Archive of SID

تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه ژیاردیا لامبلیا در خرگوش

افشین برازش[۱*]، دکتر جعفر مجیدی[۱]، دکتر اسماعیل فلاح[۱]، دکتر رسول جمالی[۱]، اردوان قازانچائی[۱]، جلال عبدالعلی زاده [۲]

۱- گروه ایمنی و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

۲- مرکز تحقیقات کاربردی و داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

تاریخ دریافت: تاریخ پذیرش:

چکیده

مقدمه: ژیاردیا لامبلیا یکي از شایع‌ترین تك یاخته‌هاي روده‌اي انسان در سراسر جهان مي‌باشد. تشخیص آن عمدتاً از طریق مشاهده مستقیم صورت مي‌گیرد ولي استفاده از روشهاي مبتني بر ELISA و IFA بعنوان تکنیکهاي برتر، کاربردهاي تحقیقاتي و اپیدمیولوژیکي دارد. براي طراحي تستهاي قدرتمند با قدرت تشخیصي بالا نظیر دیپ استیك و یا کیت‌هاي تشخیصي سریع، اولین قدم تولید آنتي‌بادي پلي‌کلونال مي‌باشد. لذا بر آن شدیم تا آنتي‌بادي پلي کلونال بر ضد ژیاردیا را در خرگوش تولید نماییم.

مواد و روش‌ها: با استفاده از روش تغییر یافته گرادیان دو مرحله‌اي سوکروز، کیست‌ها خالص‌سازي شدند و غلظت آن‌ها به تعداد 1×10^6/ml در PBS رسانده شد و به خرگوش در چندین مرحله به فاصله سه هفته تزریق شد. تزریق مرحله اول با استفاده از ادجوانت کامل فروند و تزریق یادآور با استفاده از ادجوانت ناقص فروند و تزریق‌هاي بعدي بدون استفاده از ادجوانت بصورت عضلاني- جلدي صورت گرفت. پس از ایمونیزاسیون خرگوش، براي اثبات تولید آنتي‌بادي پلي کلونال ضد ژیاردیا و تعیین تیتر آن، تست IFA و ELISA طراحي گردید.

یافته هاي پژوهش: نتایج بدست آمده در هر دو روش، بیانگر ایمن شدن خرگوش بود و با میزان 10^6/ml انگل و رقت سرمي $\frac{1}{100}$ و با رقت $\frac{1}{20}$ Goat anti rabbit IgG کونژوگه با FITC در زیر میکروسکوپ ایمنوفلورسانس، جواب کاملا قابل قبولي گرفته شد. در الایزا هم در تیترهاي با میزان 10^5/ml انگل و رقتهاي کونژوگه $\frac{1}{5000}$ و $\frac{1}{10000}$، و سرمي $\frac{1}{1000}$ و $\frac{1}{2000}$، بهترین جوابها گرفته شد.

نتیجه‌گیري نهایي: با توجه به اهمیت تشخیص آنتي ژن‌هاي ژیاردیایي در نمونه‌هاي مختلف و بالیني، تولید آنتي‌بادي پلي کلونال ضد ژیاردیالامبلیا با تیتر بالا قدم اول و مهمي در راستاي طراحي کیت‌هاي IFA و الایزاي مستقیم با هدف تشخیص مستقیم آنتي‌ژن‌هاي ژیاردیا بشمار مي‌رود که مي‌توان در مراحل بعدي نسبت به خالص‌سازي آنتي‌بادي تولیدي و کونژوگه نمودن آن با آنزیم اقدام نمود.

کلمات کلیدی : آنتی بادی پلی کلونال، ژیاردیا لامبلیا، الایزا

* **نویسنده مسئول:** گروه ایمنی و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

Email: afshinbarazesh@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ژیاردیا لامبلیا (دئودنالیس) یکی از پاتوژن‌های تک‌یاخته‌ای مهم است که در طبقه بندی جزو تاژک داران روده‌ای قرار می‌گیرد (۱). این انگل انتشار جهانی داشته، شیوع آن حدود ۲۰۰ میلیون نفر در دنیا تخمین زده می شود (۲). در مرور ۳۰۰ بررسی انجام گرفته در زمینه انگل های روده ای انسان درایران در نیم قرن گذشته، ژیاردیا در کنار آنتامبا هیستولیتیکا، شایع ترین تک یاخته های بیماریزا بوده اند (۳). مهمترین راه انتقال آن توسط آب آلوده بوده ولی انتقال فرد به فرد و نیز انتقال از راه غذا نیز اهمیت دارد (۴و۵). مهمترین علایم بیماری به ترتیب شیوع شامل: اسهال، سستی، نفخ شکم، دفع مدفوع چرب و بد بو، کرامپ های شکمی، تهوع، بی اشتهائی، کاهش وزن، استفراغ، تب، کهیر و یبوست می باشند (۶ و۷). اگرچه بیماری خوش خیم است، در بعضی افراد بویژه بچه ها و خانم‌های باردار ممکن است بیماری شدید با کاهش مایعات بدن و نیاز به بستری شدن ایجاد کند (۶ و۸) . اسهال مزمن ناشی از ژیاردیا خودبخود یا با درمان بهبود می یابد ولی بویژه در بچه ها با کاهش وزن، علایم شبیه اسپرو، استئاتوره و سوءجذب ویتامین بی ۱۲، ویتامین آ، پروتئین دی، گزیلوز و آهن همراه است (۹و۱۰). گاهی عدم تحمل لاکتوز وجود دارد. نظرات در مورد تأثیر ژیاردیازیس مزمن در رشد کودکان هنوز مورد بحث است (۸). روش تشخیص معمول ژیاردیازیس، آزمون میکروسکوپی مستقیم مدفوع برای یافتن انگل می باشد (۱۱). حساسیت این روش حتی با آزمایش چند نوبته مدفوع فقط ۷۰-۵۰٪ می‌باشد (۱۲و۱۳). در بیماران با ژیاردیازیس مزمن، حساسیت این روش ممکن است پایین تر هم باشد (۱۱)، زیرا کیست ها بطور متناوب دفع شده و تعداد آنها در سطح پایینی می باشد. آزمایش آسپیراسیون مایع دئودنوم و یا ژژنوم و بیوپسی از روده باریک ممکن است که دارای حساسیت بیشتری باشند (۱۴) ولی پرهزینه بوده و یک روش تهاجمی می باشد و به همین خاطر بندرت استفاده می شوند. امروزه تشخیص های آنتی ژنی روش های بهتری را برای تشخیص ارائه می دهند، زیرا تصور می شود سطح بیشتر آنتی ژن موجود در فرد یا نمونه مورد نظر اثبات می کند که مقدار انگل موجود در شخص بیمار یا نمونه آلوده نیز بیشتر است. لذا تشخیص ژیاردیا با روش های دیگری نظیر ایمنوفلئورسانس یا الایزا با درصد بالایی از حساسیت صورت می گیرد (۱۵) و در اینجا متد الایزا با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال جایگاهی ویژه و حساسیت بالایی دارد (۱۶). پس با توجه به اهمیت حضور انگل در منابع آبی و نیز مواد غذایی و سبزیجات و از طرفی اتخاذ یک روش کلینیکی با قدرت تشخیص بالا به هدف فراهم نمودن زمینه برای طراحی ابزارهایی نظیر دیپ استیک و یا کیت های تشخیصی سریع، در جهت تشخیص قطعی و لزوم تحقیقات بیشتر اپیدمیولوژیکی، بر آن شدیم تا آنتی بادی پلی کلونال را بر ضد ژیاردیا در خرگوش تهیه نمائیم.

مواد و روش ها

نمونه های مدفوع از ۱۰۰ بیمار مختلف جمع‌آوری گردیده و با روش های میکروسکوپی، مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه‌های مثبتی که دارای مقادیر فراوان فرم کیستی انگل بودند، جهت خالص سازی کیست مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه های فوق الذکر در ۵ برابر حجم خود با آب مقطر حل شده و بصورت سوسپانسیونی یکنواخت و همگن در آورده شد. پس از عبور دادن سوسپانسیون از ۳ لایه تنزیب، مایع در لوله‌های آزمایش مدرج مخروطی ریخته شده و با روش گرادیان تغییر یافته دو مرحله ای سوکروز تحت خالص سازی قرار گرفت (۱۷). و در نهایت غلظت آن جهت تزریق به حیوان برابر ۱×۱۰^{۶} /ml انگل در PBS تنظیم شد.

برای تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه کیست ژیاردیا از حیوان خرگوش استفاده شد و تزریق در چندین مرحله بفواصل ۱، ۳، ۲، ۲ و ۴ هفته بصورت عضلانی – داخل جلدی انجام شد تا ایمونیزاسیون کامل صورت گیرد. تزریق اول با استفاده از ادجوانت کامل فروند و تزریق یادآور بعدی با استفاده از ادجوانت ناقص فروند و تزریق های دیگر بدون استفاده از ادجوانت انجام شد.

حدود یک هفته پس از تزریق چهارم، جهت اثبات ایمن شدن خرگوش و همچنین برای تعیین تیتر آن، طراحی کیت الایزای غیر مستقیم و همچنین IFA صورت گرفت. در الایزا با استفاده از انگل که در رقتهای $۱۰^{۳}$ ، $۱۰^{۴}$ و $۱۰^{۵}$ انگل در یک میلی لیتر PBS به ته پلیت کوت شدند ، رقتهای مختلفی از سرم

www.SID.ir

Archive of SID

خرگوش ایمن ($\frac{۱}{۱۰۰۰}$۱ و $\frac{۱}{۲۰۰۰}$) اضافه و درنهایت آنتی‌بادی ضد آنتی بادی خرگوش کونژوگه شده با آنزیم، (با رقت $\frac{۱}{۵۰۰۰}$ و $\frac{۱}{۱۰۰۰۰}$) افزوده شد. و پس از افزودن سوبسترای خاص آنزیم یعنی تترا متیل بنزیدین (TMB) و توقف واکنش با اسید سولفوریک ۱ نرمال و خواندن جذب (OD) در دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر، تیتر محصول تولید شده مشخص گردید .

در IFA هم به همین ترتیب، انگل‌ها (با مقادیر$ml/۱۰^{۶}$-$۱۰^{۴}$ در PBS) در چاهک های لام ANA کوت شده، رقتهای مختلفی از سرم خرگوش ایمن ($\frac{۱}{۱۰}$، $\frac{۱}{۱۰۰}$، $\frac{۱}{۱۰۰۰}$ و $\frac{۱}{۲۰۰۰}$) اضافه و سپس آنتی بادی ضد آنتی بادی خرگوش کونژوگه شده با (FITC) با رقت $\frac{۱}{۱۰}$ و $\frac{۱}{۲۰}$ افزوده شد و در نهایت نتیجه عمل در زیر میکروسکوپ ایمنوفلورسنت، از نظر وجود تشعشعات ایمنوفلئورسانس بررسی گردید.

یافته‌های پژوهش

۱- خالص سازی کیست:

از سوسپانسیون نهایی بدست آمده، لام مستقیم تهیه و به روش میکروسکوپی مطالعه شد و همچنین جهت تعیین میزان کیستهای باز یافتی ، از لام نئوبار استفاده گردید . نتیجه عمل دست یافتن به سوسپانسیونی از کیستهای سالم و تقریبا یکدست و بدون آلودگی بود که میزان ریکاوری آن هم حدود $۱۰^{۴}\times$ ۵-۱ کیست از دو گرم مدفوع بود .

۲- تعیین تیتر آنتی بادی تولیدی :

الف- IFA

در این تست در تیتر های با میزان $۱۰^{۶}$ /ml انگل و رقت کونژوگه $\frac{۱}{۲۰}$ و رقت سرمی $\frac{۱}{۱۰۰}$ جواب ایده آل گرفته شد. جزئیات آن در جدول شماره (۱) آمده است:

جدول شماره ۱: نتایج حاصل از تست IFA در رقت های مختلف سرمی

میزان انگل در یک میلی لیتر PBS	$۱۰^{۶}$								$۱۰^{۵}$								$۱۰^{۴}$							
رقت کونژوگه	$\frac{۱}{۱۰}$				$\frac{۱}{۲۰}$				$\frac{۱}{۱۰}$				$\frac{۱}{۲۰}$				$\frac{۱}{۱۰}$				$\frac{۱}{۲۰}$			
رقت سرمی	$\frac{۱}{۱۰}$	$\frac{۱}{۱۰۰}$	$\frac{۱}{۱۰۰۰}$	$\frac{۱}{۲۰۰۰}$	$\frac{۱}{۱۰}$	$\frac{۱}{۱۰۰}$	$\frac{۱}{۱۰۰۰}$	$\frac{۱}{۲۰۰۰}$	$\frac{۱}{۱۰}$	$\frac{۱}{۱۰۰}$	$\frac{۱}{۱۰۰۰}$	$\frac{۱}{۲۰۰۰}$	$\frac{۱}{۱۰}$	$\frac{۱}{۱۰۰}$	$\frac{۱}{۱۰۰۰}$	$\frac{۱}{۲۰۰۰}$	$\frac{۱}{۱۰}$	$\frac{۱}{۱۰۰}$	$\frac{۱}{۱۰۰۰}$	$\frac{۱}{۲۰۰۰}$	$\frac{۱}{۱۰}$	$\frac{۱}{۱۰۰}$	$\frac{۱}{۱۰۰۰}$	$\frac{۱}{۲۰۰۰}$
نتایج	۴+	۳+	-	-	۳+	۱+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

www.SID.ir

Archive of SID

ب- ELISA

بدین منظور کیت الایزا طراحی گردید ، همانطور که در جدول شماره (۲) آمده است ، در تیتر های با میزان 10^5/ml و رقتهای کونژوگه $\frac{1}{5000}$ و $\frac{1}{10000}$، و سرمی $\frac{1}{1000}$ و $\frac{1}{2000}$، بهترین جوابها گرفته شد و جذب نوری (OD) آن بالای یک بود (OD≥1) .

جدول شماره ۲: نتایج حاصل از تست الایزا در رقت مختلف سرمی

میزان انگل در یک میلی لیتر PBS	10^5				10^4				10^3			
رقت کونژوگه	$\frac{1}{5000}$		$\frac{1}{10000}$		$\frac{1}{5000}$		$\frac{1}{10000}$		$\frac{1}{5000}$		$\frac{1}{10000}$	
رقت سرمی	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$
جذب نوری(OD)	$\frac{1}{207}$	$\frac{1}{058}$	$\frac{1}{027}$	۰/۷۲۹	۰/۶۲۱	۰/۴۳۱	۰/۴۷۳	۰/۳۱۹	۰/۳۵۲	۰/۲۳۱	۰/۱۹۸	۰/۲۲۲

بحث و نتیجه گیری نهایی

ژیاردیا از شایع ترین تک یاخته های بیماریزای روده ای انسان در ایران و جهان به شمار می رود و شیوع آن حدود ۲۰۰ میلیون نفر در دنیا تخمین زده می شود (۱ و۲). انتقال آن از طریق فرم کیستی انگل صورت گرفته و مهمترین راه انتقال توسط آبهای آلوده می باشد (۴ و۵). سیر تکاملی آن ساده است و به این جهت شیوع آن در مراکز پرورشی و مهد کودکها بسیار بالاست (۵). بطور معمول روشی که برای تشخیص ژیاردیازیس بکار می رود، استفاده از آزمون میکروسکوپی مستقیم مدفوع می‌باشد (۱۱). حساسیت این روش حدود ۷۰-۵۰٪ بوده و در موارد مزمن بیماری، پایین تر هم می باشد (۱۲و۱۳) . روش‌های بیوپسی و آسپیراسیون روده باریک می تواند حساسیت تشخیص انگل را بهبود بخشد، اما روشی تهاجمی بوده و بندرت استفاده می‌شوند (۱۴). تشخیص آنتی ژنی از تشخیص بر اساس آنتی‌بادی خیلی اختصاصی تر است. اساساً یک تشخیص آنتی ژنی وسیله بهتری را برای تشخیص ارائه می کند، زیرا که سطح آنتی ژنی فرد یا نمونه موردنظر با تعداد انگل موجود در آن مطابقت دارد. بنابراین سیستمهای آنتی‌ژنی یک جایگزین مطلوبی برای سیستمهای تشخیص آنتی بادی می‌باشند، بویژه در بیمارانی که دارای نقص ایمنی بوده و سیستم پاسخ دهی بدن آنها سرکوب شده است.

روش های مرسوم برای تشخیص آنتی ژن شامل: ژل دیفیوژن، تست کانتر ایمنوالکتروفورز و ایمنوفلوئورسنت آنتی بادی می‌باشند (۱۸). جدای از مشکلات عملی در آزمایشگاهها ، حساسیت و ویژگی متغیر اغلب تست های بالا از فاکتور های محدود کننده استفاده از آنها می باشد . الایزا بعنوان یک ابزار تشخیصی سرولوژیکی به القوه‌ای برای اغلب بیماریهای عفونی مورد استفاده قرار می گیرد و دارای حساسیت بالایی می‌باشد و اولین قدم در این راستا، تولید آنتی بادی مناسب در یک حیوان بر علیه آنتی ژنهای انگل ژیاردیا می باشد (۱۶).

جهت ایمن سازی حیوان از کیست های خالص شده ژیاردیا بعنوان آنتی ژن استفاده گردید . در روش های منتشر شده در ایزولاسیون کیست های تک یاخته ها از مواد شیمیایی نظیر فرمالین، یودین، اتر یا جیوه استفاده گردیده است که خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کیست ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد و

www.SID.ir

Archive of SID

روش‌های دیگری نظیر گرادیان سوکروز یا پرکول هم باعث بدست آمدن سوسپانسیونی از کیست های حاوی مواد زاید مدفوعی می شود (۱۹و۲۰). در این مطالعه کیست ها طی روش‌های مختلفی مورد خالص سازی قرار گرفتند و در نهایت با روش گرادیان تغییر یافته دو مرحله ای سوکروز، سوسپانسیونی از کیست های سالم و تقریبا یکدست و بدون آلودگی بدست آمد(۱۷) .

جهت تحریک هر چه بیشتر سیستم ایمنی حیوان و افزایش تیتر آنتی بادی تولیدی، تزریق اول با استفاده از ادجوانت کامل فروند و تزریق یادآور بعدی با ادجوانت ناقص و تزریق‌های بعدی بدون ادجوانت انجام گرفت (۲۱و۲۲) .

ساده ترین روش برای اثبات پیشرفت تولید آنتی بادی پلی کلونال روش الایزای غیر مستقیم است . اغلب آنتی ژن ها و آنتی بادی ها وقتی که بطور مستقیم به فاز جامد متصل می‌شوند، براحتی می توانند بوسیله این روش تشخیص داده شوند. در این روش برای جلوگیری از جذب پروتئین ها به میکرو پلیت ها و برای جلوگیری از بروز واکنش های غیر اختصاصی، از میکروپلیت های پلی استیرنی بعنوان فاز جامد استفاده شد ، در غیر اینصورت و برای اجتناب از این امر می‌بایستی از آنتی ژن خالص(تخلیص شده) استفاده می شد که این کار مستلزم صرف هزینه و زمان بسیار زیادی می باشد. در مورد کوتینگ (Coating) انگل ها با رعایت دما و pH بافر و استفاده از مسدودکننده PBS / T ۰/۵٪، این مراحل با دقت تمام انجام شد و نتایج مطلوبی بدست آمد.

نتایج بدست آمده از بررسی الایزا حاکی از خوب ایمن شدن حیوان می باشد و جذب نوری (OD) بالای یک با تیتر سرمی $\frac{۱}{۲۰۰۰}$ و رقت کونژوگه تا $\frac{۱}{۱۰۰۰۰}$ بدست آمد. نتایج حاصل از تست IFA هم نشان دهنده تولید آنتی بادی با تیتر مناسب می باشد.

از آنجائیکه تشخیص آنتی ژن های ژیاردیایی در نمونه‌های مدفوعی و منابع آبی و نیز مواد غذایی و سبزیجات از اهمیت خاصی برخوردار است و از طرفی جهت اتخاذ یک روش کلینیکی با قدرت تشخیصی بالا و به منظور فراهم نمودن زمینه برای طراحی ابزارهایی نظیر دیپ استیک و یا کیت های تشخیصی قطعی و لزوم تحقیقات بیشتر اپیدمیولوژیکی، تولید آنتی بادی پلی کلونال با تیتر بالا گام اول و مهمی بشمار می‌آید چرا که پس از تولید و خالص سازی آن و کونژوگاسیون با آنزیم، می‌تـــوان در راستـای طراحی کیت الایزای مستقیم آنتی‌ژن‌های انگلی اقدام نمود .

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر، بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات کاربردی و داروئی تبریز می باشد، لذا نگارندگان مراتب قدردانی خویش را از زحمات مدیریت و کارشناسان آن مرکز اعلام می دارند.

منابع

1- Adam RD. Biology of Giardia lamblia. Clin Microbiol Rev 2001, 14: 447-75.

2- Heyworth MF .Giardia infections . In: paradise lj et al, editors. Enteric infections and immunity newyork: plenum press, 1996; 227-38

۳- کیا عشرت بیگم، هوشیار حسین، موبدی ایرج. بررسی گزارشات انگلهای روده ای انسان در ایران در نیم قرن گذشته. خلاصه مقالات ارائه شده در دومین کنگره سراسری بیماریهای انگلی ایران، تهران، ۱۳۷۶، ص ۱۳۷

4- Kappus KD, Lundgren RG, Juranek DD, et al. Intestinal parasitism in the United States: update on a continuing problem. Am J Trop Med Hyg 1994, 50:705-13.

5- Gilman RH, Brown KH, Visvesvara GS, et al. Epidemiology and serology of Giardia lamblia in a developing country: Bangladesh. Trans R Soc Trop Med Hug 1985, 79:469–73.

6- Show RA, Stevens MB, The reactive arthritis of giardiasis. A case report. JAMA 1987, 258: 2734-2735.

www.SID.ir

Archive of SID

7- Clyne CA, Eli Opoulos G. M. Eli opoulos. Fever and urticaria in acute giardiasis. Arch Intern Med 1989, 149:939-940.

8- Fathing MJG, Mata L, Urrutia JJ, et al. "Natural history of Giardia infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth." Am J Clin Nutr 1986, 43:395-405.

9- Lengerich EJ, Addiss DG, Juranek DD. Severe giardiasis in the United States. Clin Infect Dis 1994,18:760-3.

10- Hjelt K, Paerregaard A, Krasilnikoff A. Giardiasis causing chronic diarrhea in sub-urban Copenhagen:Incidence, physical growth, clinical symptoms and small intestinal abnormality. Acta Pediatr 1992, 81: 881-886.

11- Rosoff JD, Stibbs HH. Isolation and identification of Giardia lamblia specific stool antigen (GSA65) useful in coprodiagnosis of giardiasis. 23 J clin Microbiol 1986, 23: 905-910.

12- Bruk JA. Giardiasis in childhood. Am J Dis Child 1975, 129:1304-1310.

13- Burke JA. The clinical and laboratory diagnosis of giardiasis. Crit Rev Clin Lab Sci 1977,7:373-391.

14- Sun T. The diagnosis of giardiasis. Am J Surg Pathol 1980, 4: 265–271.

15- Wittner M, Maayans Farrerw, et al.Diagnosis of giardiasis by two methods: immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. Arch Pathol Lab Med 1983, 107:524-527.

16- Duque-Beltran Sofia, et al. Detection of Giardia duodenalis antigen in human fecal eluates by enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies. Mem Inst, Oswaldo Cruz 2002, 97: 1165-1168.

۱۷- برازش افشین. ابداع روشی ساده و اقتصادی در جداسازی و تخلیص کیست ژیاردیا. خلاصه مقالات چهارمین کنگره ارتقاء کیفیت خدمات آزمایشگاهی، تهران. (۱۳۸۴)، صفحهٔ ۸۶

۱۸ – صائبی اسماعیل . بیماریهای انگلی در ایران ، جلد تک یاختگان ، انتشارات آییژ. ۱۳۸۴ . صفحات ۹۷ – ۷۹.

19- Blagg W, Schlogel EL, Mansour NS. A new concentration technique for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces.Am J Trop Med Hyg 1955, 4: 23-8

20- Walderich BL, Mueller R, Bracha J, et al. A new method for isolation and differentiation of native Entamoeba histolytica and E. dispar cysts from fecal samples. Parasitol Res 1997, 83:719-721.

21- Halliday LC , Artwohl JE. Physiologic and Behavioral Assessent of Rabbits Immunized with Freund's completed Adjuvant. *Cont Topics*, 2000, 39:8.

22- Stills HF, Bailey MQ. Use of Freund's complete Adjuvant. *Lab Animal 1991, 4: 25.*

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Ilam University of Medical Sciences, Vol. 14, No:4,Wniter 2006

Prodution of Polyclonal Antibody Against Giardia Lamblia in Rabbit

Barazesh, A[2*]., Dr.Madjidi, J[1]., Dr.Fallah E[1]., Dr.Jamali, R[1]., Ghazanchaei A[1]., Abdolalizadeh J[2].

1)Immunology and Parasitology department- faculty of medicine- Tabriz university of medical science
2)Drug applied research center of Tabriz

Abstract

Introduction: *Giardia lamblia* is the most frequently human intestinal protozoan in the worldwide. Diagnosis of *G. lamblia* by microscopic examination of stool is common. ELISA& IFA methods have researching and epidemiological use. For designing a powerful test with high detection rate like dipstick or rapid diagnosis kits; first step is production of polyclonal antibody. For this reason we decided to produce polyclonal antibody against *G. lamblia* in rabbit.

Material and methods: Giardia cysts were purified from human fecal samples by sucrose two stage modified gradient method. Their concentration was independently adjusted to 1×10^6/ml PBS, were inoculated intramasculary-intradermaly in four stage with freunds complete adjuvant for first time and with freunds uncomplete adjuvant for second time and without freunds adjuvant for next time, in rabbit. After immunization of rabbit, IFA test was carried out to evaluate the polyclonal antibody production against Giardia.

Results: The results of test showed the rabbit was immuned. Best results of IFA were achieved with 1×10^6/ml parasite and sera dilution of 1/100 and goat anti rabbit IgG conjugated with FITC dilution of 1/20 is under immunofloursent microscope.

Conclusion: Giardias antigens have an important role for diagnosis in clinical and other samples. Production of anti Giardia polyclonal antibody with high titer is first and important step for designing IFA and direct ELISA kits for direct detection of Giardias antigens. Produced polyclonal antibody can use purification and conjugation with enzyme.

***

Key words: Production – Giardia lamblia – Polyclonal antibody

*** Corresponding Author:** Immunology and Parasitology department- faculty of medicine- Tabriz university of medical science

www.SID.ir