

تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه ژیا ردیا 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 دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

تاریخ دریافت: ۸۵/۳/۱۳

تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۲/۵

چکیده

مقدمه: ژیا ردیا لامبلیا یکی از شایع ترین تک یاخته های روده ای انسان در سراسر جهان می باشد. تشخیص آن عمدتاً از طریق مشاهده مستقیم صورت می گیرد ولی روشهای مبتنی بر *ELISA*، *IFA*، بعنوان تکنیکهای برتر، کاربردهای تحقیقاتی و اپیدمیولوژیکی دارد. برای طراحی تستهای قدرتمند با قدرت تشخیصی بالا نظیر دیپ استیک و یا کیت های تشخیصی سریع، اولین قدم تولید آنتی بادی پلی کلونال می باشد. لذا بر آن شدیم تا آنتی بادی پلی کلونال بر ضد ژیا ردیا را در خرگوش تولید نماییم.

مواد و روش ها: با استفاده از روش تغییر یافته گرادیان دو مرحله ای سوکروز، کیست ها خالص سازی شدند و غلظت آنها به تعداد $1 \times 10^6/ml$ 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 تزریق های بعدی بدون استفاده از ادجوانت بصورت عضلانی - جلدی صورت گرفت. پس از ایمنوئیزاسیون خرگوش، برای اثبات تولید آنتی بادی پلی کلونال ضد ژیا ردیا و تعیین تیتراژ آن، تست *IFA* و *ELISA* طراحی گردید.

یافته های پژوهش: نتایج بدست آمده در هر دو روش، بیانگر ایمن شدن خرگوش بود و با میزان 10^6 انگل و رقت سرمی $1/100$ و با رقت $1/20$ *Goat anti rabbit IgG* کونژوگه با *FITC* در زیر میکروسکوپ ایمنوفلورسانس، جواب کاملاً قابل قبولی گرفته شد. در الیزا هم در تیتراژهای با میزان $10^4/ml$ انگل و رقت های کونژوگه $1/5000$ و $1/10000$ ، و سرمی $1/1000$ و $1/2000$ ، بهترین جوابها گرفته شد.

نتیجه گیری نهایی: با توجه به اهمیت تشخیص آنتی ژن های ژیا ردیایی در نمونه های مختلف و بالینی، تولید آنتی بادی پلی کلونال ضد *G.Lambli* با تیتراژ بالا قدم اول و مهمی در راستای طراحی کیت های *IFA* و الیزای مستقیم با هدف تشخیص مستقیم آنتی ژن های ژیا ردیا به شمار می رود که می توان در مراحل بعدی نسبت به خالص سازی آنتی بادی تولیدی و کونژوگه نمودن آن با آنزیم اقدام نمود.

واژه های کلیدی: تولید، آنتی بادی پلی کلونال، ژیا ردیا لامبلیا

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

و بیوپسی از روده باریک ممکن است که دارای حساسیت بیشتری باشند (۱۴) ولی پرهزینه بوده و یک روش تهاجمی می باشد و بخاطر همین بندرت استفاده می شوند. امروزه تشخیص های آنتی ژنی روش های بهتری را 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 ژیا ردیا با روش های دیگری نظیر ایمونوفلئورسانس 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 ژیا ردیا در خرگوش تهیه نماییم.

مواد و روش ها

نمونه های مدفوع از ۱۰۰ بیمار مختلف جمع آوری گردیده و با روش های میکروسکوپی، مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه های 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 سوسپانسیون یکنواخت و همگن در آورده شد. پس از عبور دادن سوسپانسیون از ۳ لایه تنزیب، مایع در لوله های 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

ژیا ردیا لامبلیا (دئودنالیس) یکی از پاتوژن های تک یاخته ای مهم است که در طبقه بندی جزو تاژک داران روده ای قرار می گیرد (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 در ایران در نیم قرن گذشته، ژیا ردیا 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 انتقال از راه غذا نیز اهمیت دارد (۴، ۵). مهمترین علائم بیماری به ترتیب شیوع شامل: اسهال، نفخ شکم، دفع مدفوع چرب و بد بو، کرامپ های شکمی، تهوع، بی اشتها، کاهش وزن، استفراغ، تب، کهیر و بیوست می باشند (۶، ۷). گرچه بیماری خوش خیم است، در بعضی افراد بویژه بچه ها و خانم های باردار ممکن است بیماری شدید با کاهش مایعات بدن و نیاز به بستری شدن ایجاد کند (۸، ۹). اسهال مزمن ناشی از ژیا ردیا خودبخود یا با درمان بهبود می یابد ولی بویژه در بچه ها با کاهش وزن، علائم شبیه اسپرو، استئاتوره و سوء جذب ویتامین ب ۱۲، ویتامین آ، پروتئین دی، گزیلوز و آهن همراه است (۱۰، ۹). گاهی عدم تحمل لاکتوز وجود دارد. نظرات در مورد تأثیر ژیا ردیا زیس مزمن در رشد کودکان هنوز مورد بحث است (۸). روش تشخیص معمول ژیا ردیا زیس، آزمون میکروسکوپی مستقیم مدفوع برای یافتن انگل می باشد (۱۱). حساسیت این روش حتی با آزمایش چند نوبته مدفوع فقط ۷۰-۵۰٪ می باشد (۱۲، ۱۳). در بیماران با ژیا ردیا زیس 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 اسپیراسیون مایع دئودنوم و یا ژژنوم

IFA - الف

در این تست در تیتراهای با میزان $10^6 / \mu\text{L}$ انگل و رقت کونزوگه $1/20$ و رقت سرمی $1/100$ جواب ایده آل گرفته شد. جزئیات آن در جدول شماره (۱) آمده است:

ELISA- ب
 بدین منظور کیت الیزا طراحی گردید، همانطور که در جدول شماره (۲) آمده است، در تیتراهای با میزان $10^5/ml$ و رقتهای کونزوگه $1/5000$ و $1/10000$ ، و سرمی $1/1000$ و $1/2000$ ، بهترین جوابها گرفته شد و جذب نوری (OD) آن بالای یک بود ($OD \geq 1$).

جدول شماره ۲ : تعیین تیترا آنتی بادی تولیدی با استفاده از طراحی تست ELISA

| میزان انگل در $1ml$ PBS | 10^5 | | 10^4 | | 10^3 | |
|-------------------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|
| | $1/5000$ | $1/10000$ | $1/5000$ | $1/10000$ | $1/5000$ | $1/10000$ |
| رقت کونزوگه | | | | | | |
| رقت سرمی | | | | | | |
| جذب نوری (OD) | $1/207$ | $1/058$ | $1/027$ | $0/729$ | $0/621$ | $0/431$ |

بحث و نتیجه گیری

(۱۴). تشخیص آنتی ژنی از تشخیص بر اساس آنتی بادی 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، پس سیستمهای آنتی ژنی یک جایگزین مطلوبی برای سیستمهای تشخیص آنتی بادی می باشند، مخصوصاً 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 کاتر ایمنوالکتروفورز و ایمنوفلوئورسنت آنتی بادی تست می باشند (۱۸). جدای از مشکلات عملی در آزمایشگاهها ،

ژیا ردیا 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 (۲ و ۱). انتقال آن از طریق فرم کیستی انگل صورت گرفته و مهمترین راه انتقال توسط آبهای آلوده می باشد (۵ ، ۴). سیر تکاملی آن ساده است و به این جهت شیوع آن در مراکز پرورشی و مهد کودکان بسیار بالاست (۵). بطور معمول روشی که برای تشخیص ژیا ردیازیس بکار می رود، استفاده از آزمون میکروسکوپی مستقیم مدفوع می باشد (۱۱). حساسیت این روش حدود ۷۰-۵۰٪ بوده و در موارد مزمن بیماری، پایین تر هم می باشد (۱۳، ۱۲). روش های بیوپسی و آسپیراسیون روده باریک می تواند حساسیت تشخیص انگل را بهبود بخشد، اما روشی تهاجمی بوده و بندرت استفاده می شوند

های غیر اختصاصی، از میکروپلیت های پلی استیرنی بعنوان فاز جامد استفاده شد، در غیر اینصورت و برای اجتناب از این امر می بایستی 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 *T* / *PBS* ۰.۵٪، این مراحل با دقت تمام انجام شد و نتایج مطلوبی بدست آمد. نتایج بدست آمده از بررسی الیزا حاکی از خوب ایمن شدن حیوان می باشد و جذب نوری (*OD*) بالای یک با تیتراژ سرمی ۱/۲۰۰۰ و رقت کونژوگه تا ۱/۱۰۰۰۰ بدست آمد. نتایج حاصل از تست *IFA* هم نشان دهنده تولید آنتی بادی با تیتراژ مناسب می باشد.

از آنجائیکه تشخیص آنتی ژن های ژیاوردیایی در نمونه های 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 تیتراژ بالا گام اول و مهمی بشمار می آید چرا که پس از تولید و خالص سازی آن و کونژوگاسیون با آنزیم، می توان در راستای طراحی کیت الیزای مستقیم آنتی ژن های 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.

حساسیت و ویژگی متغیر اغلب تست های بالا از فاکتور های محدود کننده استفاده از آنها می باشد. الیزا بعنوان یک ابزار تشخیصی سرولوژیکی بالقوه ای برای اغلب بیماریهای عفونی مورد استفاده قرار می گیرد و دارای حساسیت بالایی می باشد و اولین قدم در این راستا، تولید آنتی بادی مناسب در یک حیوان بر علیه آنتی ژنهای انگل ژیاوردیا می باشد (۱۶). جهت ایمن سازی حیوان از کیست های خالص شده ژیاوردیا 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 می دهد و روش های دیگری نظیر گرادیان سوکروز یا پرکول هم باعث بدست آمدن سوسپانسیون از کیست های حاوی مواد زاید مدفوعی می شود (۱۹،۲۰). در این مطالعه کیست ها طی روش های مختلفی مورد خالص سازی قرار گرفتند و در نهایت با روش گرادیان تغییر یافته دو مرحله ای سوکروز، سوسپانسیون از کیست های سالم و تقریباً یکدست و بدون آلودگی بدست آمد (۱۷).

جهت تحریک هر چه بیشتر سیستم ایمنی حیوان و افزایش تیتراژ آنتی بادی تولیدی، تزریق اول با استفاده از ادجوانت کامل فروند و تزریق یادآور بعدی با ادجوانت ناقص و تزریق های بعدی بدون ادجوانت انجام گرفت (۲۱،۲۲).

ساده ترین روش برای اثبات پیشرفت تولید آنتی بادی پلی کلونال روش الیزای غیر مستقیم است. اغلب آنتی ژن ها و آنتی بادی ها وقتی که بطور مستقیم به فاز جامد متصل می شوند، 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

References :

- 1- Adam RD. Biology of Giardia lamblia. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Jul; 14(3): 447-75. Review.
- 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, Juraneck DD, Roberts JM, Spencer HC. 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- R. A. Shaw; M. B. Stevens. The reactive arthritis of giardiasis. A case report. . *JAMA.* 1987; 258: 2734-2735.
- 7- C. A. Clyne; G. M. Eliopoulos. Fever and urticaria in acute giardiasis. *Arch Intern Med.* 1989; 149:939-940.
- 8- Fathing MJG, Mata L, Urrutia JJ Kronmal RA. 1986. "Natural history of Giardia infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth." *Am J Clin Nutr* 43:395-405.
- 9- Lengerich EJ, Addiss DG, Juraneck 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 Paediatr* 1992; 81: 881-886.
- 11- Rosoff JD, Stibbs HH. Isolation and identification of Giardia lamblia specific stool antigen (GSA65) useful in coprodiagnosis of giardiasis. *Journal of Clinical Microbiology* 23:905-910, 1986.
- 12- J. A. Burke. Giardiasis in childhood. *Am J Dis Child.* 1975; 129:1304-1310.
- 13- Burke, J. A. 1977. The clinical and laboratory diagnosis of giardiasis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 7:373-391.
- 14- Sun T. The diagnosis of giardiasis. *Am J Surg Pathol.* 1980 Jun; 4(3): 265-271.
- 15- Wittner, M., S. Maayan, W. Farrer, and H. B. Tanowitz. 1983. Diagnosis of giardiasis by two methods: immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 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, Dec 2002, vol.97, no.8, p.1165-1168.*
- ۱۷- برازش، افشین. ابداع روشی ساده و اقتصادی در جداسازی و تخلیص کیست ژیا ردیا. خلاصه مقالات چهارمین کنگره ارتقاء کیفیت خدمات آزمایشگاهی، تهران. (۱۳۸۴)؛ صفحه ۸۶
- ۱۸- صائبی، اسماعیل. بیماریهای انگلی در ایران، جلد تک یاخندگان، انتشارات آبیژ. ۱۳۸۴. صفحات ۹۷ - ۷۹.
- 19- Blagg W, Schlogel EL, Mansour NS (1955) A new concentration technique for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. *Am J Trop Med Hyg.* 1955 Jan; 4(1):23-8
- 20- Walderich, B., L. Mueller, R. Bracha, J. Knobloch, and G. D. Burchard. 1997. A new method for isolation and differentiation of native Entamoeba histolytica and E. dispar cysts from fecal samples. *Parasitol. Res.* 83:719-721.
- 21- Halliday LC, Artwohl JE. (2000). Physiologic and Behavioral Assessment of Rabbits Immunized with Freund's completed Adjuvant. *Cont. Topics*, 39(5), 8.
- 22- Stills HF, Bailey MQ. (1991). Use of Freund's complete Adjuvant. *Lab. Animal*, 4, 25.