خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۳ شماره ۱ بهار ۸۵ (۵۱-۴۵)

ارزیابی روش‌های تولید آنتی بادی علیه گلبول‌های قرمز گوسفند جهت به کارگیری در سنجش فعالیت سیستم کمپلمان

دکتر فاطمه یاری[۱]، لطیف حمیدپور زارع[۲]

چکیده

سابقه و هدف

در ارزیابی فعالیت سیستم کمپلمان و پی‌بردن به نقصان احتمالی در عملکرد این سیستم، غالباً از روش CH50 استفاده می‌شود . در این روش گلبول‌های قرمز گوسفند با آنتی‌بادی اختصاصی پوشانیده شده و قابلیت سیستم کمپلمان در تکمیل لیز این سلول‌ها ، مورد ارزیابی قرار می‌گیرد .

در این مطالعه،به‌دلیل نیاز به آنتی‌بادی اختصاصی گلبول‌های قرمز گوسفند(SRBC) برای انجام آزمایش CH50، اقدام به تولید آنتی بادی پلی کلونال ویژهSRBC در حیوان خرگوش گردید و آنتی بادی‌های تولیدشده آمبوسپتور به روش‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی (experimental) بود . برای انجام این پژوهش ، تزریق گلبول کامل گوسفند یا آنتی‌ژن‌های غشایی آن با چند الگوی متفاوت به حیوان خرگوش صورت گرفت . آنتی بادی به دست آمده، با استفاده از سرم پولد نرمال به عنوان منبع کمپلمان فعال (مربوط به حداقل ۱۵ نفر از اهدا کنندگان خون) در روش CH50 بررسی و در نهایت مقدار جذب نوری(OD) مربوط به میزان لیزگلبول‌ها در روش‌های مختلف با یکدیگر مقایسه شد. در نهایت آنالیز داده‌ها و مقایسه میانگین مقادیر OD541 در آزمایش CH50 با استفاده از آزمون t (One-Sample) انجام گرفت .

یافته‌ها

تزریق گلبول کامل گوسفند به حیوان خرگوش به دفعات متعدد با هر یک از الگوهای تزریقی و به طریق داخل صفاقی و یا وریدی ، منجر به تشکیل تیتر مطلوبی از آنتی بادی در این حیوان شده، اما سبب مرگ زودهنگام آن به علت شوک آنافیلاکتیک نیز می‌گردد. در حالی که استفاده از سلول‌های سونیکه شده و یا حرارت دیده در این راستا، منجر به تولید آنتی سرم هایی می گردد که ضمن داشتن ویژگی مطلوب، بقای حیوان‌های مورد نظر را تهدید نمی‌نماید .

نتیجه گیری

تولید آنتی بادی پلی‌کلونال بر علیه SRBC با استفاده از روش‌های مختلف، میسر می باشد . با این حال این مطالعه نشان می‌دهد ، چنانچه آنتی‌ژن‌های غشایی گلبول قرمز با روش سونیکاسیون و یا آنتی ژن‌های مقاوم به حرارت گلبول قرمز (Forssman) با به کارگیری حرارت ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد به دست آمده و جهت تزریق و مصون سازی حیوان مورد استفاده قرار گیرند، می‌توان بدون به مخاطره انداختن بقای حیوان، اقدام به تولید آنتی سرم با تیتر مطلوب نمود.

کلمات کلیدی: آنتی‌ژن فورسمن، CH50 ، SRBC

تاریخ دریافت : ۸۴/۶/۱۳
تاریخ پذیرش : ۸۴/۱۲/۲۰

۱- مؤلف مسؤول : PhD ایمونولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ صندوق پستی ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۲- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پژوهش و پالایش خون

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

اجزای سیستم کمپلمان با چندین مکانیسم، پاسخ‌های ایمنی را تقویت کرده و پیش می برند. بدیهی است سنجش فعالیت این سیستم از اهمیت خاصی درجهت بررسی نحوه فعالیت سیستم ایمنی برخوردار است. در روش سنجش فعالیت همولیتیک ۵۰٪گلبول قرمز(CH50)که‌وجود کمپلمان را به‌صورت کمی و کیفی نشان می‌دهد، اریتروسیت‌های پوشیده شده با آنتی‌بادی اختصاصی، با رقت‌های مختلف کمپلمان (مثلاً موجود در سرم انسان) مواجه شده و پس از زمان انکوباسیون و انجام سانتریفوژ، میزان لیز سلول‌ها با استفاده از اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری هموگلوبین بررسی می‌شود. چنانچه مقدار کمپلمان کم یا فعالیت آن دچار اشکال باشد، در آزمایش ذکر شده، همولیز با شدت کم مشاهده می‌شود. امروزه درمقایسه باگذشته موارد کاربرد وسیع‌تری برای آزمایشCH50 عنوان شده است (۳-۱) .

از آنجایی که آنتی‌بادی بر علیه گلبول‌های قرمز گوسفند (Sheep Red Blood Cell: SRBC) به عنوان ابزار اولیه در انجام آزمایش‌های مختلف سنجش فعالیت سیستم کمپلمان مانندآزمایش CH50 وثبوت کمپلمان استفاده می‌شود، لذا تولید این آنتی‌بادی جهت تکمیل سیستم‌های همولیتیک در آزمایش‌های ذکر شده، از ارزش کاربردی برخورداراست(۹-۴). از طرف دیگر، تولید این آنتی‌بادی به صورت پلی‌کلونال جهت داشتن کارآیی لازم و استفاده در روش‌های ذکر شده کفایت نموده و نیاز به استفاده از روش‌های کشت سلولی جهت دست یابی به تک کلون‌های اختصاصی علیه شاخص‌های گلبول قرمز نمی‌باشد. لذا این آنتی‌بادی علی‌رغم موارد مصرف فراوان آن به آسانی قابل تهیه است. این مطالعه روش‌های مختلف در تولید آنتی‌بادی بر علیه گلبول‌های قرمز گوسفند را به صورت پلی‌کلونال مورد مقایسه قرار داده است .

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این مطالعه، ۱۵ خرگوش (با وزن حدود ۲/۵ کیلوگرم و ۳-۲ حیوان برای هر روش) مورد استفاده قرار گرفت . روش‌های استفاده شده در این مطالعه جهت تولید آنتی‌بادی علیه گلبول‌های قرمز گوسفند عبارت است از:

۱- استفاده از گلبول قرمز کامل گوسفند (SRBC) با تزریق‌های مکرر

سوسپانسیون ۱۰ درصد گلبول‌های گوسفند (۲×۱۰^۹ سلول در هر میلی لیتر) تهیه و جهت حساس نمودن حیوان مورد استفاده قرار گرفت . به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان ، یک میلی لیتر از سوسپانسیون ذکر شده به طریق داخل وریدی تزریق گردید . جهت این منظور از تزریق مکرر (۱۰ تزریق متوالی در ۱۸ روز) استفاده‌شد(۱). ۳ روز پس از تزریق آخر، خون گیری انجام و تیتراسیون به عمل آمد .

۲- استفاده از گلبول‌های قرمز کامل گوسفند (SRBC) و تزریق به دفعات کم

در این حالت در تزریق اول از تقویت کننده ایمنی لیپوپلی ساکارید (LPS) در غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر استفاده گردیده و تیتر آنتی‌بادی ایجاد شده در این حیوان‌ها و نیز میزان مرگ و میر در آن‌ها بررسی شد(۶،۷). پس از ۲۵ روز از تزریق اول ، بررسی تیتر آنتی بادی ایجاد شده انجام شد .

۳- تزریق داخل صفاتی سوسپانسیون ۱۰ درصد SRBC

این نوع تزریق با الگوی ۳ تزریق در روزهای اول ، چهاردهم و چهل و پنجم از سوسپانسیون گلبول‌های قرمز (۲×۱۰^۹ سلول در هر میلی لیتر) به ازای یک میلی لیتر از سوسپانسیون برای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان انجام شد. ۳ روز پس از تزریق آخر، خون‌گیری انجام و تیتراسیون به عمل آمد(۱).

۴- تهیه آنتی‌ژن‌های غشای گلبول قرمز با استفاده از سونیکاسیون(Sonication)

جهت لیز گلبول‌های قرمز گوسفند، سلول‌های مزبور در محلولی با قدرت یونی پایین قرار داده شده و غشای (ghost) آن‌ها با استفاده از امواج ماوراء صوت

Archive of SID
www.SID.ir

(سونیکاسیون) به آنتی‌ژن‌های تشکیل دهنده آن تجزیه گردید(۱۰ کیلو هرتز به مدت ۲۵ ثانیه). آنتی‌ژن‌های حاصل به دو صورت داخل عضلانی همراه با ادجوانت کامل و ناقص فروند و دیگری تزریق آنتی ژن به طریق داخل وریدی مورد استفاده قرار گرفت .

۵- اعمال حرارت جهت استخراج آنتی‌ژن‌های مقاوم به حرارت در غشای گلبول‌های قرمز گوسفند :

با علم به این که فورسمن (Forssman) یک آنتی ژن هتروفیل و مقاوم به حرارت محسوب می گردد، از حرارت حدود ۱۰۳ درجه سانتی گراد جهت به دست آوردن آن استفاده شد . با استفاده از محلول رقیق اسید استیک گلاسیال (۴ درصد در آب مقطر خنک) ، غشای سلول را لیز نموده و استروما با بافر استات خنک چند بار شستشو و در نهایت در سرم فیزیولوژی همراه با همزن به مدت ۱ ساعت در حمام آب جوش قرار داده شد . آنتی ژن به دست آمده در غلظتی معادل OD280=۰/۲ تنظیم و جهت تزریق مورد استفاده قرار گرفت . ۲ حیوان خرگوش جهت تزریق آنتی ژن سونیکه در نظر گرفته شد . در مجموع ۱۱ تزریق در طول ۲ هفته (یک تزریق ۰/۱ میلی لیتر ، پنج تزریق ۰/۷ میلی لیتر) انجام شد (۷ ، ۶) . چهار روز پس از تزریق آخر ، از خرگوش‌ها خون گیری به عمل آمده و سرم آن‌ها به منظور غیر فعال‌سازی اجزای کمپلمان ، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد قرار داده شد . سپس بررسی از نظر تیتر آنتی بادی ، در آزمایش CH50 انجام گرفت (۱) .

سنجش فعالیت آنتی بادی ضد گلبول قرمز گوسفند در تست CH50:

جهت سنجش فعالیت همولیتیک آنتی بادی‌های به دست آمده در حیوان خرگوش ، رقت هم سان و مناسب (۱:۱۰۰۰ تا ۱:۲۰۰۰) از آنتی سرم‌ها پس از انجام چند آزمایش انتخاب و این رقت به سوسپانسیون سلولی استاندارد شده، (10^9 سلول در هر میلی لیتر) افزوده گردید. پس از نیم‌ساعت حساس‌کردن گلبول‌های قرمز ، سلول‌های مورد نظر تا زمان استفاده در همان روز در۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در این مطالعه مطابق روش مایر، لیز مربوط به یک میلی لیتر از سوسپانسیون ۵ درصد سلول‌های SRBC در حجم نهایی ۷/۵ میلی لیتر سنجیده شد (۶،۷). سرم نرمال پولد که از اهدا کننده‌های خون تهیه و در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شده بود به عنوان منبع مناسبی از کمپلمان مورد استفاده قرار گرفت . در هر بار آزمایش، رقت سرمی به گونه ای تهیه شد که در نهایت موجب ۷۰ درصد همولیز در سلول‌های حساس شده گلبول قرمز شود. لوله‌های حاوی یک میلی لیتر از SRBC حساس‌شده به همراه ۵/۵ میلی لیتر از بافر ژلاتین ورونال (GVB) با pH=۷/۴ (بافر ژلاتین ورونال عبارت است از ۱/۰۱۹ گرم از سدیم باربیتال، ۵/۳ گرم NaCl ، ۳/۵۵ میلی لیتر از HCl یک نرمال ، یک گرم ژلاتین ، ۰/۵ میلی مولار Mg^{+2}و ۰/۱۵ میلی مولار Ca^{+2}) و یک میلی لیتر رقت‌های مختلف سرم انسان در۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شده و به فاصله تکان داده‌شدند تا سلول‌ها به حالت سوسپانسیون باقی بمانند .

پس از پایان این مرحله ، سانتریفوژ انجام و مایع رویی هر لوله از نظر میزان لیز با آنالیز فتومتری (OD541) مورد بررسی قرار گرفت.در مورد هر سوسپانسیون سلولی ، لوله بلانک (شامل SRBC بدون کمپلمان) و لوله با لیز ۱۰۰ درصد (یک میلی لیتر از سوسپانسیون گلبول‌های قرمز و ۶/۵میلی لیترآب مقطر) نیزمورداستفاده قرارگرفت (۸ ، ۶).

در نهایت با به کارگیری گلبول‌های حساس شده و رقت‌های سرمی و قرائت میزان جذب نوری در ۵۴۱ نانومتر برای مایع رویی هر لوله ، منحنی همولیتیک (وابسته به غلظت‌های مختلف کمپلمان) ترسیم گردید و با استفاده از آزمونt ، مقایسه میانگین مقادیرOD541 در آزمایشCH50 انجام شد.

یافته‌ها

این مطالعه نشان می دهد با تزریق گلبول کامل گوسفند ،علی رغم کسب نتیجه مطلوب در تیتر آنتی‌بادی مورد نظر، مدت بقای حیواناتی که به طور مکرر گلبول

Archive of SID
www.SID.ir

قرمز را به طـریق داخل وریدی دریافت کـرده اند کـوتاه می‌گردد. حیوانات پس از دو ماه به علت واسکولیت ناشی از تشکیـل کمپلکس‌های ایمنـی، دچـار مـرگ مـی‌شـوند. دریافت گلبول کامل به همراه LPS منجر به مـرگ ۵۰-۳۳ درصـد از حیوانات در زمان کمتر از ۲ ماه می‌گردد.

در تولید آنتی‌بادی به روش داخل صفاقی مطابق الگوی توضیح داده شده در قسمت مواد و روش‌ها ، معلـوم شـد که تیتر آنتی بادی در یک روند رو به ا فزایش است . البتـه روند افزایش تیتر در مقایسه با تزریق داخل وریدی کنـدتر است . با انجام تزریق سوم ، تیتر آنتی بادی کاملاً بالا رفتـه و در الگویی منطبق با تزریق‌هـای مکـرر از طریـق داخـل وریدی قرار می گیرد (جدول۱).

جدول ۱: مقادیرOD541 به دست آمده در روش CH50 را به طور مقایسه ای برای تزریق SRBC به روش داخـل وریـدی در هنگـام تزریق همراه با LPS و به طریق صفاقی نشان مـی دهـد . OD بـر حسب مقادیر رو به افزایش کمپلمان ملاحظه می گردد .

نوع آمبوسپتور	مقادیرOD541 حاصل از آزمایش CH50			
	مقدار کمپلمان (ml)۰/۱۵	مقدار کمپلمان (ml)۰/۲۵	مقدار کمپلمان (ml)۰/۳۵	مقدار کمپلمان (ml)۰/۴۵
آمبوسپتور ۱	۰/۲۱۲	۰/۶۰۹	۱/۰۸۸	۱/۴۱۴
آمبوسپتور ۲	۰/۲۸۴	۰/۶۲۳	۱/۰۴۴	۱/۴۳۹

آمبوسپتور ۱: آمبوسپتوری که در اثر تزریق یک بار SRBC کامل و LPS (I.V) ایجاد شده است .
آمبوسپتور ۲: آمبوسپتوری که در اثر تزریق داخل صفاقی (پـس از سه بار تزریق) SRBC ایجاد شده است .

همان طور که گفتـه شـد، آنتـی‌ژن سـونیکه SRBC بـه صورت داخل عضلانی و داخـل وریـدی جهـت تحریـک ایمنی حیوان استفاده شد. نتیجه بررسی تیتر آنتی بادی‌های تشکیل شده نشان داد که جواب مناسب تر در شرایطی بـه دست می آید که از آنتـی ژن سونیکه به طریق داخل رگی استفاده شود .

آمبوسپتورهای استفاده شده جهت این منظور، ۲۰۰۰ بار رقیق شده و مورد استفاده قرار گرفته اند و به عنـوان منبـع کمپلمان از سرم پولد نرمال انسانی استفاده شده است.

مقایسه میانگین مقادیرOD541در آزمـایش CH50 مربـوط به هر یک از نمونـه‌هـای آمبوسـپتور ۱ تـا ۴ و آمبوسـپتور کمپانـی بهرینـگ (Behring) کـه تمامـاً در رقـت ۱:۲۰۰۰ استفاده شده اند، نشان دهنده عدم اختلاف معنی داری بین نتایج OD آن‌ها می باشد. این نتایج نشان می‌دهنـد کـه بـه ویژه روش‌های ۱ و ۴ نتایج نزدیک تـری از نظـر تیتـر بـا آنتی سرم تجاری مورد استفاده نشان می‌دهند(جدول ۲).

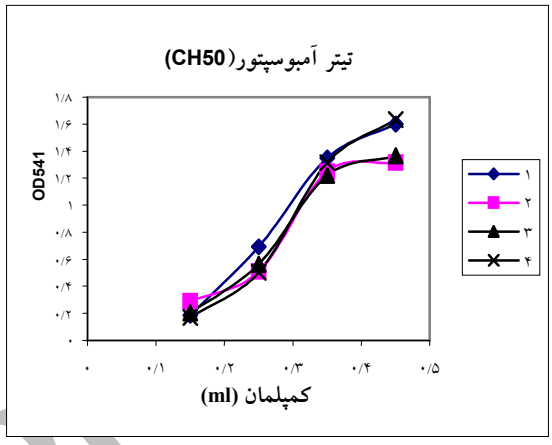
$(p_{۱}=۰/۹۶۲, p_{۲}=۰/۷۰۱ , p_{۳}=۰/۷۳۴ , p_{۴}=۰/۹۲۷)$

جدول ۲: مقادیر OD ۵۴۱ به دست آمده از آزمایش CH ۵۰ به هنگام استفاده از آمبوسپتورهای تولید شده با روش‌های مختلف نشان داده شده است .

روش تولید آمبوسپتور	مقادیر OD541 حاصل از آزمایش CH50			
	مقدار کمپلمان (ml) ۰/۱۵	مقدار کمپلمان (ml) ۰/۲۵	مقدار کمپلمان (ml) ۰/۳۵	مقدار کمپلمان (ml) ۰/۴۵
۱) گلبول کامل و LPS (یک بارتزریق داخل وریدی)	۰/۱۸۵	۰/۶۹۲	۱/۳۵۰	۱/۶۰۰
۲) گلبول کامـل پـس از ۱۰ تزریق متوالی داخل وریدی	۰/۲۸۹	۰/۵۰۸	۱/۲۴۷	۱/۳۱۴
۳) آنتی ژن‌های غـشایی بـه دسـت آمـده بـا حـرارت(تزریـق داخـل وریدی)	۰/۲۰۴	۰/۵۶۳	۱/۲۱۸	۱/۳۶۶
۴)آنتـی‌ژن‌هـای غـشایی بـه دسـت آمـده بـا روش سونیکاسیون (تزریق داخـل وریدی)	۰/۱۷۱	۰/۵۰۳	۱/۳۱۵	۱/۶۳۳
آمبوسپتور کمپانی بهرینگ	۰/۲۰۱	۰/۵۸۶	۱/۳۲۲	۱/۶۳۰

Archive of SID
www.SID.ir

در روش CH50 چنانچه یک منحنی بر حسب OD541 (متناسب با درصد لیز) و مقدار سرم (کمپلمان) رسم گردد حاصل، یک منحنی سیگموئیدی است (۸). در شکل ۱ اطلاعات موجود در جدول ۲ به صورت ۴ منحنی سیگموئیدی ترسیم شده است .



شکل ۱: منحنی‌های ۱ تا ۴ مربوط به ۴ نوع آمبوسپتور به دست آمده در این مطالعه (مطابق جدول۲) می باشند . محور x مقدار کمپلمان (میلی لیتر) به کار رفته و محور y مقادیر OD541 حاصل از آزمایش CH50 می باشد .

بحث

سنجش فعالیت سیستم کمپلمان از طریق سنجش فعالیت همولیتیک ۵۰٪ گلبول قرمز(CH50) ، روش قدیمی و مؤثر برای تشخیص کمپلمان در سرم یا سایر مایعات بدن می باشد . برای انجام این آزمایش لازم است از آنتی‌بادی بر علیه SRBC استفاده شود . لذا در مطالعه فوق اقدام به تولید این آنتی بادی با استفاده از روش‌های نسبتاً متفاوت و مقایسه آن‌ها با یکدیگر گردید .

در سال‌های اخیر تأثیر سویه های حیوانی و نوع رژیم تغذیه‌ای در تولید آنتی‌بادی بر علیه SRBC از موضوعاتی است که مورد توجه و مطالعه قرار گرفته است(۱۰). در این مطالعه جهت حذف عوامل تأثیر گذار ذکر شده، تنها از نژاد نیوزلندی خرگوش که همگی تحت یک رژیم غذایی قرارداشتند استفاده‌شد. تحت شرایط ذکر شده، نوع آنتی ژن و الگوی تزریق، فاکتورهای تعیین‌کننده اصلی در پاسخ ایمنی حیوان بر علیه SRBC به شمار می‌آیند.

بررسی تیتر آنتی‌سرم‌های تولید شده و مقایسه آن‌ها با یک آنتی‌سرم تجاری (بهرینگ)، نشان داد هر ۴ روش ارایه شده در جدول ۲، تیتر قابل قبولی را جهت استفاده در روش CH50 دارا می‌باشند. در این رابطه از نظر تیتر آنتی سرم تولید شده، روش‌های ۱ و ۴، نزدیکی و مشابهت بیشتری با آنتی سرم تجاری نشان می دهند (p_4 =۰/۹۲۷ و p_1 =۰/۹۶۲). در این روش‌ها به ترتیب گلبول کامل گوسفند به همراه LPS و آنتی ژن‌های غشایی گلبول به دست آمده با روش سونیکاسیون در تحریک ایمنی خرگوش استفاده شده اند . در این مطالعه اثر مایتوژنی و تقویت کننده ایمنی مشاهده شده جهت LPS تأیید دیگری است بر مطالعات گسترده دیگری که توسط محققان مختلف انجام گرفته است.

در توجیه نتایج به دست آمده می‌توان گفت از آن جایی‌که تولید آنتی‌بادی بر علیه SRBC وابسته به سلول T می‌باشد (T-cell dependent) ، از طرف دیگر آنتی‌ژن فورسمن واقع بر غشاء گلبول قرمز گوسفند ماهیت قندی دارد، لذا در تولید آنتی‌بادی بر علیه این سلول‌ها استفاده از آنتی‌ژن با ماهیت تغییر یافته (دناتوره) نیز می‌تواند تحریک‌کننده خوب سیستم ایمنی باشد مانند آنتی‌ژن به‌دست آمده از غشاء گلبول قرمز گوسفند که در اثر حرارت ۱۰۳ درجه سانتی گراد به‌دست آمده است. بنابراین از آن‌جایی‌که هدف نهایی، تولید آنتی‌بادی بر علیه شاخص‌های موجود بر غشاء سلولی SRBC می‌باشد، نیازی به تزریق گلبول کامل وجود نداشته و کافی است تنها غشاء سلول‌های مورد نظر تهیه و سپس با روش سونیکاسیون و یا اعمال حرارت، به آنتی‌ژن‌های محلول تجزیه گردند. در این صورت استفاده از روش I.V با الگوی مناسب منجر به تشکیل تیتر مناسب آنتی‌بادی با ویژگی مورد نظر می‌شود.

نتیجه‌گیری

تولید آنتی‌بادی بر علیه گلبول‌های قرمز گوسفند (SRBC) با استفاده از روش‌های متفاوتی امکان‌پذیر می‌باشد. این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از آنتی‌ژن‌های غشایی یا مقاوم به حرارت SRBC که به ترتیب با استفاده از روش‌های سونیکاسیون و اعمال حرارت ۱۰۳ درجه

Archive of SID
www.SID.ir

سانتی‌گراد تهیه می‌شوند، در میان روش‌های دیگر استفاده‌شده دارای برخی مزایا بوده و جهت تحریک ایمنی حیوان خرگوش کاملاً مناسب می‌باشند. با به‌کارگیری این دو روش از آن‌جایی‌که سلول کامل استفاده نمی‌شود، خطرات مربوط به ایجادعوارض ناشی از تزریق، مانند بروز شوک آنافیلاکتیک وجود نداشته و از طرفی آنتی سرم‌های به‌دست‌آمده در شرایط ذکر شده ، از نظر تیتر نهایی و میل ترکیبی با آنتی‌سرم رفرانس (بهرینگ) قابل مقایسه هستند و هم‌خوانی نتایج در آزمایش CH50 قابل مشاهده می‌باشد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از همکاری صمیمانه دکتر علی سلیمانی در انجام این مطالعه تشکر و قدردانی می‌شود .

References

1- Garvey JS, Cremer NE, Sussdorf DH. Preparation of antiserums. Methods in Immunology. 3th ed. Canada: Benjamin, Inc; 1977: 140-209.
2- Wozniakowska-Gessicka T, Wisniewska-Ligier M, Kups J. Effect of IFN-alpha on total haemolytic activity of CH50 complement system and C3, C4 levels in children with chronic hepatitis C. Med Sci Monit 2001 ; 7 (Suppl 1): 202-6.
3- Yara Banz,Trinh Cung, Elena Y.Korchagina, Nicolai V.Bovin, André Haeberli and Robert Rieben- Endothelial cell protection and complement inhibition in enotransplantation: a novel in vitro model using whole blood. Xenotransplantation 2005;12 (6): 434-443.
4- Sussdorf DH. Dynamics of the 19s and 7s Hemolysin Responses.The Journal of Infectious Diseases 1970; (121): 20-25 .
5- Petrov AB , Noleko Vm. Non - specific modulation of the Immune response with Liposomal meningococal lipopolysaccharide. Vaccine 1994; 12 (12): 1064-70.
6- Chase W. Hemolytic antibody. Methods in immunolog and immunochemistry. London: Academic Press, INC; 1977: 143-150.
7- Mayer MM. Complement and complement fixation. In: Kabat EA and Mayer MM, editors. Experimental Immunochemistry. Charles C. Springfield; 1961: 133-240.
8- Giclas PC. Choosing complement tests: differentiating between hereditary and acquired deficiency. In: Rose NR, Hamilton RG, Detrick B, editors.Manual of clinical laboratory immunology.6 th ed. Washington : D.C. ASM Press; 2002: 111-116.
9- Bean ES. Polyclonal antibodies. Howard GC, Bethell DR, editors. Basic methods in antibody production and characterization. London:CRC Press;2001: 31-49.
10- Cheema MA, Qureshi MA, Havenstein GB. A comparison of the immune profile of commercial broiler strains when raised on marginal and high protein diets. International Journal of Poultry Science 2003; 2 (5): 300-312.

Archive of SID

www.SID.ir

Assessment of production methods of antibodies against sheep red blood cells for application in complement system

Yari F.[1](PhD) , Hamidpour-Zare L.[2](MS)

[1] *Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center*
[2] *Itanian Blood Research and Fractionation Center*

Archive of SID

Abstract

Background and Objectives

CH50 method is used for the evaluation of complement system. In this method, sheep red blood cells (SRBCs) are sensitized with specific antibodies. Then, the capability of the complement system in the completion of the hemolytic reaction is assessed. In this study because of need for anti-SRBC antibody in CH50 test, it was produced in rabbit. This antibody is called "Amboceptor".

Materials and Methods

In order to perform this study, SRBCs or their membrane antigens were injected into rabbits with different methods. Produced antibodies were analyzed in CH50 method using human pooled sera (derived from at least 15 blood donors). Finally the optical densities (ODs) related to the lysis of SRBCs were compared. It is obvious that the amount of OD is correlated with the efficiency of the antibody.

Results

Intravenous or intraperitoneal injections of SRBCs repeatedly result in the formation of high titer antibodies, but the rapid death of the animals due to the anaphylactic shock occurs. While the usage of sonicated or heat-treated antigens of SRBCs in the immunization leads to the formation of antibodies with high specificity and titer; it does not threaten the life of the animals.

Conclusions

Production of anti-SRBC antibodies is applicable using different methods. This study shows that the use of the membrane or heat-stable antigens of SRBCs, which are prepared using sonication and heating (103ºC) respectively, has some advantages. These antigens are safe for rabbits and the titer of the antibody is high enough to be used in CH50 test.

Key words: Forssman Antigen, CH50, SRBC
SJIBTO 2006; 3(1): 45-51

Received: 4 Sep 2005
Accepted: 1 Mar 2006

Correspondence: Yari F., PhD of Immunology, IBTO-Research Center
P.O.Box: 14665-1157,Tehran, Iran.Tel: (+9821) 88601501-30 ; Fax : (+9821) 88601555
E-mail: *fateme yari@ yahoo.com*

www.SID.ir