

خون

فصلنامه علمی پژوهشی

دوره ۳ شماره ۱ بهار (۸۵-۴۵)

ارزیابی روش‌های تولید آنتی بادی علیه گلوبول‌های 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 گلوبول‌های قرمز گوسفند با آنتی بادی اختصاصی پوشانیده شده و قابلیت سیستم کمپلمان در تکمیل لیز این سلول‌ها، مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

در این مطالعه، به دلیل نیاز به آنتی بادی اختصاصی گلوبول‌های قرمز گوسفند (SRBC) برای انجام آزمایش CH50، اقدام به تولید آنتی بادی پلی کلونال ویژه SRBC در حیوان خرگوش گردید و آنتی بادی‌های تولید شده آمبوسپتور به روش‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی (experimental) بود. برای انجام این پژوهش، تزریق گلوبول کامل گوسفند یا آنتی ژن‌های 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 گلوبول‌ها 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 گلوبول 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 سرم‌هایی می‌گردد که ضمن داشتن ویژگی مطلوب، بقای حیوان‌های مورد نظر را نهدید 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 آنتی ژن‌های غشایی گلوبول قرمز با روش سونیکاسیون و یا آنتی ژن‌های مقاوم به حرارت گلوبول 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: آنتی ژن فورسمن، SRBC، CH50

تاریخ دریافت: ۱۳/۶/۸۴

تاریخ پذیرش: ۲۰/۱۲/۸۴

۱- مؤلف مسؤول: PhD ایمونولوژی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران - صندوق پستی ۱۱۵۷-۱۶۶۵ - 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، پاسخ های ایمنی را تقویت کرده و پیش می برند. بدینهی است سنجش فعالیت این سیستم از اهمیت خاصی درجهت بررسی نحوه فعالیت سیستم ایمنی برخوردار است. در روش سنجش فعالیت همولیتیک (CH50) که وجود کمپلمان را به صورت کمی و کیفی نشان می دهد، اریتروسیت های پوشیده شده با آنتی بادی اختصاصی، با رقت های مختلف کمپلمان (مثلاً موجود در سرم انسان) مواجه شده و پس از زمان انکوباسیون و انجام سانتریفوژ، میزان لیز سلول ها با استفاده از اندازه گیری اسپکتروفتومتری هموگلوبین بررسی می شود. چنانچه مقدار کمپلمان کم یا فعالیت آن دچار اشکال باشد، در آزمایش ذکر شده، همولیز باشد کم مشاهده می شود. امروزه در مقایسه با گذشته موارد کاربرد وسیع تری برای آزمایش CH50 عنوان شده است (۱-۳).

از آنجایی که آنتی بادی بر علیه گلوبول های قرمز گوسفند (Sheep Red Blood Cell: SRBC) به عنوان ابزار اولیه در انجام آزمایش های مختلف سنجش فعالیت سیستم کمپلمان مانند آزمایش CH50 و ثبوت کمپلمان استفاده می شود، لذا تولید این آنتی بادی جهت تکمیل سیستم های همولیتیک در آزمایش های ذکر شده، از ارزش کاربردی برخوردار است (۴-۹). از طرف دیگر، تولید این آنتی بادی به صورت پلی کلونال جهت داشتن کارآیی لازم و استفاده در روش های ذکر شده کفايت نموده و نیاز به استفاده از روش های کشت سلولی جهت دست یابی به تک کلون های اختصاصی علیه شاخص های گلوبول قرمز نمی باشد. لذا این آنتی بادی علی رغم موارد مصرف فراوان آن به آسانی قابل تهیه است. این مطالعه روش های مختلف در تولید آنتی بادی بر علیه گلوبول های قرمز گوسفند را به صورت پلی کلونال 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 ۲-۳ حیوان برای هر روش) مورد استفاده قرار گرفت. روش های استفاده شده در این مطالعه جهت تولید آنتی بادی علیه

گلوبول های قرمز گوسفند عبارت است از:

۱- استفاده از گلوبول قرمز کامل گوسفند (SRBC) با تزریق های مکرر

سوسپانسیون ۱۰ درصد گلوبول های گوسفند (2×10^9) 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) استفاده شد (۱). ۳ روز پس از تزریق آخر، خون گیری انجام و تیتراسیون به عمل آمد.

۲- استفاده از گلوبول های 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 آنتی بادی ایجاد شده در این حیوان ها و نیز میزان مرگ و میر در آن ها 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 گلوبول های قرمز (2×10^9 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، خون گیری انجام و تیتراسیون به عمل آمد (۱).

۴- تهیه آنتی ژن های غشای گلوبول قرمز با استفاده از سونیکاسیون (Sonication)

جهت لیز گلوبول های قرمز گوسفند، سلول های مزبور در محلولی با قدرت یونی پایین قرار داده شده و غشای (ghost) آنها با استفاده از امواج 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 گلوبول قرمز شود. لوله‌های حاوی یک میلی لیتر از SRBC حساس شده به همراه ۵/۵ میلی لیتر از بافر ژلاتین ورونال (GVB) با pH=۷/۴ به همراه ۱/۰۱۹ گرم HCl از سدیم باریتیال، ۵/۳ گرم NaCl، ۳/۵۵ میلی لیتر از یک نرمال ، یک گرم ژلاتین ، ۰/۵ میلی مولار^۲ Mg^{۲+} و ۰/۱۵ میلی مولار^۲ Ca^{۲+}) 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 فتومنتری (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 گلوبول‌های قرمز و ۵/۵ میلی لیتر آب مقطّر) نیز مورد استفاده قرار گرفت (۸، ۶). در نهایت با به کارگیری گلوبول‌های 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^a، مقایسه میانگین مقادیر OD541 در آزمایش CH50 انجام شد.

یافته‌ها

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

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

۵- اعمال حرارت جهت استخراج آنتی‌زن‌های مقاوم به حرارت در غشای گلوبول‌های قرمز گوسفند :

با علم به این که فورسمن (Forssman) یک آنتی‌زن 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 مقطّر خنک) ، غشای سلول را لیز نموده و استرومای 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 . آنتی‌زن به دست آمده در غلظتی معادل ۰/۲ OD280=۰/۲ تنظیم و جهت تزریق مورد استفاده قرار گرفت . ۲. حیوان خرگوش جهت تزریق آنتی‌زن 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 آنتی‌بادی در آزمایش CH50 انجام گرفت (۱) .

سنجهش فعالیت آنتی‌بادی ضد گلوبول قرمز گوسفند در تست CH50:

جهت سنجهش فعالیت همولیتیک آنتی‌بادی‌های 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، (۱۰^۹ سلول در هر میلی لیتر) افزوده گردید. پس از نیم ساعت حساس کردن گلوبول‌های 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 Behring (Behring) که تماماً در رقت ۱:۲۰۰۰ استفاده شده اند، نشان دهنده عدم اختلاف معنی داری بین نتایج OD آنها می باشد. این نتایج نشان می دهد که به ویژه روش های ۱ و ۴ نتایج نزدیک تری از نظر تیتر با آنتی سرم تجاری مورد استفاده نشان می دهند (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 روش های مختلف نشان داده شده است.

روش تولید آمبوسپتور	مقادیر OD541 حاصل از آزمایش CH50				
	(ml) ۰/۰۵ بازبینی گلبول	(ml) ۰/۰۵ بازبینی گلبول	(ml) ۰/۰۵ بازبینی گلبول	(ml) ۰/۰۵ بازبینی گلبول	(ml) ۰/۰۵ بازبینی گلبول
(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 Behring	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 تیتر آنتی بادی در یک روند رو به افزایش است. البته روند افزایش تیتر در مقایسه با تزریق داخل وریدی کندتر است. با انجام تزریق سوم، تیتر آنتی بادی کاملاً بالا رفته و در الگویی منطبق با تزریق های مکرر از طریق داخل وریدی قرار می گیرد (جدول ۲).

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) ۰/۰۱۵	مقدار کمپلمان (ml) ۰/۰۲۵	مقدار کمپلمان (ml) ۰/۰۳۵	مقدار کمپلمان (ml) ۰/۰۴۵
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 (I.V) LPS 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 تیتر آنتی بادی های تشکیل شده نشان داد که جواب مناسب تر در شرایطی به

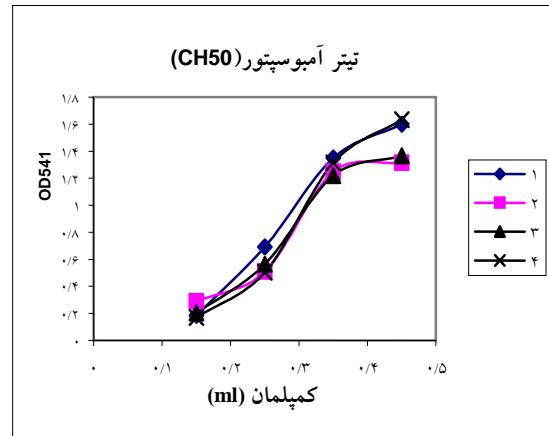
یک آنتی سرم تجاری (بهرینگ)، نشان داد هر ۴ روش ارایه شده در جدول ۲، تیتر قابل قبولی را جهت استفاده در روش CH50 دارا می باشند. در این رابطه از نظر تیتر آنتی سرم تولید شده، روش های ۱ و ۴، نزدیکی و مشابه بیشتری با آنتی سرم تجاری نشان می دهند ($p_4 = 0.927$) و (p₁ = 0.962). در این روش ها به ترتیب گلbul کامل گوسفند به همراه LPS و آنتی ژن های غشایی گلbul به دست آمده با روش سونیکاسیون در تحریک اینمی خرگوش استفاده شده اند. در این مطالعه اثر مایکروژنی و تقویت کننده اینمی مشاهده شده جهت LPS تأیید دیگری است بر مطالعات گسترده دیگری که توسط محققان مختلف انجام گرفته است.

در توجیه نتایج به دست آمده می توان گفت از آن جایی که تولید آنتی بادی بر علیه SRBC وابسته به سلول T می باشد (T-cell dependent)، از طرف دیگر آنتی ژن فورسمن واقع بر غشاء گلbul قرمز گوسفند ماهیت قندی دارد، لذا در تولید آنتی بادی بر علیه این سلول ها استفاده از آنتی ژن با ماهیت تغییر یافته (دنا توره) نیز می تواند تحریک کننده خوب سیستم اینمی باشد مانند آنتی ژن به دست آمده از غشاء گلbul قرمز گوسفند که در اثر حرارت 10^3 درجه سانتی گراد به دست آمده است. بنابراین از آن جایی که هدف نهایی، تولید آنتی بادی بر علیه شاخص های موجود بر غشاء سلولی SRBC می باشد، نیازی به تزریق گلbul کامل وجود نداشته و کافی است تنها غشاء سلول های مورد نظر تهیه و سپس با روش سونیکاسیون و یا اعمال حرارت، به آنتی ژن های محلول تجزیه گردند. در این صورت استفاده از روش I.V. با الگوی مناسب منجر به تشکیل تیتر مناسب آنتی بادی با ویژگی مورد نظر می شود.

نتیجه گیری

تولید آنتی بادی بر علیه گلbul های قرمز گوسفند (SRBC) با استفاده از روش های متفاوتی امکان پذیر می باشد. این مطالعه نشان می دهد که استفاده از آنتی ژن های غشایی یا مقاوم به حرارت SRBC که به ترتیب با استفاده از روش های سونیکاسیون و اعمال حرارت 10^3 درجه

در روش CH50 چنانچه یک منحنی بر حسب 41 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: منحنی های ۱ تا ۴ مربوط به ۴ نوع آمبوسپتور به دست آمده در این مطالعه (مطابق جدول ۲) می باشند. محور x مقدار کمپلمان (میلی لیتر) به کار رفته و محور y مقدادر OD541 حاصل از آزمایش CH50 می باشد.

بحث

سنجهش فعالیت سیستم کمپلمان از طریق سنجهش فعالیت همولیتیک ۵٪ گلbul قرمز (CH50)، روش قدیمی و مؤثر برای تشخیص کمپلمان در سرم یا سایر مایعات بدن می باشد. برای انجام این آزمایش لازم است از آنتی بادی بر علیه SRBC استفاده شود. لذا در مطالعه فوق اقدام به تولید این آنتی بادی با استفاده از روش های نسبتاً متفاوت و مقایسه آنها با یکدیگر گردید.

در سال های اخیر تأثیر سویه های حیوانی و نوع رژیم تغذیه ای در تولید آنتی بادی 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 نیوزلندي خرگوش که همگی تحت یک رژیم غذایی قرار داشتند استفاده شد. تحت شرایط ذکر شده، نوع آنتی ژن و الگوی تزریق، فاکتورهای تعیین کننده اصلی در پاسخ اینمی حیوان بر علیه SRBC به شمار می آیند. بررسی تیتر آنتی سرم های تولید شده و مقایسه آنها با

میل ترکیبی با آنتی سرم رفرانس (بهرینگ) قابل مقایسه هستند و هم خوانی نتایج در آزمایش CH50 قابل مشاهده می باشد.

تشکر و قدردانی

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

ساناتی گراد تهیه می شوند، در میان روش های دیگر استفاده شده دارای برخی مزایا بوده و جهت تحریک ایمنی حیوان خرگوش کاملاً مناسب می باشند. با به کارگیری این دو روش از آن جایی که سلول کامل استفاده نمی شود، خطرات مربوط به ایجاد عوارض ناشی از تزریق، مانند بروز شوک آنافیلاکتیک وجود نداشته و از طرفی آنتی سرم های به دست آمده در شرایط ذکر شده، از نظر تیتر نهایی و

References

- 1- Garvey JS, Cremer NE, Sussdorf DH. Preparation of antiseraums. 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 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.¹(PhD), Hamidpour-Zare L.²(MS)

¹ Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center

² Itanian 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