مجله بهداشت ایران سال پانزدهم شماره ۱ تا ۴ – ۱۳۶۵

تهیه آنتی‌هیومن در سرم بز و خرگوشهای ایرانی

*طاهره زندیه** و *عذرا کیاهاشمی* *

واژه‌های کلیدی : آنتی‌هیومن گلوبولین ، خرگوش ، بز ، سرم

چکیده

آنتی هیومن سرم در بز و خرگوشهای ایرانی بوسیله تزریق سرم O همراه‌با فرونداجوانت بعنوان پادگن بدست آمد ، عیاربالاتر از ۴۰۹۶ در خرگوش و ۲۰۵۶ در بز بدست آمد که ازنظر کیفیت و کمیت بررسی شد و نتایج بسیار خوبی بدست داد .

سرآغاز

نسبت کومبس‌یا واکنش آنتی‌گلوبولین بطورگسترده‌ای‌درسرولوژی گروههای خونی بکار می‌رود و توسط‌آن پادتن‌های ناکامل که بطور اولیه به‌سلولها چسبیده‌اند تشخیص داده می‌شود .

اصول و پایه این‌آزمایش اولین‌بار درسال ۱۹۰۸توسط مورشی شرح داده شد (۴) . ولی در سال ۱۹۴۵ توسط کومبزوهمکارانش (۱) بصورت متداول‌در ،طب بالینی‌مورداستفاده قرار گرفت ، که توانستند پادتنهای ناکامل‌گروه‌خونی رامشخص کنند . (کومبس‌غیرمستقیم) و همچنین برای تشخیص بیماری ، همولتیک نوزادان بکار برده شد (کومبس مستقیم) که حساسیت گلبولها را درداخل بدن بررسی کردندوبعداز پیدایش این‌تست درمان‌بوسیله انتقال خون در این نوزادان وسیله مطمئن شناخته شد .

پادتنهای گروههای خونی معمولا " گلبولین هستند که متعلق به‌یکی‌ا کلاسهای ایمونوگلوبولین می‌باشند . این‌ترکیبات گلبولین‌ها با هم متفاوت‌هستند که برای تشخیص آنتی‌بادی نوع ۷ و غیر ۷ آنرا باید استانداردکرد **فانلوگم** در سال ۱۹۵۰ (۵) ثابت

* سازمان انتقال خون ایران ، خیابان استاد نجات‌الهی ۱۳۸

کرد که آنتی‌هیومن گاهی‌اوقات باسلولهای حساس شده‌بوسیله آنتی آر + اچ پدیده‌پروزون نشان می‌دهد که این پدیده با آنتی‌بادی غیر ۷ کمتر دیده می‌شود

از بین حیوانات خرگوش‌بیشتر از سایر حیوانات برای‌تهیه آنتی‌گلبولین انسانی مورداستفاده قرار می‌گیرد هرچندکه دانس فورد و همکاران‌درسال ۱۹۵۷ (۲) از حیوانات دیگر مثل بز نیز بطورموفقیت‌آمیزی استفاده‌کردند بطورمعمول ازسرم انسانی گروه O ، گاما گلبولین رسوب داده شده بوسیله سولفات آمونیم ، یا فرکشنهای آن می‌توان بعنوان آنتی‌ژن استفاده‌کرد که ما از سرم انسانی گروه O همراه‌بااجوانت‌فر ویدکامل و یا ناکامل بعنوان ایمونوژن در حیواناتی مثل خرگوش و بز استفاده کردیم .

نمونه‌گیری و روش بررسی

۱ ــ حیوانات . خرگوشهای سفید باوزن بین ۴ ــ ۲ کیلوگرم و بز قهوه‌ای ۳۲ کیلوگرم بکار برده شد .

۲ ــ آنتی‌ژن (ایمونوژن) : سرم تازه‌گروه خونی O به‌حجم مساوی‌بااجوانت‌فروید کامل یا ناکامل مخلوط‌گردید که محلول نهائی‌باید ازنظر قوام شبیه خمیردندان و کاملا " آمولسیون باشد بطوری‌که اگر یک‌قطره از آن‌را در آب بریزیم پخش نشود .

۳ ــ روش ایمن‌کردن :

قبل از هرگونه تزریق مقداری خون از خرگوشها و بز برای تعیین گروه و تعیین خود پادتن گرفته شد . سپس یک سی‌سی مخلوط سرم O واجوانت فروید کامل در عضله پا تزریق شد که بعد از تزریق حیوان هیچگونه عکس‌العمل کلینیکی نشان نداد .

تزریق دوم چهارهفته بعد بوسیله یک سی‌سی سرم O بعلاوه اجوانت ناکامل در عضله پا انجام گرفت و چهارهفته بعد تزریق سوم مانند تزریق‌دوم انجام شد و تزریقات بعدی درصورت پائین‌آمدن تیتر بهمین‌صورت انجام می‌گیرد .

قبل از اولین تزریق‌بعنوان کنترل از خرگوشها خونگیری‌بعمل‌آمدهمچنین ۲۱روز بعد از اولین تزریق و ۱۲ روز بعد از تزریقات یادآور خونگیری بعمل آمد . خونها بعد از ۲۴ ساعت جداسازی شد و سرم آن جدا گردیده و بوسیله ۲۰ دقیقه حرارت ۷۰ درجه یا یکساعت ۶۳ درجه غیرفعال گردید . روش ایمونیزاسیون‌بز شبیه خرگوش‌است بااین‌تفاوت که مقدارآنتی‌ژن موردنیاز ۵ میلی‌لیتر در هر بار می‌باشد .

۴ ــ عیارسنجی :

سرم خرگوشها و بز بطورسریال باسرم فیزیولوژی رقیق‌گردید و با سلولهای مختلف بشرح زیر تست شد و نتیجه آگلوتیناسیون بعداز زمان‌لازم برای هرکدام بررسی گردید .

سلولهای o مثبت حساس شده (با آنتی‌دی بصورت‌رقیق‌نشده همچنین‌به‌نسبت $\frac{1}{2}$ و $\frac{1}{4}$ و $\frac{1}{8}$ رقیق شده در حرارت ۳۷ درجه و بمدت یکساعت) و سلول مثبت حساس نشده .

سلول o منفی‌سلول A_1B منفی و سلول o مثبت حساس شده با آنتی‌کر سرد یا کمپلمان .

۵ ــ روش فرمالیزاسیون :

یک‌روش دیگر نیز برای ایمن کردن بکار برده شد و باروش قبلی مقایسه گردید . برای اینکار ۲ خرگوش سفید با وزن بالاتر از ۲ کیلوگرم انتخاب گردید

دراین‌روش از سلولهای خود خرگوش بعنوان کاریر[1] استفاده شد تا ناخالصی نداشته باشد . از هر خرگوش ۱۰ سی‌سی خون گرفته شد و بعد از ۲۴ ساعت سرم آن جدا گردید و سلول ۴ بار با سرم فیزیولوژی شسته‌شد سپس ته‌نشین[2] سلولی‌آن بامحلول فرمالین سالین بعلاوه سود $\frac{1}{10}$ نرمال و ۶/۸ = پی اچ بمدت ۲۴ ساعت در۳۷ درجه نگهداری گردیده سپس ۴ بار با سرم‌فیزیولوژی‌بادور۱۰۰۰ شسته شد و دوباره‌مدت ۲۸روز بامحلول فرمالین‌سالین در ۳۷ درجه نگهداری‌شد بعد از۲۸روز ۴ باربا سرم فیزیولوژی با دور ۱۰۰۰ شسته شد و محلول ۴ % تهیه‌گردید و این سلولهای ۴ % با حجم مساوی با محلولی که به‌نسبت ۰/۱ میلی لیتر سرم و ۵ قطره آنتی D و ۵ قطره آنتی لوئیس تهیه شده مخلوط‌گردید و یکساعت درحرارت اطاق انکوبه شد و بعد ۴ بار با سرم فیزیولوژی شسته و تست کومبس روی آن انجام گرفت و درصورت‌مثبت بودن با آنتی‌هیومن بعنوان آنتی‌ژن مورداستفاده قرار می‌گیرد .

برای تزریق از رقت ۰/۲ محلول بدست آمده بالا استفاده شد و هفته‌ای ۲ بار بمدت یکماه و هربار یک سی‌سی در رگ گوش خرگوش تزریق گردید .

و ۱۰روزبعد از آخرین تزریق برای بررسی نتیجه خونگیری بعمل‌آمد .

1- Carrier 2- Pack

یـافتـــه‌ها

خوشبختانه قبل از اولین تزریق هیچگونه پادتن غیرطبیعی در خرگوشها و بز دیده نشد و جواب آگلوتیناسیون‌منفی بود بعد از اولین‌تزریق آنتی‌هیومن‌بمقدارناچیز در خرگوشهای‌حساس شده بوسیله O سرم دیده‌شد ولی بعد از تزریق بعدی‌تیترآنتی‌سرم بتدریج بالا رفت ولی در ۴ خرگوش با اینکه ازنظر وزن و نژاد یکسان بودند افزایش تیتر متفاوت بود و در بعضی ازآنها تا رقت $\frac{1}{4096}$ دیده‌شد که در جدول‌شماره یک مشخص شده در ۲ خرگوش دیگر که با سلولهای فرمالیز شده ایمونیز شده‌اند نیز تیترآنتی‌سرم افزایش یافت که جدول شماره دو مشاهده‌می‌شود مشابه‌خرگوشها در بز نیز بعداز تزریق افزایش آنتی‌سرم دیده شد ولی در تزریق اول عیار خیلی پائین‌بود و در تزریقات بعدی افزایش پیداکرد تا رقت $\frac{1}{2560}$ که در جدول‌شماره سه مشاهده می‌شودآنتی‌سرم تهیه شده به‌آزمایشگاه برای مصرف فرستاده شد . روی ۶۵۸ نمونه‌آزمایش شد که جواب قابل قبول داده شد .

گفتگـــو

همانطور که قبلا " اشاره‌شد آنتی‌گلوبولین تست یک روش سرم‌شناسی است‌که در تعیین گروههای خونی و تشخیص بیماری همولتیک نوزادان بکار می‌رود

برای تهیه آنتی‌هیومن سرم معمولا " از خرگوش و بز استفاده می‌شود . بهترین خرگوش نوع چین‌چیلاوقهوه‌ای است‌که‌درکارخانه بیوتست آلمان از این‌خرگوشها استفاده می‌کنند که بعد از تزریقات و بالارفتن عیار سرم آنها را می‌کشند و از سرم آنها جهت آنتی‌سرم استفاده می‌شود و گوشت آنها جهت تهیه غذا برای سگها و از پوست آن جهت تهیه لباس استفاده‌می‌شود و چون‌کارخانه‌بزرگی است‌امکان این نوع استفاده‌هاوجود دارد ولی درایران اگر از این نوع خرگوشها استفاده‌شود مقرون به‌صرفه نیست و بسیارگران تمام می‌شود . لذا از خرگوشهای سفید با وزن بین ۳ ــ ۲ کیلو استفاده شد خوشبختانه این خرگوشها خیلی خوب جواب دادند و پادتن غیرطبیعی نیز نداشتند .

البته در خرگوشها و بز مورداستفاده قبل‌از تزریق آگلوتیناسیون کاذب‌دیده شد که بعد از مخلوط‌کردن با حجم مساوی‌باسرم فیزیولوژی و ۲۰ دقیقه‌حرارت در ۷۰ درجه پادتن غیرطبیعی ازبین‌رفت‌واحتیاج به‌جذب نداشت و درصورتی‌که‌این‌پادتن حذف نشود

جدول شماره ۱ ــ نتیجه بدست آمده از آزمایش آنتی‌هیومن (سرم خرگوشهای ایمن‌شده بوسیله سرم o و اجووانت) .
a = عیار سرم رقیق شده که واکنش مثبت داده .
b = واکنش منفی

زمان افکوباسیون (دقیقه)	۱۲ روز پس از سومین تزریق	۱۲ روز پس از دومین تزریق	۲۱ روز پس از اولین تزریق	شماره خرگوشها	یافته‌های مورد استفاده
۵	۲۰۴۸ — ۴۰۹۶	۱۰۲۴ — ۴۰۹۶	( ) ۱۶۰ — ۴۰۰	۴	یافته‌های o^+ حساس شده با آنتی D بطور قوی
۵	۱۰۲۴ — ۴۰۹۶	۱۰۲۴ — ۴۰۹۶	۱۲۰ — ۴۰۰	۴	یافته‌های o^+ حساس شده با آنتی D بطور متوسط
۵	۳۲۰ — ۴۰۹۶	۱۲۸ — ۴۰۹۶	۸۰ — ۲۰۰	۴	یافته‌های o^+ حساس شده با آنتی D بطور ضعیف
۵	—	—	( ) —	۴	یافته‌های o^+ حساس شده
۱۵	—	—	—	۴	یافته‌های o^-
۱۵	—	—	—	۴	یافته‌های A_1B^-
۱۵	۳۲۰ — ۶۴۰	۲۰۰	۴۰ — ۸۰	۴	یافته‌های o^+ حساس شده با کیلمان

جدول شماره ۲- نتیجه بدست آمده از آزمایش آنتی‌هیومن (سرم خرگوشهای ایمن‌شده بوسیله یاخته‌های فرمالیزشده .

a = عیار سرم رقیق شده که واکنش مثبت داده

b = واکنش منفی

زمان انکوباسیون (دقیقه)	۲۰روزبعدازتزریق	شماره خرگوشها	یاخته‌ه‌ای‌مورداستفاده
۵	۱۲۸۰ (a)	۲	یاخته‌های O^+ حساس شده‌با آنتی D بطورقوی
۵	۱۲۸۰ – ۶۴۰	۲	یاخته‌های O^+ حساس شده‌باآنتی D بطورمتوسط
۵	۳۲۰ – ۱۶۰	۲	یاخته‌های O^+ حساس‌شده با آنتی D بطورضعیف
۵	– (b)	۲	یاخته‌های O^+ حساس‌نشد
۱۵	–	۲	یاخته‌های O^-
۱۵	–	۲	یاخته‌های A_1B^+
۱۵	۶۴۰	۲	یاخته‌های O^+ حساس‌شده‌با گمپلمان

جدول شماره ۳ ـ نتیجه بدست آمده از آزمایش آنتی‌هیومن (" بز ")

a = عیار سرم رقیق شده که واکنش مثبت داده

b = واکنش منفی

زمان انکوباسیون (دقیقه)	۱۲روزپس‌ازسومین تزریق	۱۳روزپس‌ازدومین تزریق	۲۱روزپس‌از تزریق	یاخته‌های مورد استفاده
۵	۲۵۶۰	۶۴۰	۶۴۰ (a)	یاخته‌های O^{++} حساس شده با آنتی D بطور قوی
۵	۲۵۶۰	۶۴۰	۱۶۰	یاخته‌های O^{+} حساس شده با آنتی D بطور متوسط
۵	۲۵۶۰	۸۰	ـ (b)	یاخته‌های O^{+} حساس شده با آنتی D بطور ضعیف
۵	ـ	ـ	ـ	یاخته‌های O^{+} حساس نشده
۱۵	ـ	ـ	ـ	یاخته‌های O^{-}
۱۵	ـ	ـ	ـ	یاخته‌های A_1B^{-}
۱۵	۸۰	۴۰	ـ	یاخته‌های O^{+} حساس شده با کمپلان

می‌توان باعمل جذب با گلبولهای قرمز پادتن غیرطبعی را از بین برد . ازطرف دیگر مولیسون در سال ۱۹۷۲ (۳) نشان داد که در بعضی از حیوانات آنتی‌گلوبولین قوی باعیار بالا بدست می‌دهد ولی پادتن خودی با عیار پائین نیز ایجاد می‌شودکه با رقیق کردن سرم آنتی‌بادی خودی از بین می‌رود بهرحال راههای‌مختلفی برای از بین بردن پادتن‌های غیرطبیعی وجود دارد که در حیواناتی‌که ما استفاده‌کردیم حرارت ۷۰ درجه‌ورقیق کردن توانست کلیه ناخالصیها را از بین ببرد .

معمولا برای‌تهیه آنتی‌گلوبولین باطیف واکنش وسیع گاما گلوبولین‌را بامحلول سولفات آمونیوم رسوب می‌دهند یا از سرم کامل گروه O استفاده می‌شود و برای حـــذف پادتن‌های ناخالص می‌توان‌از گلبولهای خود حیوان بعنوان‌حامل استفاده کرد که دراین حال پادتن‌را روی‌گلبولهای‌خودحیوان‌می‌چسبانند و تزریق‌می‌کنندکه‌دراین‌حال ناخالصی کمتر دیده می‌شود . ما از ۲ روش استفاده کردیم یکی روش تهیه پادتن بوسیله سرم O و دیگر روش یاخته‌های خود حیوان بعد ازفرمالیز کردن پادتن و تزریق در رگ حیوان‌که در هردوحال جواب خوب بود ولی روش اول را ترجیح می‌دهیم زیرا اولا ؛ عیار آنتی‌سرم بالاتر بود و ثالثا " راحت‌تر و سهل‌تراست . همچنین در خرگوش‌وبز نیز مقایسه بعمل آمد هردونتیجه خوب است ولی بز برای کارهای‌جاری‌بهتراست‌زیراقوی‌تراست وعمر طولانی‌تر دارد و سرم زیادی می‌توان از آن بدست آوردو حتی می‌توان‌روش پلاسمافرز را انجام‌داد و گویچه‌های قرمز حیوان را به‌او برگرداند و سرم بیشتری بدست آورد کاری که کارخانه بیوتست آلمان برای تهیه سرم در حیوانات انجام می‌داد . آنتی‌هیومن بدست آمده را می‌توان در ۲۰ ــ درجه و ۴ درجه نگهداری کرد که برای افزایش طول عمر به‌آن گلیسین اضافه کردیم و در درجه‌حرارت ۴ درجه و ۲۰ ــ درجه بدون گلیسین و با گلیسین بمدت ۴ ماه نگهداری کردیم که بهترین جواب در ۴ ــ درجه و ۲۰ ــ درجه با گلیسین بود که نشان می‌دهد با افزودن گلیسین مدت طولانی‌می‌توان آنرا نگهداری کرد .

سپـاسگـــزاری

در خاتمه نویسندگان این‌گزارش صمیمانه ازبرادر احمد متمنی که درمقام معاونت سازمان انتقال خون ایران‌همه‌گونه مساعدت را درفراهم آوردن امکانات‌انجام این‌مطالعه مبذول داشتند سپاسگزاری می‌نمایند

کتابنامه

1. Coombs, R.R.A; Mourant, A.E. and Race, R.A.A; New Test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. Brit, J.Exp. Path; 26; 255, 1945.
2. Dunsford, 1. and Bowley, C.C; the production of anti-human Globulin (coombs Reagent) im goats, Y. clin path; 10: 29, 1957.
3. Mollison, P.L; Blood Transfusion in clinical Medicine. 5th Ed; Black well, London, P. 413, 1972.
4. More Schi, C., Neue Tatschen uben die Blut Korperchen agglutination. Zbi.Bakt.(IAbt, Orig) 46: 49, 1908.
5. Vanloghem, J.J.; Kresner, M.; Coombs. R.R.A. and Roobents, G.F.; Observations on a prozen phenomenon Encauntened inusing the Anti-globulin sensitization Test, Lancet, II: 729, 1950.