

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 قازانچانی^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:

تاریخ پذیرش:

چکیده

مقدمه: ژیا ردیا لامبلیا یکی از شایع‌ترین تک یاخته‌های روده‌ای انسان در سراسر جهان می‌باشد. تشخیص آن عمدتاً از طریق مشاهده مستقیم صورت می‌گیرد ولی استفاده از روش‌های مبتنی بر ELISA و IFA بعنوان تکنیک‌های برتر، کاربردهای تحقیقاتی و اپیدمیولوژیکی دارد. برای طراحی تست‌های قدرتمند با قدرت تشخیصی بالا نظیر دیپ استیک و یا کیت‌های تشخیصی سریع، اولین قدم تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال می‌باشد. لذا بر آن شدیم تا آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر ضد ژیا ردیا را در خرگوش تولید نماییم.

مواد و روش‌ها: با استفاده از روش تغییر یافته گرا دیان دو مرحله‌ای سوکروز، کیست‌ها خالص‌سازی شدند و غلظت آن‌ها به تعداد $1 \times 10^6/\text{ml}$ 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 تزریق‌های بعدی بدون استفاده از ادجوانت بصورت عضلانی- جلدی صورت گرفت. پس از ایمونیزاسیون خرگوش، برای اثبات تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد ژیا ردیا و تعیین تیتراژ آن، تست IFA و ELISA طراحی گردید.

یافته‌های پژوهش: نتایج بدست آمده در هر دو روش، بیانگر ایمن شدن خرگوش بود و با میزان $10^6/\text{ml}$ انگل و رقت سرمی $\frac{1}{100}$ و با رقت $\frac{1}{20}$ Goat anti rabbit IgG کونژوگه با FITC در زیر میکروسکوپ ایمونوفلورسانس، جواب کاملاً قابل قبولی گرفته شد. در الیزا هم در تیتراهای با میزان $10^5/\text{ml}$ انگل و رقت‌های کونژوگه $\frac{1}{5000}$ و $\frac{1}{10000}$ ، و سرمی $\frac{1}{1000}$ و $\frac{1}{2000}$ ، بهترین جوابها گرفته شد.

نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به اهمیت تشخیص آنتی ژن‌های ژیا ردیایی در نمونه‌های مختلف و بالینی، تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد ژیا ردیا لامبلیا با تیتراژ بالا قدم اول و مهمی در راستای طراحی کیت‌های IFA و الیزای مستقیم با هدف تشخیص مستقیم آنتی‌ژن‌های ژیا ردیا بشمار می‌رود که می‌توان در مراحل بعدی نسبت به خالص‌سازی آنتی‌بادی تولیدی و کونژوگه نمودن آن با آنزیم اقدام نمود.

کلمات کلیدی: آنتی بادی پلی کلونال، ژیا ردیا لامبلیا، الیزا

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

Email: afshinbarazesh@yahoo.com

مقدمه

ژیا ردیا لامبلیا (دئونالیس) یکی از پاتوژن‌های تک‌یاخته‌ای مهم است که در طبقه بندی جزو تاژک داران روده‌ای قرار می‌گیرد (۱). این انگل انتشار جهانی داشته، شیوع آن حدود ۲۰۰ میلیون نفر در دنیا تخمین زده می‌شود (۲). در مرور ۳۰۰ بررسی انجام گرفته در زمینه انگل‌های روده‌ای انسان در ایران در نیم قرن گذشته، ژیا ردیا در کنار آتامبا هیستولیتیکا، شایع‌ترین تک‌یاخته‌های بیماریزا بوده‌اند (۳). مهم‌ترین راه انتقال آن توسط آب آلوده بوده ولی انتقال فرد به فرد و نیز انتقال از راه غذا نیز اهمیت دارد (۴ و ۵). مهم‌ترین علایم بیماری به ترتیب شیوع شامل: اسهال، سستی، نفخ شکم، دفع مدفوع چرب و بد بو، کرامپ‌های شکمی، تهوع، بی‌اشتهایی، کاهش وزن، استفراغ، تب، کهیر و بی‌بوست می‌باشند (۶ و ۷). اگرچه بیماری خوش‌خیم است، در بعضی افراد بویژه بچه‌ها و خانم‌های باردار ممکن است بیماری شدید با کاهش مایعات بدن و نیاز به بستری شدن ایجاد کند (۶ و ۸). اسهال مزمن ناشی از ژیا ردیا خودبخود یا با درمان بهبود می‌یابد ولی بویژه در بچه‌ها با کاهش وزن، علایم شبیه اسپرو، استئاتوره و سوءجذب ویتامین بی ۱۲، ویتامین آ، پروتئین دی، گزیلوز و آهن همراه است (۹ و ۱۰). گاهی عدم تحمل لاکتوز وجود دارد. نظرات در مورد تأثیر ژیا ردیازیس مزمن در رشد کودکان هنوز مورد بحث است (۸). روش تشخیص معمول ژیا ردیازیس، آزمون میکروسکوپی مستقیم مدفوع برای یافتن انگل می‌باشد (۱۱). حساسیت این روش حتی با آزمایش چند نوبته مدفوع فقط ۷۰-۵۰٪ می‌باشد (۱۲ و ۱۳). در بیمارانی با ژیا ردیازیس مزمن، حساسیت این روش ممکن است پایین‌تر هم باشد (۱۱)، زیرا کیست‌ها بطور متناوب دفع شده و تعداد آنها در سطح پایینی می‌باشد. آزمایش آسپیراسیون مایع دئونوم و یا ژژنوم و بیوپسی از روده باریک ممکن است که دارای حساسیت بیشتری باشند (۱۴) ولی پرهزینه بوده و یک روش تهاجمی می‌باشد و به همین خاطر بندرت استفاده می‌شوند. امروزه تشخیص‌های آنتی ژنی روش‌های بهتری را برای تشخیص ارائه می‌دهند، زیرا تصور می‌شود سطح بیشتر آنتی ژن موجود در فرد یا نمونه مورد نظر اثبات می‌کند که مقدار انگل موجود در شخص بیمار یا نمونه آلوده نیز بیشتر است. لذا تشخیص ژیا ردیا با روش‌های دیگری نظیر ایمنوفلئورسانس یا

الایزا با درصد بالایی از حساسیت صورت می‌گیرد (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 کیت‌های 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 روش‌ها

نمونه‌های مدفوع از ۱۰۰ بیمار مختلف جمع‌آوری گردیده و با روش‌های میکروسکوپی، مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه‌های مثبتی که دارای مقادیر فراوان فرم کیستی انگل بودند، جهت خالص‌سازی کیست مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه‌های فوق‌الذکر 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 لوله‌های آزمایش مدرج مخروطی ریخته شده و با روش گرادیان تغییر یافته دو مرحله‌ای سوکروز تحت خالص‌سازی قرار گرفت (۱۷). و در نهایت غلظت آن جهت تزریق به حیوان برابر 1×10^6 / ml انگل در PBS تنظیم شد.

برای تولید آنتی بادی پلی کلونال علیه کیست ژیا ردیا از حیوان خرگوش استفاده شد و تزریق در چندین مرحله بفواصل ۱، ۳، ۲ و ۴ هفته بصورت عضلانی - داخل جلدی انجام شد تا ایمونیزاسیون کامل صورت گیرد. تزریق اول با استفاده از ادجوانت کامل فروند و تزریق یادآور بعدی با استفاده از ادجوانت ناقص فروند و تزریق‌های دیگر بدون استفاده از ادجوانت انجام شد.

حدود یک هفته پس از تزریق چهارم، جهت اثبات ایمن شدن خرگوش و همچنین برای تعیین تیتراژ آن، طراحی کیت الایزای غیر مستقیم و همچنین IFA صورت گرفت. در الایزا با استفاده از انگل که در رفتهای 10^3 ، 10^4 و 10^5 انگل در یک میلی لیتر PBS به ته پلیت کوت شدند، رفتهای مختلفی از سرم

نهایت نتیجه عمل در زیر میکروسکوپ ایمنوفلورسنت، از نظر وجود تشعشعات ایمنوفلئورسانس بررسی گردید.

یافته‌های پژوهش

۱- خالص سازی کیست:

از سوسپانسیون نهایی بدست آمده، لام مستقیم تهیه و به روش میکروسکوپی مطالعه شد و همچنین جهت تعیین میزان کیستهای باز یافتی، از لام نئوبار استفاده گردید. نتیجه عمل دست یافتن به سوسپانسیونی از کیستهای سالم و تقریباً یکدست و بدون آلودگی بود که میزان ریکاوری آن هم حدود $10^4 \times 5-1$ کیست از دو گرم مدفوع بود.

۲- تعیین تیتراژ آنتی بادی تولیدی:

الف- IFA

در این تست در تیتراژهای با میزان $10^6/ml$ انگل و رقت کونزوگه $\frac{1}{40}$ و رقت سرمی $\frac{1}{100}$ جواب ایده آل گرفته شد. جزئیات آن در جدول شماره (۱) آمده است:

خرگوش ایمن ($\frac{1}{1000}$ و $\frac{1}{2000}$) اضافه و درنهایت آنتی بادی ضد آنتی بادی خرگوش کونزوگه شده با آنزیم، (با رقت $\frac{1}{5000}$ و $\frac{1}{10000}$) افزوده شد. و پس از افزودن سوبسترای خاص آنزیم یعنی تترا متیل بنزیدین (TMB) و توقف واکنش با اسید سولفوریک ۱ نرمال و خواندن جذب (OD) در دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر، تیتراژ محصول تولید شده مشخص گردید.

در IFA هم به همین ترتیب، انگل‌ها (با مقادیر $10^4-10^6/ml$ در PBS) در چاهک های لام ANA کوت شده، رقتهای مختلفی از سرم خرگوش ایمن ($\frac{1}{10}$ ، $\frac{1}{100}$ ، $\frac{1}{1000}$) و اضافه و سپس آنتی بادی ضد آنتی بادی خرگوش کونزوگه شده با (FITC) با رقت $\frac{1}{10}$ و $\frac{1}{20}$ افزوده شد و در

جدول شماره ۱: نتایج حاصل از تست IFA در رقت های مختلف سرمی

میزان انگل در یک میلی لیتر PBS	10^6				10^5				10^4			
	$\frac{1}{10}$				$\frac{1}{20}$				$\frac{1}{10}$			
رقت کونزوگه	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$
رقت سرمی	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$
نتایج	۴+	۳+	-	-	۳+	۱+	-	-	-	-	-	-

ب- ELISA

بهترین جوابها گرفته شد و جذب نوری (OD) آن بالای یک بود (OD $\geq$ 1).

بدین منظور کیت الایزا طراحی گردید ، همانطور که در جدول شماره (۲) آمده است ، در تیتراهای با میزان ۱۰^۵/ml و رقتهای کونژوگه ۱/۵۰۰۰ و ۱/۱۰۰۰۰ ، و سرمی ۱/۱۰۰۰ و ۱/۲۰۰۰ ،

جدول شماره ۲: نتایج حاصل از تست الایزا در رقت مختلف سرمی

میزان انگل در یک میلی لیتر PBS	۱۰ ^۵				۱۰ ^۴				۱۰ ^۳			
	۱/۵۰۰۰		۱/۱۰۰۰۰		۱/۵۰۰۰		۱/۱۰۰۰۰		۱/۵۰۰۰		۱/۱۰۰۰۰	
رقت کونژوگه	۱/۱۰۰۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۲۰۰۰
رقت سرمی	۱/۲۰۷	۱/۰۵۸	۱/۰۲۷	۰/۷۲۹	۰/۶۲۱	۰/۴۳۱	۰/۴۷۳	۰/۳۱۹	۰/۳۵۲	۰/۲۳۱	۰/۱۹۸	۰/۲۲۲
جذب نوری (OD)												

بحث و نتیجه گیری نهایی

مطلوبی برای سیستمهای تشخیص آنتی بادی می باشند، بویژه 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 کانتر ایمنوالکتروفورز و ایمنوفلوئورسنت آنتی بادی می باشند (۱۸). جدای از مشکلات عملی در آزمایشگاهها ، حساسیت و ویژگی متغیر اغلب تست های بالا از فاکتور های محدود کننده استفاده از آنها می باشد . الایزا بعنوان یک ابزار تشخیصی سرولوژیکی به القوهای 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 ژیا (دیا لامبلیا) می باشد (۱۶).

جهت ایمن سازی حیوان از کیست های خالص شده ژیا (دیا لامبلیا) 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

ژیا (دیا لامبلیا) 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 (۱ و ۲). انتقال آن از طریق فرم کیستی انگل صورت گرفته و مهمترین راه انتقال توسط آبهای آلوده می باشد (۴ و ۵). سیر تکاملی آن ساده است و به این جهت شیوع آن در مراکز پرورشی و مهد کودکی بسیار بالاست (۵). بطور معمول روشی که برای تشخیص ژیا (دیا لامبلیا) 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 (۱۲ و ۱۳). روش های بیوپسی و آسپیراسیون روده باریک می تواند حساسیت تشخیص انگل را بهبود بخشد، اما روشی تهاجمی بوده و بندرت استفاده می شوند (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 مورد نظر با تعداد انگل موجود در آن مطابقت دارد. بنابراین سیستمهای آنتی ژنی یک جایگزین

روش‌های دیگری نظیر گرادیان سوکروز یا پرکول هم باعث بدست آمدن سوسپانسیونی از کیست‌های حاوی مواد زاید مدفوعی می‌شود (۲۰ و ۱۹). در این مطالعه کیست‌ها طی روش‌های مختلفی مورد خالص سازی قرار گرفتند و در نهایت با روش گرادیان تغییر یافته دو مرحله ای سوکروز، سوسپانسیونی از کیست‌های 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 تزریق‌های بعدی بدون ادجوانت انجام گرفت (۲۱ و ۲۲).

ساده ترین روش برای اثبات پیشرفت تولید آنتی بادی پلی کلونال روش الایزای غیر مستقیم است. اغلب آنتی ژن‌ها و آنتی بادی‌ها وقتی که بطور مستقیم به فاز جامد متصل می‌شوند، براحتی می‌توانند بوسیله این روش تشخیص داده شوند. در این روش برای جلوگیری از جذب پروتئین‌ها به میکرو پلایت‌ها و برای جلوگیری از بروز واکنش‌های غیر اختصاصی، از میکروپلایت‌های پلی استیرنی بعنوان فاز جامد استفاده شد، در غیر اینصورت و برای اجتناب از این امر می‌بایستی از آنتی ژن خالص (تخلیص شده) استفاده می‌شد که این کار مستلزم صرف هزینه و زمان بسیار زیادی می‌باشد. در مورد کوتینگ (Coating) انگل‌ها با رعایت دما و pH بافر و استفاده از مسدودکننده PBS / T ۵٪، این مراحل با دقت تمام انجام شد و نتایج مطلوبی بدست آمد.

منابع

- 1- Adam RD. Biology of Giardia lamblia. Clin Microbiol Rev 2001, 14: 447-75.
- 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, Juranek DD, et al. 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- Show RA, Stevens MB, The reactive arthritis of giardiasis. A case report. JAMA 1987, 258: 2734-2735.

نتایج بدست آمده از بررسی الایزا حاکی از خوب ایمن شدن حیوان می‌باشد و جذب نوری (OD) بالای یک با تیتراژ سرمی $\frac{1}{۳۰۰۰}$ و رقت کونزوگه تا $\frac{1}{۱۰۰۰۰}$ بدست آمد. نتایج حاصل از تست IFA هم نشان دهنده تولید آنتی بادی با تیتراژ مناسب می‌باشد.

از آنجائیکه تشخیص آنتی ژن‌های ژیلاردیایی در نمونه‌های 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 کیت‌های تشخیصی قطعی و لزوم تحقیقات بیشتر اپیدمیولوژیکی، تولید آنتی بادی پلی کلونال با تیتراژ بالا گام اول و مهمی بشمار می‌آید چرا که پس از تولید و خالص سازی آن و کونزوگاسیون با آنزیم، می‌توان در راستای طراحی کیت الایزای مستقیم آنتی ژن‌های انگلی اقدام نمود.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر، بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات کاربردی و دارویی تبریز می‌باشد، لذا نگارندگان مراتب قدردانی خویش را از زحمات مدیریت و کارشناسان آن مرکز اعلام می‌دارند.

- 7- Clyne CA, Eli Opoulos G. M. Eli opoulos. Fever and urticaria in acute giardiasis. Arch Intern Med 1989, 149:939-940.
 - 8- Fathing MJG, Mata L, Urrutia JJ, et al. "Natural history of Giardia infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth." Am J Clin Nutr 1986, 43:395-405.
 - 9- Lengerich EJ, Addiss DG, Juranek 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 suburban Copenhagen: Incidence, physical growth, clinical symptoms and small intestinal abnormality. Acta Pediatr 1992, 81: 881-886.
 - 11- Rosoff JD, Stibbs HH. Isolation and identification of Giardia lamblia specific stool antigen (GSA65) useful in coprodiagnosis of giardiasis. J clin Microbiol 1986, 23: 905-910.
 - 12- Bruk JA. Giardiasis in childhood. Am J Dis Child 1975, 129:1304-1310.
 - 13- Burke JA. The clinical and laboratory diagnosis of giardiasis. Crit Rev Clin Lab Sci 1977,7:373-391.
 - 14- Sun T. The diagnosis of giardiasis. Am J Surg Pathol 1980, 4: 265-271.
 - 15- Wittner M, Maayans Farrerw, et al. Diagnosis of giardiasis by two methods: immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. Arch Pathol Lab Med 1983, 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 2002, 97: 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 یاختگان، انتشارات آبیژ. ۱۳۸۴. صفحات ۹۷ - ۷۹.
- 19- Blagg W, Schlogel EL, Mansour NS. A new concentration technique for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. Am J Trop Med Hyg 1955, 4: 23-8
 - 20- Walderich BL, Mueller R, Bracha J, et al. A new method for isolation and differentiation of native Entamoeba histolytica and E. dispar cysts from fecal samples. Parasitol Res 1997, 83:719-721.
 - 21- Halliday LC, Artwohl JE. Physiologic and Behavioral Assessment of Rabbits Immunized with Freund's completed Adjuvant. Cont Topics, 2000, 39:8.
 - 22- Stills HF, Bailey MQ. Use of Freund's complete Adjuvant. Lab Animal 1991, 4: 25.

Production of Polyclonal Antibody Against Giardia Lamblia in Rabbit

Barazesh, A^{2*}, Dr.Madjidi, J¹., Dr.Fallah E¹., Dr.Jamali, R¹., Ghazanchaei A¹., Abdolalizadeh J².

1)Immunology and Parasitology department- faculty of medicine- Tabriz university of medical science

2)Drug applied research center of Tabriz

Abstract

Introduction: *Giardia lamblia* is the most frequently human intestinal protozoan in the worldwide. Diagnosis of *G. lamblia* by microscopic examination of stool is common. ELISA& IFA methods have researching and epidemiological use. For designing a powerful test with high detection rate like dipstick or rapid diagnosis kits; first step is production of polyclonal antibody. For this reason we decided to produce polyclonal antibody against *G. lamblia* in rabbit.

Material and methods: Giardia cysts were purified from human fecal samples by sucrose two stage modified gradient method. Their concentration was independently adjusted to 1×10^6 /ml PBS, were inoculated intramuscularly-intradermally in four stage with Freund's complete adjuvant for first time and with Freund's incomplete adjuvant for second time and without Freund's adjuvant for next time, in rabbit. After immunization of rabbit, IFA test was carried out to evaluate the polyclonal antibody production against Giardia.

Results: The results of test showed the rabbit was immunized. Best results of IFA were achieved with 1×10^6 /ml parasite and sera dilution of 1/100 and goat anti rabbit IgG conjugated with FITC dilution of 1/20 is under immunofluorescent microscope.

Conclusion: Giardia's antigens have an important role for diagnosis in clinical and other samples. Production of anti Giardia polyclonal antibody with high titer is first and important step for designing IFA and direct ELISA kits for direct detection of Giardia's antigens. Produced polyclonal antibody can use purification and conjugation with enzyme.

Key words: Production – Giardia lamblia – Polyclonal antibody

* **Corresponding Author:** Immunology and Parasitology department- faculty of medicine- Tabriz university of medical science