مقاله پژوهشی

بررسی نقش آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در تشخیص عامل مولد بیماری کالا آزار

عزت نوری‌زاده[1*]

تاریخ دریافت ۱۴۰۰/۱۱/۰۳ تاریخ پذیرش ۱۴۰۱/۰۵/۱۹

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: باوجود شناخت انگل عامل لیشمانیوز در جهان، متأسفانه این بیماری همچنان در بسیاری از کشورهای جهان به‌عنوان یک بیماری بومی محسوب می‌شود و حتی با پیش‌بینی‌های انجام‌شده در حال گسترش است. این روند در ایران نیز مشاهده می‌شود. با توجه به این مهم، هدف از این مطالعه بررسی تأثیر آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در تشخیص بیماری کالاآزار که نوع احشائی بیماری لشمانیوز است، است.

مواد و روش کار: اشکال پروماستیگوت لیشمانیا اینفانتوم در محیط کشت اختصاصی تهیه شد و سپس موش‌های BALB/c با این فرم‌ها ایمن‌سازی شدند، موشی که بهترین پاسخ را داد انتخاب شد و سلول‌های طحال آن با سلول‌های میلومای SP2/o ادغام شدند. پس از تشکیل سلول‌های هیبریدوما، سلول‌های تولیدکننده آنتی‌بادی اختصاصی به‌صورت تک کلون تهیه شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه پنج کلون 3E6 FIII3، 3E6 FIII4، 2C4 FII5،3E6 FIII4، 2C4 FII2،2C4 FII3،2C4 FII5 و 2C4 FII2 که بیشترین OD را داشتند جهت بررسی انتخاب شدند.

بحث و نتیجه‌گیری: اگرچه این آنتی‌بادی‌ها قادر به تمایز بین گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا نیستند، اما به نظر می‌رسد می‌توان از آن‌ها برای بررسی بیشتر آنتی‌ژن‌های انگل لیشمانیا و همچنین برای تشخیص لیشمانیوز استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، تشخیص لیشمانیوز، بیماری کالا آزار

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و سوم، شماره اول، ص ۴۴-۳۷، فروردین ۱۴۰۱

آدرس مکاتبه: اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه میکروب شناسی، تلفن: ۰۴۵۳۱۵۰۵۱۷۷

Email: nourizade@yahoo.com

مقدمه

لیشمانیوز، یک عفونت تک‌یاخته‌ای درون‌سلولی مزمن و پایدار ناشی از بسیاری از گونه‌های مختلف در جنس لیشمانیا، یک بیماری ناآشنا برای اکثر کشورهای جهان است. تظاهرات بالینی ممکن است شامل لیشمانیوز احشایی بدون علامت و علامت‌دار (به‌اصطلاح کالاآزار) و همچنین بیماری پوستی یا مخاطی باشد (۱).

اگرچه کالاآزار (بیماری ناشی از لیشمانیا اینفنتوم) در برخی از کشورهای جهان بومی است، اما سایر دلایل نگران‌کننده‌ای وجود دارد که بدون علامت عفونت ممکن است به کشورهای دیگر نیز سرایت کند (۲).

تغییرات آب و هوایی، تغییرات زیست‌محیطی، شناسایی ناقلان و مخازن مناسب، جمعیت پرتحرک گروه‌های مختلف، استفاده گسترده از داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی و پیوند اعضا از عوامل بالقوه برای گسترش محدوده جغرافیایی ناقلین و انتقال لیشمانیوزها در آینده می‌باشند (۲).

اگرچه در سال‌های اخیر شناسایی گونه‌های لیشمانیا با استفاده از روش‌های مولکولی مختلف انجام می‌شود، اما این روش‌ها نمی‌توانند پاسخگوی نیاز برنامه‌های بهداشتی باشند زیرا اولاً مقرون‌به‌صرفه نیستند ثانیاً به تجهیزات ویژه احتیاج دارند و کاربرد چندانی ندارند. به نظر می‌رسد که استفاده از استراتژی‌های کاربردی دیگر ازجمله مونوکلونال آنتی‌بادی برای تشخیص انگل لیشمانیوز مناسب‌تر باشد. لیشمانیوز احشایی برای اولین بار توسط هندی‌ها به کالاآزار به معنی بیماری تب سیاه بیان شده است. لیشمانیوز یکی از بیماری‌های مهم بهداشتی در جهان و ایران است (۵-۳). طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت سالانه نیم میلیون مورد جدید بیماری در جهان روی می‌دهد. اهمیت این بیماری ازنظر سازمان جهانی بهداشت به دلیل مرگ ۱۰۰درصد بیماران بدون درمان و

[1] استادیار گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران (نویسنده مسئول)

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-07]

[DOI: 10.52547/umj.33.1.37]

مرگ‌ومیر قابل‌توجه در بیماران با اختلال سیستم ایمنی حتی با درمان و همچنین ابتلا بیشتر کودکان است (۵-۳). لیشمانیوز احشایی در ایران از نوع مدیترانه‌ای است (۵). مخزن مهم این بیماری شغال و سگ است ولی در منطقه مشکین‌شهر جوندگان نیز به‌عنوان مخزن گزارش شده است. پشه‌های خاکی از جنس فلبوتوموس ناقل اصلی لیشمانیوز احشایی در مناطق اندمیک می‌باشند (۵). لیشمانیوز احشایی در ایران غالباً در اطفال زیر ۱۰ سال گزارش شده است (۵). بیماری کالاآزار بیشتر در عشایر چادرنشین دیده می‌شود زیرا آنان تماس بیشتری با سگ‌های آلوده و پشه‌های خاکی به‌عنوان ناقل را دارا هستند (۵) به همین دلیل کانون‌های اصلی لیشمانیوز احشایی در ایران شامل دامنه‌های زاگرس و سبلان در مشکین‌شهر و نیز در مغان بوده و بیماری غالباً در بخش روستاییان و عشایر ساکن آن مناطق مشاهده می‌شود (۵).

کالا آزار را می‌توان با استفاده از روش‌های مختلفی ازجمله: فن‌های مستقیم بررسی انگلی، روش‌های ایمونولوژیکی و مولکولی تشخیص داد. با توجه به اتصال اختصاصی به آنتی‌ژن، امروزه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به‌عنوان ابزار تحقیقاتی و عوامل تشخیصی از اهمیت خاصی برخوردار هستند. تا به امروز، هیچ واکسنی علیه لیشمانیوز ساخته نشده و اقدامات انجام‌شده برای کاهش بیماری به شیمی‌درمانی متکی هستند. بااین‌حال، روش‌های کنترل تا حد زیادی محدود به تخریب مخازن حیوانات آلوده، تحت کنترل قرار گرفتن انسان‌ها و حیوانات آلوده و مدیریت جمعیت پشه‌های خاکی ناقل است (۵-۳).

لیشمانیوز در ۹۸ کشور جهان که ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر عفونت هستند بومی است (۵-۳). تأثیر این بیماری عمدتاً بر جمعیت فقیر در سطح جهان است. سه شکل لیشمانیوز، شامل احشایی، جلدی و مخاطی وجود دارد. در بین این بیماری‌ها لیشمانیوز احشایی که سبب کالا آزار می‌شود، شایع‌ترین و خطرناک‌ترین است زیرا در صورت عدم درمان به مرگ منجر می‌شود (۳، ۴).

طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی، لیشمانیوز یکی از بیماری‌های مهمی است که مشکل جدی برای سلامتی جهان است. در سال ۱۹۹۹ بیش از ۹۰ درصد لیشمانیوز احشایی در کشورهای هندوستان، سودان و برزیل بوده است. در بسیاری از نقاط جهان، به‌ویژه در چین، آسیای میانه، خاورمیانه، قفقاز، مدیترانه و آمریکای جنوبی، یک بیماری خطرناک به شمار می‌رود (۶، ۷). جدول ۱ شیوع بیماری کالا آزار را در جهان در سال‌های ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۶ میلادی نشان می‌دهد.

جدول (۱). شیوع بیماری کالا آزار در جهان[1]

کشورها	۲۰۱۶	۲۰۱۵	۲۰۱۴	۲۰۱۳	۲۰۱۲
کلمبیا	۳۷	۲۱	۳۱	۱۳	۹
اتیوپی	۱۵۹۳	۱۹۹۰	۲۷۰۵	۱۷۳۲	۲۳۸۱
کنیا	۶۹۲	۸۹۴	۸۸۰	۱۸۱	۴۵۷
سومالی	۷۸۱	۱۰۳۱	۱۰۴۳	۶۷۳	۳۹۴
سودان	۳۸۱۰	۲۸۲۹	۳۴۱۵	۲۳۸۹	۵۱۵۳

با توجه به جدول ۱، بیماری لیشمانیوز احشایی در جهان در کشورهای کلمبیا، اتیوپی، کنیا، سومالی و سودان در سال‌های ۲۰۱۲ میلادی تا ۲۰۱۶ در حال افزایش است (۷، ۸).

لیشمانیا اینفانتوم مهم‌ترین عامل بیماری کالا آزار در ایران بوده و در مناطق مختلف ایران از سگ، روباه، شغال و گرگ جدا شده است. لیشما نیوز احشایی که در تمام نقاط ایران وجود داشته است، اما مناطق آندمیک مشخصی نیز مانند کلیبر، اهر در شمال غرب ایران و در آذربایجان شرقی وجود دارند (۷، ۸).

روش‌های مختلف تشخیص کالا آزار وجود دارد، از قبیل روش‌های مولکولی تشخیص (PCR)، روش سنجش توسط الایزا، روش تشخیص (DNA) کینتوپلاست و نظایر این‌ها اما اکثر این روش‌های تشخیص برای گونه‌های لیشمانیا در حال حاضر فقط در آزمایشگاه‌های تخصصی موجود است و در مناطق محروم به علت عدم وجود امکانات و تجهیزات لازم قابل‌اجرا نیست و پرهزینه بوده و علاوه بر این به علت وجود پلی مرفیسم ژنتیکی شدید در گونه‌های مختلف لیشمانیا این روش‌ها قابلیت کاربرد در آزمایشگاه‌ها را ندارند و عملاً جای خود را در آزمایشگاه‌های معمولی باز نکرده‌اند. در صورتیکه استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلنال برای استفاده در کیت‌های آزمایشگاهی می‌تواند به‌راحتی در آزمایشگاه‌های معمولی

[1] Reference: The World Health Organization (WHO), 2016

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-07]

[DOI: 10.52547/umj.33.1.37]

قابل انجام باشد. هدف از این مطالعه بررسی نقش آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در تشخیص عامل مولد بیماری کالا آزار است.

مواد و روش کار

تهیه سویه‌های لیشمانیااینفنتوم و کشت آن‌ها: سوش استاندارد لیشمانیا اینفنتوم *(MHOM/IR/04/IPI-UN10)* جداشده از یک بیمار از بخش ایمونولوژی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. این تحقیق مطابق با کد اخلاق *(IR.UMA.REC.1400.006)* دانشگاه محقق اردبیلی انجام پذیرفت. فرم پروماستیگوت سوش‌های مذکور نخست از لوله‌های کرایو به محیط کشت دوفازی *(Novy-Ma.cNeal-Nicolle) NNN* و سپس به محیط کشت کامل منتقل‌شده و هرروز ازنظر آلودگی و رشد کنترل شدند سپس از پروماستیگوت‌های کشت داده‌شده برای تهیه آنتی‌ژن استفاده شد. در حدود $۱۰^{۹} \times ۳$ انگل حاصل شد. سپس آنتی‌بادی منوکلونال علیه آنتی‌ژن‌های لیشمانیا اینفنتوم طبق رفرنس‌های (۹-۱۳) تهیه شد.

آماده‌سازی آنتی‌ژن از فرم پروماستیگوت لیشمانیا اینفنتوم: برای تهیه آنتی‌ژن از روش Freeze - thaw استفاده شد. توسط این روش انگل‌ها کشته می‌شوند و تمام محتوی سلولی آن‌ها شکسته شده و از سلول خارج می‌شوند که تمام آنتی‌ژن‌های انگلی به‌صورت سوسپانسیون درآمده و خصوصیات پاتوژنیک خود را از دست می‌دهند. این روش بر اساس فریز کردن و دوباره گرم کردن سریع سوسپانسیون سلولی انگلی انجام گرفت.

ایمن‌سازی موش‌ها: ۱۲ موش تحت بررسی قرار گرفتند. موش‌های Balb/c ۵ تا ۶ هفته‌ای با تزریق داخل صفاقی آنتی‌ژن به مقدار ۱۰۶× ۳۰ انگل به همراه یاور فروند ۱ کامل در ایمنی‌زایی اول، یاور فروند ناقص در ایمنی‌زایی دوم و سوم هرکدام به فواصل دو هفته ایمن‌سازی شدند.

سپس آنتی‌ژن بدون یاور به‌عنوان بوستر نهایی سه روز قبل از فیوژن داخل وریدی تزریق گردید.

عیار آنتی‌بادی در سرم موش‌های ایمن شده با روش الایزا تعیین شد و موشی که عیار آنتی‌بادی در سرم اش از همه بیشتر بود جهت ادغام سلولی (Fusion) انتخاب گردید.

جداسازی طحال موش ایمن شده و استخراج سلول‌های آن: طحال موش ایمن شده بعد از عمل بی‌هوشی کامل با رعایت شرایط استریل در زیر هود برداشته شد. توسط سرنگ ۲۰ میلی‌لیتری حاوی محیط RPMI1640 و با سر سوزن ۲۵، اقدام به استخراج محتویات سلولی طحال شد.

این عمل تا تخلیه کامل سلول‌های طحال تکرار شد. جهت از بین بردن اریتروسیت‌ها بر روی سوسپانسیون حاصله ۵ml کلرید آمونیوم اضافه شد سپس سانتریفیوژ گردید (۱۰mn، ۲۰۰×g) و سلول‌های حاصل سه بار توسط محیط RPMI1640 شستشو داده شدند.

ادغام سلولی: سلول‌های لنفوسیتی جداسازی شده از طحال موش ایمن شده و سلول‌های Sp2/0 به نسبت ۱۰ به ۱ در مجاورت پلی‌اتیلن گلایکول (PEG) با هم ادغام شدند و سپس در محیط کشت کامل حاوی HAT (هیپوگزانتین، آمینوپترین و تیمیدین) در مجاورت ۵ درصد CO_2 و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. پس از یک هفته محیط HT (هیپوگزانتین و تیمیدین) جایگزین محیط قبلی شد و به‌تدریج وجود سلول‌های هیبریدوما و تشکیل کلون‌های آن‌ها در زیر میکروسکوپ معکوس ردیابی شدند.

انجام Limiting dilution برای ردیابی تک کلون‌های هیبریدوما: هیبریدوماها پس از تکثیر برای جداسازی تک کلون‌های تولیدکننده آنتی‌بادی آماده‌سازی شدند. کلون‌های مثبت ازنظر مقدار تیتر آنتی‌بادی بر اساس **OD** انتخاب‌شده و پس از تهیه سوسپانسیون یکنواخت با روش Limiting dilution رقت داده شدند به‌طوری‌که در هر چاهک یک یا نیم کلون قرار گرفت و در پلیت‌های حاوی محیط کشت کامل با بستر Feeder layer و یا مکمل‌هایی مانند فاکتور رشد OPI کشت داده شدند. با این روش، تک کلون‌های تولیدکننده آنتی‌بادی مونوکلنال مجزا گردیدند. سپس سلول‌های هیبریدومای حاصل تکثیر شدند، تعدادی از سلول‌های این مرحله در محیط مخصوص انجماد سوسپانسه گردید و سپس در ازت مایع جهت استفاده در آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند.

یافته‌ها

نتایج کشت سلول‌های انگل لیشمانیا اینفنتوم: انگل‌های لیشمانیا اینفنتوم به محیط کشت NNN و سپس به محیط کامل منتقل شدند. و در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله ایستا شمارش شدند. در حدود $۱۰^{۹} \times ۳$ انگل حاصل شد. انگل‌های به‌دست‌آمده در محیط کشت اختصاصی در تانک ازت نگهداری شدند.

نتایج کلنینگ سلول‌های هیبریدوما: سلول‌های مثبت هیبرید کهOD بالایی را داشتند انتخاب شدند، این هیبریدها عبارت‌اند از:

الف- از فیوژن اول، هیبریدهای4D6 FI ;، 4E FI حاصل شدند.

ب- از فیوژن دوم هیبریدهای 5D2 FII، 6E9 FII، 2C4 FII حاصل شدند.

ج- از فیوژن سوم هیبریدهای 5F5 FIII، 3E6 FIII، 3G7 FIII حاصل شدند.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-07]

[DOI: 10.52547/umj.33.1.37]

این سلول‌ها هیبریدهایی بودند که OD[1] بالایی را در مقایسه با سایر هیبریدها از خود نشان دادند. در بین این سلول‌ها که OD بالاتری داشتند، دو هیبرید در مقایسه با آنان که بالاترین OD را از خود نشان داد (3E6 FIII، 2C4 FII)، جهت تکثیر انتخاب شدند. از فیوژن دوم هیبرید 2C4 FII و از فیوژن سوم هیبرید E6 FIII۳ جهت انجام آزمایش Limiting dilution برداشته شدند.

مقداری از هیبریدهای حاصل در محیط مخصوص انجماد سوسپانسه شده و در ازت مایع جهت انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند. جدول: ۲ هیبریدهای مثبت حاصل از سه فیوژن که بالاترین OD را دارند نشان می‌دهد.

جدول (۲): هیبریدهای مثبت حاصل از سه فیوژن که بالاترین OD را دارند

فیوژن اول (FI)		فیوژن دوم (FII)		فیوژن سوم (FIII)	
نام هیبرید	OD_{45}	نام هیبرید	OD_{45}	نام هیبرید	OD_{45}
2B4 FI	۰/۶۱۹	5D2 FII	۰/۸۶۵	5F5 FIII	۰/۹۱۰
4D6 FI	۰/۹۴۵	6E9 FII	۰/۹۳۸	3E6 FIII	۱/۶۰۱
4E1 FI	۰/۸۷۸	2C4 FII	۱/۵۶۹	4B2 FIII	۰/۷۶۰
3C4 FI	۰/۷۶۵	8F6 FII	۰/۷۶۵	3G7 FIII	۱/۵۵۸

OD: optical density, FI: فیوژن اول ,FII: فیوژن دوم ,FIII: فیوژن سوم

(OD_{450}) Absorbance of samples at 450 nm

ادغام سلول‌های لنفوسیت حاصل از طحال موش‌های ایمن شده با سلول‌های میلوما: Fusion (F):

کلون کردن سلول‌های هیبریدوما با روش Limiting dilution برای ردیابی تک کلون‌های هیبریدوما: هیبریدوماها پس از تکثیر برای جداسازی تک کلون‌های تولیدکننده آنتی‌بادی آماده‌سازی شدند. بدین منظور کلون‌های مثبت از فیوژن‌های دوم و سوم انتخاب شدند و سپس با روش Limiting dilution رقت داده شدند به‌طوری‌که در هر چاهک یک یا نیم کلون قرار گرفت و در پلیت‌های حاوی محیط کشت با بستر Feeder layer و مکمل‌هایی مانند فاکتور رشد شبیه انسولین، کشت داده شدند. با این روش مونوکلن‌های تولیدکننده آنتی‌بادی مونوکلنال مجزا شدند. جدول ۳ نتایج تکثیر هیبریدوماها جهت جداسازی مونوکلن‌های تولیدکننده آنتی‌بادی توسط **Limiting dilution** را نشان می‌دهد.

جدول (۳): نتایج انجام Limiting dilution جهت ردیابی تک کلون‌های هیبریدوما

Hybrid (3E6 FIII)		**Hybrid(2C4 FII)**	
Monoclones	**OD**	**Monoclones**	**OD**
3E6 FIII6	0.731	2C4 FII7	0.839
3E6 FIII3	**1.510**	2C4 FII5	**1.629**
3E6 FIII8	0.580	2C4 FII3	**1.470**
3E6 FIII5	0.969	2C4 FII4	0.982
3E6 FIII2	0.817	2C4 FII2	**1.699**
3E6 FIII4	**1.619**	2C4 FII8	0.999

OD: optical density, FIII: فیوژن سوم ,FII: فیوژن دوم

(OD450) Absorbance of samples at 450 nm

Fusion: Lymphocyte cells from spleen of immunized mice and myeloma cells were fused.

[1] Optical Density

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-07]

[DOI: 10.52547/umj.33.1.37]

با توجه به نتایج جدول ۳، مونوکلن‌های (3E6 FIII3، 3E6 FIII4، 2C4 FII2،2C4 FII3،2C4 FII5) میزان تیتر آنتی‌بادی (OD) بیشتر از یک دارند. بنابراین از بین این سلول‌ها، مونوکلن‌های 3E6 FIII4، 2C4 FII5 و 2C4 FII2 که در مقایسه با پنج مونوکلن دیگر بیشترین OD را داشتند جهت انجام آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند. جدول ۴ مونوکلن‌های تولیدکننده آنتی‌بادی بیشتر را نشان می‌دهد.

جدول (۴): مونوکلن‌های تولیدکننده آنتی‌بادی بیشتر

Monoclones	OD
3E6 FIII3	1.510
2C4 FII5	1.629
2C4 FII3	1.470
2C4 FII4	0.982
2C4 FII2	1.699
3E6 FIII4	1.619

OD: optical density, FIII: فیوژن سوم ,FII: فیوژن دوم

(OD450) Absorbance of samples at 450 nm

Fusion: Lymphocyte cells from spleen of immunized mice and myeloma cells were fused

بحث و نتیجه‌گیری

تولید آزمایشگاهی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال موش (mAbs) برای اولین بار در سال ۱۹۷۵ توسط کوهلر و میلشتاین توصیف شد، و از این طریق عمل بالینی و تحقیقات زیست پزشکی را متحول کرد (۱۲).

از آن زمان، mAbs مهندسی شده‌اند و خطوط سلولی پایدار قادر به ترشح ایمونوگلوبولین‌های خاص در برابر آنتی‌ژن هدف موردنظر به دست آمده‌اند (۱۳). در این تحقیق درمجموع سه فیوژن سلولی انجام پذیرفت. سلول‌های مثبت هیبرید کهOD بالایی را داشتند انتخاب شدند که از فیوژن اول، هیبریدهای4D6 FI ،. 4E FI، از فیوژن دوم هیبریدهای 5D2 FII، 6E9 FII، 2C4 FII و از فیوژن سوم هیبریدهای 5F5 FIII، 3E6 FIII، 3G7 FIII حاصل شدند. در بین این سلول‌ها دو هیبرید که بالاترین OD را داشتند (2C4 FII ،3E6 FIII)، جهت تکثیر و انجام آزمایش Limiting dilution انتخاب شدند. در زمینه انجام Limiting dilution درمجموع ۱۲ هیبرید موردقبول بودند که در میان این‌ها چهار کلن OD بیشتر از ۱،۵ داشتند. در مقایسه با کار سایر محققین همچون jaffe (۱۴) که با انجام فیوژن تنها چهار کلن اختصاصی علیه لیشمانیا ماژور پیدا کرده‌اند. اما در این مطالعه ما ۱۲ کلن مثبت برعلیه لیشمانیا اینفنتوم به دست آوردیم. این اختلاف را می‌توان به دلیل استفاده گسترده از فاکتورهای مختلف رشد سلول دانست که ممکن است در مطالعه آنان به این گستردگی صورت نگرفته است.

ژافه و همکارانشان به ترتیب مونوکلونال آنتی‌بادی بر علیه لیشمانیا دونووانی ساختند که با گونه‌های دیگر نیز واکنش نشان می‌داد (۱۵). در سال ۲۰۰۴ میلادی Froes و همکارانش مونوکلونال آنتی‌بادی بر علیه آماستیگوت‌های لیشمانیا شاگاسی تهیه کردند (۱۶). در بررسی حاضر نیز ما موفق شدیم مونوکلونال آنتی‌بادی‌ها بر علیه پروماستیگوت لیشمانیا اینفنتوم تهیه کنیم. در این زمینه نتایج ما با نتایج مطالعات آنان که تولید مونوکلونال آنتی‌بادی بر علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا است مطابقت دارد. بین نتایج ما و داده‌های گزارش شده توسط برخی از محققین درخصوص ایزوتایپ، مونوکلونال آنتی‌بادی‌ها اختلاف وجود دارد. این عدم تطابق ممکن است مربوط به تفاوت سویه‌های آنان و نوع آنتی‌ژن مورد استفاده دراین بررسی‌ها باشد.

به نظر می‌رسد وجود عوامل تعیین‌کننده آنتی‌ژنی خاص گونه بر روی لیشمانیا، که توسط سرم‌های ایمنی به‌واسطه منو کلونال آنتی‌بادی شناسایی می‌شوند، مبنایی برای توسعه این روش برای تمایز گونه‌های مختلف لیشمانیا خواهد بود.

فناوری‌های هیبریدوما را می‌توان برای توسعه قابل‌اعتماد mAbsو تولید بعدی آن‌ها در سلول‌های مختلف استفاده کرد.

اصولاً فناوری‌های هیبریدوما به‌طور گسترده در زمینه‌های مختلف مانند کاربردهای تشخیص، پایش بیماری و شناسایی نشانگرهای پیش‌آگهی به کار گرفته شده است (۱۷-۱۹). به نظر می‌رسد این آنتی‌بادی‌ها نسبت به سویه ایرانی لیشمانیا اینفنتوم

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-07]

[DOI: 10.52547/umj.33.1.37]

واکنش‌پذیری مناسبی دارند و می‌توانند در آزمایش‌هایELISA ، ایمونوفلورسانس و فلوسایتومتری برای تحقیق و تشخیص مورداستفاده قرار گیرند.

فن‌های بیوشیمیایی برای تایپینگ لیشمانیا، مانند ایزوآنزیم‌ها، همسانی توالی حلقه‌های DNA کینتوپلاست و PCR برای طبقه‌بندی و تشخیص انگل‌ها به‌کاربرده می‌شوند. بااین‌حال، این روش‌ها کافی نیستند. به‌طورکلی نیاز به کشت مقادیر زیادی از انگل‌ها در شرایط آزمایشگاهی دارد، که ممکن است به دست آوردن آن دشوار باشد، به‌ویژه برای لیشمانیا اینفنتوم که در محیط‌های کشت معمولی دیر رشد می‌کنند (۲۰،۲۱).

مونوکلونال آنتی‌بادی‌ها ازنظر کمی و کیفی به دلیل ویژگی بالا، هزینه کم و قابلیت حمل در مقایسه با روش‌های مرسوم، جایگزین امیدوارکننده‌ای برای تشخیص لیشمانیوز هستند. این نتایج نشان داد که این روش ممکن است برای تعیین وجود آماستیگوت‌های لیشمانیا اینفنتوم در اندام‌های حیوانات آزمایشگاهی برای مطالعات پاتوژنز و ایمنی، مفید باشد و این یک ابزار امیدوارکننده برای توسعه یک روش تشخیصی، مبتنی بر تشخیص آنتی‌ژن، در انسان و سگ مبتلا به کالا آزار است. بهبود مدیریت بالینی موارد مشکوک کالا آزار، امکان شروع زودهنگام درمان خاص برای پیشگیری آن فراهم می‌شود.

پیشنهادها

ازآنجایی‌که انسان و جوندگان میزبان اصلی گونه‌های مختلف لیشمانیا هستند و انگل‌ها در داخل ماکروفاژها به‌صورت آماستیگوت معرفی می‌شوند، به نظر می‌رسد تهیه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه انگل لیشمانیا اینفنتوم می‌تواند عامل مؤثر در فرآیند تشخیص کالا آزار باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی و نیز از همکاری مسئولین بخش ایمونولوژی انستیتو پاستور تهران سپاسگزاریم.

References

1. Stahlman S, Williams VF, Taubman SB. Incident diagnoses of leishmaniasis, active and reserve components, U.S. Armed Forces, 2001-2016. MSMR 2017;24(2):2–7.
2. Mody RM, Lakhal-Naouar I, Sherwood JE, Koles NL, Shaw D, Bigley DP, et al. Asymptomatic Visceral Leishmania infantum Infection in US Soldiers Deployed to Iraq. Clinical Infectious Diseases 2019;68(12):2036–44.
3. Assefa A. Leishmaniasis in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis of prevalence in animals and humans. Heliyon 2018;4(8):723-31.
4. Abrham A, Zewdu S. A Review on Canine Leishmaniasis; Etiology, Clinical sign, pathogenesis, treatment and control methods. Glob Veterinaria 2016;17(4):343-52.
5. Mohebali M, Javadian E, Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Hajjaran H, Abaei MR. Characterization of Leishmania infection in rodents from endemic areas of the Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J 2004;10(4-5):591-9.
6. Ibarra-Meneses AV, Moreno J, Carrillo E. New Strategies and Biomarkers for the Control of Visceral Leishmaniasis. Trends in Parasitology 2020 Jan;36(1):29–38.
7. Ribeiro RR, Michalick MSM, da Silva ME, Dos Santos CCP, Frézard FJG, da Silva SM. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. Biomed Res Int. 2018;2018:3296893.
8. Macconkey S.E.,Lopez A.,Shaw D.,Calder J. leishmanial polyarthritis in a dog. Canine Vet J 2002;43:607-60.
9. Tomita M, Tsumoto K. Hybridoma technologies for antibody production. Immunotherapy 2011;3:371–80.
10. Pasqualini R, Arap W: Hybridoma-free generation ofmonoclonal antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101 257–9.
11. Moritaa M, Sugiharaa H, Tokunakaa K, Tomuraa A, Saigaa K, Satoa T, Imamurab Y, Hayashic T. Preparation and partial characterization of monoclonal antibodies specific for the nascent non-

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-07]

[DOI: 10.52547/umj.33.1.37]

triple helical form of the type IV collagen alpha 1 chain. Biochem Biophys Rep 2017;9:128–32.

12. Sasidharan S, Saudagar P. Leishmaniasis: Where Are We and Where Are We Heading? Parasitol Res 2021;120(5),1541–54.
13. Jervis S, Chapman LAC, Dwivedi S, Karthick M, Das A, Le Rutte EA, et al. Variations in visceral leishmaniasis burden, mortality and the pathway to care within Bihar, India. Parasites Vectors 2017;10(1):601.
14. Jaffe CL, Rachamim N. Amastigote stage-specific monoclonal antibodies against Leishmania major. Infect Immun 1989;57(12):3770-7.
15. Jaffe CL, Bennett E, Grimaldi G Jr, McMahon-Pratt D. Production and Characterization of species-specific monoclonal antibodies against Leishmania donovani for immunodiagnosis. J Immunol 1984;133(1):440-7.
16. Froes AM, dos Santos CVD, Penha-Filho ML,Teixeira MCA et al. Sub-clinical infection as an effective protocol for obtaining anti-Leishmania chagasi amastigot antibodies of different animal species. Veterin Immunol Immunopathol 2004;99:135–41.
17. Tomita M, Tsumoto K. Recent advances in antigen-based generation of monoclonal antibodies. Curr Immunol Rev 2010; 6: 56–61.
18. Schmitz K, Geisslinger G, Tegeder I. Monoclonal antibodies in preclinical EAE models of multiple sclerosis: A systematic review. Int J Mol Sci 2017;18:1-18.
19. Kivi G, Teesalu K, Parik J, Kontkar E, Ustav M J, Noodla L, et al. HybriFree: A robust and rapid method for the development of monoclonal antibodies from different host species. BMC Biotechnol 2016;16:2.
20. Cabral-Miranda G, de Jesus JR, Oliveira PR, Detection of parasite antigens in leishmania infantum–infected spleen tissue by monoclonal antibody, piezoelectric-based immunosensors. J Parasitol 2014;100(1):73–8.
21.Tigabu D., Endale B., Haben F. Monoclonal Antibody and its Diagnostic Application. Biomed J Sci & Tech Res 2020;30(4):23645-50.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-07]

[DOI: 10.52547/umj.33.1.37]

Original Article

EVALUATION OF THE ROLE OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN THE DIAGNOSIS OF KALA-AZAR DISEASE

Ezzat Nourizadeh[1]

Received: 02 February, 2022; Accepted: 10 August, 2022

Abstract

***Background & Aims*:** Despite the recognition of the parasite responsible for leishmaniasis in the world, unfortunately this disease is still considered as an endemic disease in many countries of the world and is spreading even with the predictions made. This trend is also observed in Iran. Considering this importance, the aim of this study is to investigate the effect of monoclonal antibodies in the diagnosis of Kalaazar disease, which is the visceral type of leishmaniasis.

Materials & Methods: Leishmania infantum promastigote forms were prepared in a special culture medium and then BALB/c mice were immunized with these forms. The mouse with the best response was selected and its spleen cells were merged with myeloma SP2/o cells. After the formation of hybridoma cells, specific antibody-producing cells were prepared as single clones.

***Results*:** In this study, five clones 3E6 FIII3, 3E6 FIII4, 2C4 FII5, 2C4 FII3, and 2C4 FII2 were obtained. Among them, 3E6 FIII4, 2C4 FII5 and 2C4 FII2 monoclones which had the highest ODs were selected for investigation.

***Discussion*:** Although these antibodies are not able to distinguish between different species of Leishmania parasite, but it seems that they can be used to further investigate Leishmania parasite antigens and also to diagnose Leishmaniasis.

Keywords: Monoclonal Antibodies, Diagnosis of Leishmaniasis, Kala-azar Disease

Address: Department of Microbiology, Faculty of Science, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran
Tel: +984531505177
Email: nourizade@yahoo.com

SOURCE: STUD MED SCI 2022: 33(1): 44 ISSN: 2717-008X

Copyright © 2022 Studies in Medical Sciences

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[1] *Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Science, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran (Corresponding Author)*

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-05-07]

[DOI: 10.52547/umj.33.1.37]