاده از کشت سلول های BHK-21 آلوده به ویروس بدست آمد که علاوه بر سهولت انجام کار، از اتلاف بی رویهٔ حیوانات آزمایشگاهی نیز جلوگیری می نماید، علاوه بر این یکی دیگر از معایب استفاده از حیوانات آزمایشگاهی، پاسخ منفی کاذب به دلیل کشته شدن زود هنگام آنها می باشد. بعلاوه در صورت بروز علائم هاری در حیوان نیز مجددا باید وجود بیماری توسط تست

های بعد از کالبد گشایی تایید شود. IgG تخلیص شده با فلورسین ایزوتیوسیانات FITC کونژوگه شد و با تهیه آنتی ژن های ویروسی (کنترل مثبت)، و کنترل منفی نتایج با تست ایمونوفلورسنت IF مورد بررسی قرار گرفت(شکل ۲). در تشخیص بیماری هاری مشاهده اجسام نگری در نمونه های آلوده تهیه شده بر روی لام در زیر میکروسکوپ فلورسنت، موید عملکرد صحیح آنتی بادی است. محصول این پژوهش علاوه بر نمونه های سلولی، بر روی گسترش تهیه شده از مغز حیوان هار نیز مورد بررسی قرار گرفت. با عنایت به اینکه آنتی بادی حاصل از این کار نیز مثبت بودن نمونه آلوده به ویروس را نشان می دهد(شکل ۲)، این موضوع از یک سو موید عملکرد محصول تهیه شده و از سوی دیگر نشان دهنده صحت مراحل روند کار از جمله روش های تخلیص و کونژوگه شدن آنتی بادی مورد نظر می تواند باشد. این پژوهش به روشی ساده ساخت آنتی بادی تشخیصی ضد ویروس هاری با استفاده از تزریق ذره کامل ویروسی را ارائه می دهد که بدون استفاده از نوکلئوکپسید ویروس و مستقل از تجهیزات پیشرفته مانند اولتراسانتریفوژ (۱۲)، قابل انجام بوده و در مقایسه با نوع تجاری نتایج قابل مقایسه ای را ارائه دهد.

## تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر رمضانعلی خاوری مدیر گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات بخاطر مساعدت‌های ایشان تشکر و قدردانی میشود. همچنین از جناب آقای نادر حویزی کارشناس محترم بخش تحقیقات رفرانس هاری انستیتو پاستور ایران بخاطر مساعدت در تهیه نمونه‌های میکروسکوپی کمال تشکر را دارد. از آقای حسن امیری تکنیسین بخش واکسن های ویروسی به خاطر همکاری صمیمانه تشکر می شود. پژوهش حاضر با استفاده از منابع و امکانات بخش واکسن های ویروسی مجتمع تولیدات انستیتو پاستور ایران انجام شده است.

## *REFERENCES*

1. Coslett G. Holloway B. Obijeski J. The structure of rabies virus and evidence for their synthesis from seprate monocistronic RNA species. J Gen Viral 1980;49: 161-80.

2. Wanger RR, Rhabdoviridae JK. The virus and their replication. In: Knipe D, Howley PM, Editors. Fields virology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Rayan; 2008.

3. Aldavood SJ, Akbarein H, Bahonar AR, Janani AR, Hosseini Shokouh SJ, Dabbagh Moghaddam A, et al., Editors. Rabies in Iran. 1st ed. Tehran: Mashgheshab; 2011 [In Persian]

4. Moosavi Movahedi AA, Saboury AA, Khanchamani J, editors. Biochemistry and Biophysics Methods. 1st ed. Tehran: Tehran University; 2006 [In Persian]

5. Dean DJ, Abeleseth MK, Atanasiu P. The fluorescent antibody test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowsky H, editors. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: WHO; 1996. p. 88-95.

6. Pert DA, Good PF. Pathology of rabies in the central nervous system. In: Bear GM, Editor. The natural history of rabies. Boca Raton: CRL Press; 1991. p. 163-90.

7. McElhinney L, Fooks A, Radford A. Diagnostic tools for the detection of rabies virus. EJCAP 2008; 18: 224-32.

8. Shampur NM, Joel Prem VP. Rapid diagnosis in humans and animals by a dot blot enzyme immumoassy. Int J Infect Dis 2004; 8: 339-45.

9. Shankar BP. Advances in diagnosis of rabies. Veterinary World 2009;2: 74-78.

10. Zhu Jin Lie X, Feng X, Tang Q. Rabbit anti rabies immunoglobulins production and evaluation. Trop Biomed 2011; 28: 138-48.

11. Vogel FR, Hem SL. Immunologic adjuvants. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P, Editors. Vaccine. 5th ed. New York: Saunders, Elsevier; 2008. p. 66.

12. Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, Editors. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 1996.