

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

دکتر فاطمه یاری<sup>۱</sup>، لطیف حمیدپور زارع<sup>۲</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

در ارزیابی فعالیت سیستم کمپلمان و پی بردن 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، به دلیل نیاز به آنتی‌بادی اختصاصی گلبول‌های قرمز گوسفند (SRBC) برای انجام آزمایش CH50، اقدام به تولید آنتی بادی پلی کلونال ویژه SRBC 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 لیز گلبول‌ها 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 تیتراژ مطلوبی از آنتی بادی در این حیوان شده، اما سبب مرگ زود هنگام 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 سرم‌هایی می‌گردد که ضمن داشتن ویژگی مطلوب، بقای حیوان‌های مورد نظر را تهدید نمی‌نماید.

#### نتیجه‌گیری

تولید آنتی بادی پلی کلونال بر علیه SRBC با استفاده از روش‌های مختلف، میسر می‌باشد. با این حال این مطالعه نشان می‌دهد، چنانچه آنتی‌ژن‌های غشایی گلبول قرمز با روش سونیکاسیون و یا آنتی‌ژن‌های 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 تیتراژ مطلوب نمود.

**کلمات کلیدی:** آنتی‌ژن فورسمن، CH50، SRBC

تاریخ دریافت: ۱۳/۶/۸۴

تاریخ پذیرش: ۲۰/۱۲/۸۴

۱- مؤلف مسئول: PhD ایمونولوژی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران - صندوق پستی ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

۲- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پژوهش و پالایش خون

**مقدمه**

اجزای سیستم کمپلمان با چندین مکانیسم، پاسخ‌های ایمنی را تقویت کرده و پیش می‌برند. بدیهی است سنجش فعالیت این سیستم از اهمیت خاصی در جهت بررسی نحوه فعالیت سیستم ایمنی برخوردار است. در روش سنجش فعالیت همولیتیک ۵۰٪ گلبول قرمز (CH50) که وجود کمپلمان را به صورت 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 در مقایسه با گذشته موارد کاربرد وسیع‌تری برای آزمایش CH50 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 مانند آزمایش CH50 و ثبوت کمپلمان استفاده می‌شود، لذا تولید این آنتی‌بادی جهت تکمیل سیستم‌های همولیتیک در آزمایش‌های ذکر شده، از ارزش کاربردی برخوردار است (۹-۴). از طرف دیگر، تولید این آنتی‌بادی به صورت پلی‌کلونال جهت داشتن کارایی لازم و استفاده در روش‌های ذکر شده کفایت نموده و نیاز به استفاده از روش‌های کشت سلولی جهت دست‌یابی 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 روش‌ها**

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 ( $2 \times 10^9$ ) سلول در هر میلی‌لیتر (تهیه و جهت حساس نمودن حیوان مورد استفاده قرار گرفت. به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون ذکر شده به طریق داخل وریدی تزریق گردید. جهت این منظور از تزریق مکرر (۱۰ تزریق متوالی در ۱۸ روز) استفاده شد (۱). ۳ روز پس از تزریق آخر، خون‌گیری 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 تقویت‌کننده ایمنی لیپوپلی ساکارید (LPS) در غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده گردیده و تیتراسیون ایجاد شده در این حیوان‌ها و نیز میزان مرگ و میر در آن‌ها بررسی شد (۷، ۶). پس از ۲۵ روز از تزریق اول، بررسی تیتراسیون بادی ایجاد شده انجام شد.

**۳- تزریق داخل صفتی سوسپانسیون ۱۰ درصد SRBC**

این نوع تزریق با الگوی ۳ تزریق در روزهای اول، چهاردهم و چهل و پنجم از سوسپانسیون گلبول‌های قرمز ( $2 \times 10^9$ ) سلول در هر میلی‌لیتر (به ازای یک میلی‌لیتر 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

سلول‌های مورد نظر تا زمان استفاده در همان روز در ۴ 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 سانتی‌گراد 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 حساس شده به همراه ۵/۵ میلی لیتر از بافر ژلاتین ورونال (GVB) با  $pH=7.4$  (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 در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شده و به فاصله تکان داده شدند 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 فتومتر (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 ۶/۵ میلی لیتر آب مقطر) نیز مورد استفاده قرار گرفت (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 آزمون t، مقایسه میانگین مقادیر OD541 در آزمایش CH50 انجام شد.

#### یافته‌ها

این مطالعه نشان می‌دهد با تزریق گلبول کامل گوسفند، علی‌رغم کسب نتیجه مطلوب در تیتراژ آنتی‌بادی مورد نظر، مدت بقای حیواناتی که به طور مکرر گلبول

(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 آنتی‌ژن 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 آنتی‌ژن هتروفیل و مقاوم به حرارت محسوب می‌گردد، از حرارت حدود ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد 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. آنتی‌ژن به دست آمده در غلظتی معادل  $OD280=0.2$  تنظیم و جهت تزریق مورد استفاده قرار گرفت. ۲ حیوان خرگوش جهت تزریق آنتی‌ژن 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 (۶، ۷). 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 سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس بررسی از نظر تیتراژ آنتی‌بادی، در آزمایش CH50 انجام گرفت (۱).

#### سنجش فعالیت آنتی‌بادی ضد گلبول قرمز گوسفند در تست CH50:

جهت سنجش فعالیت همولیتیک آنتی‌بادی‌های به دست آمده در حیوان خرگوش، رقت هم سان و مناسب (۱:۱۰۰۰ تا ۱:۲۰۰۰) از آنتی‌سرم‌ها پس از انجام چند آزمایش انتخاب و این رقت به سوسپانسیون سلولی استاندارد شده، (۱۰<sup>۹</sup> سلول در هر میلی لیتر) افزوده گردید. پس از نیم‌ساعت حساس کردن گلبول‌های قرمز،

دست می آید که از آنتی 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 عنوان منبع کمپلمان از سرم پولد نرمال انسانی استفاده شده است. مقایسه میانگین مقادیر OD541 در آزمایش CH50 مربوط به هر یک از نمونه های آمبوسپتور ۱ تا ۴ و آمبوسپتور کمپانی بهرینگ (Behring) که تماماً در رقت ۱:۲۰۰۰ استفاده شده اند، نشان دهنده عدم اختلاف معنی داری بین نتایج OD آن ها می باشد. این نتایج نشان می دهند که به ویژه روش های ۱ و ۴ نتایج نزدیک تری از نظر تیتراژ با آنتی سرم تجاری مورد استفاده نشان می دهند (جدول ۲).  
( $p_1=0/962$ ,  $p_2=0/701$ ,  $p_3=0/734$ ,  $p_4=0/927$ )

جدول ۲: مقادیر OD ۵۴۱ به دست آمده از آزمایش CH ۵۰ به هنگام استفاده از آمبوسپتورهای تولید شده با روش های 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 بار تزریق داخل وریدی)	۰/۱۸۵	۰/۶۹۲	۱/۳۵۰	۱/۶۰۰
۲) گلبول کامل پس از ۱۰ تزریق متوالی داخل وریدی	۰/۲۸۹	۰/۵۰۸	۱/۲۴۷	۱/۳۱۴
۳) آنتی ژن های غشایی به دست آمده با حرارت (تزریق داخل وریدی)	۰/۲۰۴	۰/۵۶۳	۱/۲۱۸	۱/۳۶۶
۴) آنتی ژن های غشایی به دست آمده با روش سونیکاسیون (تزریق داخل وریدی)	۰/۱۷۱	۰/۵۰۳	۱/۳۱۵	۱/۶۳۳
آمبوسپتور کمپانی بهرینگ	۰/۲۰۱	۰/۵۸۶	۱/۳۲۲	۱/۶۳۰

قرمز را به طریق داخل وریدی دریافت کرده اند کوتاه می گردد. حیوانات پس از دو ماه به علت واسکولیت ناشی از تشکیل کمپلکس های ایمنی، دچار مرگ می شوند. دریافت گلبول کامل به همراه LPS منجر به مرگ ۳۳-۵۰ درصد از حیوانات در زمان کمتر از ۲ ماه می گردد.

در تولید آنتی بادی به روش داخل صفاقی مطابق الگوی توضیح داده شده در قسمت مواد و روش ها، معلوم شد که تیتراژ آنتی بادی در یک روند رو به افزایش است. البته روند افزایش تیتراژ در مقایسه با تزریق داخل وریدی کندتر است. با انجام تزریق سوم، تیتراژ آنتی بادی کاملاً بالا رفته و در الگوی منطبق با تزریق های مکرر از طریق داخل وریدی قرار می گیرد (جدول ۱).

جدول ۱: مقادیر OD541 به دست آمده در روش CH50 را به طور مقایسه ای برای تزریق SRBC به روش داخل وریدی در هنگام تزریق همراه با LPS و به طریق صفاقی نشان می دهد. OD بر حسب مقادیر رو به افزایش کمپلمان ملاحظه می گردد .

نوع 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
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 (پس از سه بار تزریق) SRBC ایجاد شده است .

همان طور که گفته شد، آنتی ژن سونیکه SRBC به صورت داخل عضلانی و داخل وریدی جهت تحریک ایمنی حیوان استفاده شد. نتیجه بررسی تیتراژ آنتی بادی های تشکیل شده نشان داد که جواب مناسب تر در شرایطی به

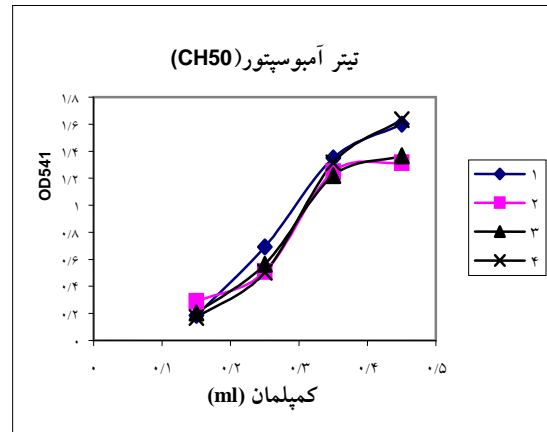
یک آنتی‌سرم تجاری (بهرینگ)، نشان داد هر ۴ روش ارایه شده در جدول ۲، تیتراژ قابل قبولی را جهت استفاده در روش CH50 دارا می‌باشند. در این رابطه از نظر تیتراژ آنتی‌سرم تولید شده، روش‌های ۱ و ۴، نزدیکی و مشابهت بیشتری با آنتی‌سرم تجاری نشان می‌دهند ( $p_4 = 0/927$  و  $p_1 = 0/962$ ). در این روش‌ها به ترتیب گلبول کامل گوسفند به همراه LPS و آنتی‌ژن‌های غشایی گلبول به دست آمده با روش سونیکاسیون در تحریک ایمنی خرگوش استفاده شده اند. در این مطالعه اثر مایتوزنی 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 جایی که 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 (ذراتوره) نیز می‌تواند تحریک کننده خوب سیستم ایمنی باشد مانند آنتی‌ژن به دست آمده از غشاء گلبول قرمز گوسفند که در اثر حرارت ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد به دست آمده است. بنابراین از آن جایی که 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 تیتراژ 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

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 نوع آمبوسپتور به دست آمده در این مطالعه (مطابق جدول ۲) می‌باشند. محور X مقدار کمپلمان (میلی لیتر) به کار رفته و محور Y مقادیر OD541 حاصل از آزمایش CH50 می‌باشد.

#### 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 می‌باشد. برای انجام این آزمایش لازم است از آنتی‌بادی بر علیه SRBC استفاده شود. لذا در مطالعه فوق اقدام به تولید این آنتی‌بادی با استفاده از روش‌های نسبتاً متفاوت و مقایسه آن‌ها با یکدیگر گردید.

در سال‌های اخیر تأثیر سویه‌های 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 قرار داشتند استفاده شد. تحت شرایط ذکر شده، نوع آنتی‌ژن و الگوی تزریق، فاکتورهای تعیین کننده اصلی در پاسخ ایمنی حیوان بر علیه SRBC به شمار می‌آیند.

بررسی تیتراژ آنتی‌سرم‌های تولید شده و مقایسه آن‌ها با

میل ترکیبی با آنتی سرم 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 .

سنتی‌گرا د تهیه می‌شوند، در میان روش‌های دیگر استفاده شده دارای برخی مزایا بوده و جهت تحریک ایمنی حیوان خرگوش کاملاً مناسب می‌باشند. با به‌کارگیری این دو روش از آن‌جایی که سلول کامل استفاده نمی‌شود، خطرات مربوط به ایجاد عوارض ناشی از تزریق، مانند بروز شوک آنافیلاکتیک وجود نداشته و از طرفی آنتی سرم‌های به‌دست آمده در شرایط ذکر شده، از نظر تیتراژی و

### 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 Haerberli 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 meningococcal lipopolysaccharide. *Vaccine* 1994; 12 (12): 1064-70.
- 6- Chase W. Hemolytic antibody. *Methods in immunology 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*. 6th 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.

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

Yari F.<sup>1</sup>(PhD), Hamidpour-Zare L.<sup>2</sup>(MS)

<sup>1</sup> Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center

<sup>2</sup> Iranian Blood Research and Fractionation Center

### 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 (103°C) 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