کاربرد آنتی‌بادی مونوکلونال در تشخیص بیماری‌ها و بررسی عملکرد واکسن‌ها در ماهیان پرورشی دریایی

رویا رهنما*، رحیم پیغان، اسماعیل کرمی

گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

* نویسنده مسئول: Emaile: royarahnama60@yahoo.com

چکیده:

کنترل و پیشگیری شیوع بیماری‌ها در ماهیان پرورشی مستلزم اجرای یک برنامه منظم پایش و ریشه‌کنی یا واکسیناسیون می‌باشد و در این رابطه سرولوژی به‌عنوان یک ابزار پایش و تشخیص می‌تواند بسیار سودمند باشد. در سال‌های اخیر، «آنتی‌بادی‌های مونوکلونال»[۸] به عنوان ابزاری در تحقیقات ایمونولوژیک مورد توجه قرار گرفته‌اند. به علت خلوص زیاد، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به عنوان ابزارهای شیمیایی استاندارد عمل می‌کنند. آن‌ها در تکنیک‌های تشخیص کلینیکی به سرعت جای خود را باز کرده‌اند، چون در تهیهٔ کیت‌های تجاری، مقدار زیادی از آن‌ها با کیفیت ثابت لازم است. همانند سرولوژی در سایر حیوانات، انجام آزمایش‌های سرمی در ماهی نیز نیازمند استفاده از آنتی آنتی-بادی‌های اختصاصی (آنتی IgM) می‌باشد. به‌همین دلیل در طی دهه اخیر تلاش گردیده تا از طریق فناوری تولید آنتی-بادی‌های مونوکلونال، آنتی IgM مناسب برای هر یک از گونه‌های متعدد ماهیان آب شیرین و دریایی تولید شود. پس تولید این گونه آنتی بادی‌ها در داخل کشور علاوه بر کمک و توسعه به تشخیص سریع و دقیق بیماریهای ماهیان دریایی می‌تواند صرفه‌جویی ارزی نیز به‌دنبال داشته باشد.

کلمات کلیدی: آنتی‌بادی مونوکلونال، تشخیص بیماری، سرولوژی، ماهیان دریایی

[2] **Monoclonal Antibodies** [8]

مقدمه

پرورش متراکم ماهیان دریایی در مزارع پرورشی منجر به بروز بیماری‌های مختلف و گاهی تلفات سنگین و ضررهای اقتصادی می‌شود (Kibenge et al., 2012). در ایران نیز در طی سالیان اخیر پرورش ماهیان دریایی بسیار توسعه یافته و به عنوان یکی از مهمترین منابع پروتئین حیوانی کشور محسوب می شود. علی‌رغم تولید بالا و گستردگی سطح زیرکشت، مطالعات نسبتا کمی در مورد سیتم ایمنی این ماهیان در ایران انجام گرفته است و همچنان این صنعت با مشکل تلفات زیاد و عدم تشخیص قطعی عوامل بیماری ها روبرو است.

ماهیان پرورشی در معرض بیماریهای متعدد باکتریایی، ویروسی، انگلی و قارچی قرار دارند. بروز چنین بیماری‌هایی در مزارع پرورشی ماهیان آب شیرین و ماهیان دریایی می‌تواند بر میزان تولید و کیفیت ماهیان پرورشی موثر باشد. بنابراین کنترل بیماری، یک مولفه مهم در صنعت آبزی‌پروری است. یکی از مولفه‌های مهم برای مدیریت بیماری در مزارع پرورشی، تشخیص سریع و شناسایی پاتوژن‌ها است و این به نوبه خود منجر به کاهش استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی در محیط زیست می‌شود.

بررسی تولید IgM اختصاصی در سرم، یکی از راهکارهای تشخیص بیماری‌های عفونی در ماهی می‌باشد (Al-Harbi et al., 2000, van der Heijden et al., 1995). تولید آنتی‌بادی مونوکلونال یا پلی‌کلونال بر ضد ایمنوگلوبولین‌ها به‌عنوان ابزاری ارزشمند در مطالعات ایمنولوژی شناخته شده است (Choi et al., 2007). تهیه آنتی بادی مونوکلونال، می‌تواند برای بررسی پاسخ عملکردی واکسیناسیون و بسیاری از تحقیقات سرولوژیک قابل استفاده در تشخیص و پیشگیری از بیماری های عفونی در این ماهیان قابل استفاده باشد. کنترل و پیشگیری شیوع بیماری‌های مختلف در ماهیان پرورشی مستلزم اجرای یک برنامه منظم پایش و ریشه‌کنی یا واکسیناسیون می‌باشد و در این رابطه سرولوژی بعنوان یک ابزار پایش و تشخیص می‌تواند بسیار سودمند باشد (Morrison and Nowak, 2002).

یافته های قابل ترویج

آنتی‌بادی‌هایی که در یک حیوان در پاسخ به یک آنتی‌ژن پیچیده تولید می‌شوند، ناهمگون هستند، زیرا این آنتی‌بادی‌ها توسط چندین دودمان از سلول‌ها تولید می‌شوند و هریک از این آنتی‌بادی‌ها قادرند با یک شاخص آنتی‌ژنی متفاوت بر روی آنتی‌ژن پیچیده واکنش دهند در نتیجه این آنتی‌بادی‌ها را چنددودمانی می‌نامند. آنتی‌بادی‌هایی که توسط یک دودمان از سلول‌ها تولید می‌شوند، مانند موارد تومور پلاسماسل‌ها (میلوما)، همگون بوده و تک دودمانی (مونوکلونال) نامیده می‌شوند. حتی در حیوانات فوق ایمن، بیش از ۱/۱۰ آنتی‌بادی‌های در گردش، اختصاصی یک آنتی‌ژن است، در نتیجه استفاده از این مخلوط آنتی‌بادی در تکنیک‌های ایمونوشیمی سبب مشکلات فراوان می‌شود، بنابراین تولید آنتی‌بادی‌های تک دودمانی یا هموژن با یک ویژگی شناخته شده، یک هدف درازمدت در بررسی‌های تشخیصی می‌باشد (Harlow and Lane, 1988).

روش تولید مقادیر نامحدودی از یک نوع آنتی‌بادی ویژهٔ یک شاخص آنتی‌ژنی، انقلابی در ایمونولوژی به‌وجود آورده و کاربردهای زیادی در زمینه‌های گوناگون تحقیقاتی و نیز طب بالینی پیدا کرده است. اساس این روش مبتنی بر آن است که هر لنفوسیت B، آنتی‌بادی با یک نوع ویژگی را تولید می‌کند، بنابراین هر تومور مونوکلونال فقط یک نوع آنتی‌بادی تولید می‌کند. این تومورها خودبه‌خود به‌وجود می‌آیند ولی در شرایط تجربی می‌توان به روش‌های مختلف آن‌ها را در موش ایجاد کرد (میراحمدیان، ۱۳۷۸). اولین و در حال حاضر متداول‌ترین تکنیک برای این کار روشی است

که توسط کهلر و مایل اشتاین در سال ۱۹۷۵ ارائه شده است. این روش عبارت از آمیختگی، ادغام یا فیوژن سلولی یا هیبرید نمودن بین یک سلول B تولید کنندهٔ آنتی‌بادی و یک سلول از ردهٔ میلومائی صورت می‌گیرد و پس از آن سلول‌های فیوژن یافته‌ای انتخاب می‌شوند، که آنتی‌بادی با ویژگی مورد نظر را که از سلول B طبیعی منشاء گرفته است، تولید می‌کنند (Groth and Scheidegger, 1980, Harlow and Lane, 1988).

رده‌های سلولی نامیرا و تولید کننده آنتی‌بادی را که در اثر فیوژن حاصل شده‌اند، هیبریدوما و آنتی‌بادی‌هائی را که تولید می‌کنند، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌نامند. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، خالص و یک دست بوده، در اتصال به آنتی‌ژن، اختصاصی عمل می‌نمایند و می‌توان به مقدار نامحدود آن‌ها را تولید نمود (Harlow and Lane, 1988). مرحلهٔ اول تولید هیبریدوما، تهیه پلاسماسل‌های تولید کننده آنتی‌بادی است (شکل ۱). با ایمن کردن موش بر ضد آنتی‌ژن مورد نظر و چند بار تکرار آن می‌توان این سلول‌ها را تهیه نمود. تکرار تزریق آنتی‌ژن به موش برای اطمینان از برانگیخته شدن پاسخ مناسب است. دو تا چهار روز پس از تجویز آنتی‌ژن، به‌دلیل آنکه خالص‌سازی پلاسماسل مورد نظر از سایر پلاسماسل‌ها مشکل می‌باشد، معمولاً ادغام یا فیوژن با مخلوط سلولی حاصل از ارگان‌های لنفوئیدی انجام می‌گردد، طحال موش له می‌گردد تا به سوسپانسیون سلولی به عنوان منبع پلاسماسل تبدیل شود. سوسپانسیون سلول‌های طحال را در محیط کشت با ردهٔ سلول‌های میلومای موش مخلوط و به مخلوط سلول‌ها، پلی اتلین گلیکول اضافه می‌شود (Groth and Scheidegger, 1980, Marx et al., 1997). دو خصوصیت در روش هیبریداسیون سوماتیک آن را بسیار ارزشمند نموده است. نخست آن‌که، بهترین روش برای تولید آنتی‌بادی مونوکلونال در برابر یک شاخص آنتی‌ژنی معلوم می‌باشد. دوم این که، این روش می‌تواند برای شناسایی آنتی‌ژن‌های ناشناخته در یک مخلوط به‌کار رود، زیرا هر هیبریدوما فقط برای یک شاخص آنتی‌ژنی ویژگی دارد (Marx et al., 1997). برخی از رایج‌ترین کاربردهای هیبریدوماها و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به قرار زیر می‌باشند:

۱- شناسایی شاخص‌های فنوتایپی منحصر به انواع سلول‌های خاص: اساس طبقه‌بندی جدید لنفوسیت‌ها و فاگوسیت‌های تک هسته‌ای، اتصال به آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی هر گروه است. از این یافته‌ها برای تعیین گروه‌های تمایزی در انواع مختلف سلول‌ها استفاده می‌شود.

۲- تشخیص به کمک ایمنی: برای تشخیص بسیاری از بیماری‌های عفونی و سیستمیک لازم است که با استفاده از آنتی‌بادی‌ها مونوکلونال در روش‌های سنجش ایمنی وجود آنتی‌ژن‌ها و یا آنتی بادی‌های اختصاصی در جریان خون یا در بافت‌ها تشخیص داده شوند (Al-Harbi et al., 2000, Morrison and Nowak, 2002, Zhao et al., 2014).

۳- تشخیص و درمان تومورها: آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ویژه تومور در روش‌های تصویربرداری جهت شناسایی تومورها و نیز به منظور ایمونوتراپی آن‌ها در شرایط in vivo به‌کار می‌روند.

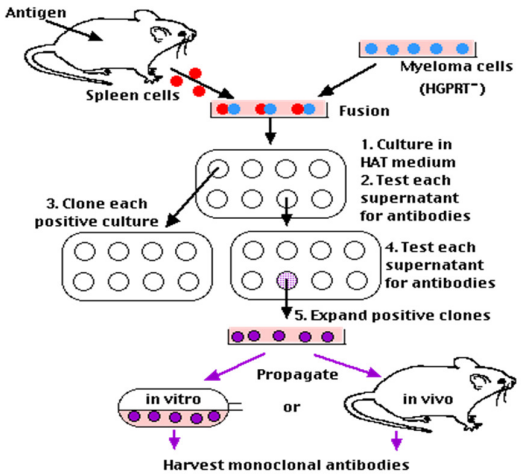
۴- بررسی عملکرد مولکول‌های ترشحی و سطحی سلول در تحقیقات ایمونولوژی: آنتی‌بادی‌های مونوکلونال که به مولکول‌های سطحی سلول متصل می‌شوند و اعمال خاص سلولی را تحریک یا مهار می‌کنند، ابزار سودمندی برای شناخت اعمال مولکول‌های سطحی از جمله پذیرنده‌های آنتی‌ژنی به‌شمار می‌روند. آنتی‌بادی‌های خنثی کنندهٔ سایتوکاین‌ها به‌طور معمول جهت تشخیص وجود و نقش عملکردی این هورمون‌های پروتئینی در شرایط in vitro و in vivo به‌کار می‌روند (میراحمدیان، ۱۳۷۸).

برای تشخیص بیماری‌ها در ماهیان آلوده از روش‌های متداول مانند کشت باکتریایی، تهیه مقاطع بافتی،

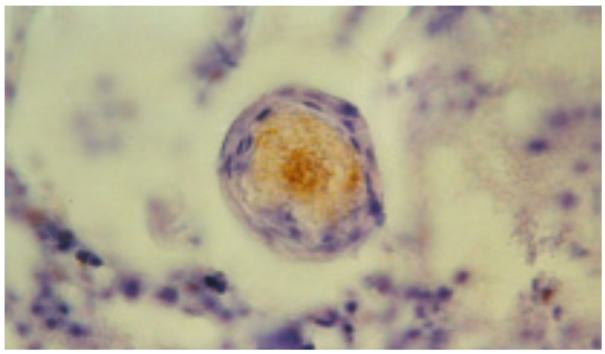
انجام روشهای مولکولی (PCR) استفاده می‌شود که برخی از این روش‌ها هر کدام به‌دلایلی قادر به تشخیص قطعی عامل بیماریزا نیستند. امروزه به منظور رفع این نقص از روش‌های بسیار اختصاصی مانند ایمنوهیستوشیمی (شکل۲)، تست آنتی‌بادی غیرمستقیم فلورسنس (شکل۳) و سرولوژی (بررسی میزان آنتی‌بادی در خون) استفاده می‌گردد. در میان روش‌های ذکر شده سرولوژی (جدا کردن آنتی‌بادی اختصاصی تولید شده بر ضد عامل بیماریزا)، یکی از مناسب‌ترین روش‌ها برای تشخیص قطعی عامل بیماری و همچنین بررسی عملکرد واکسن‌ها است. در برخی از بیماری‌ها در ماهیان پرورشی دریایی و آب شیرین، بازماندگان به‌عنوان حامل آن پاتوژن هستند اما ممکن است هیچ علامت کلینیکی را نشان ندهند. در این زمان برای بازماندگان از آلودگی، آزمون‌های سرولوژیکی دارای چندین مزیت است: جداسازی برخی پاتوژن‌ها فقط در یک دوره زمانی کوتاه بعد از آلودگی امکان‌پذیر است خصوصا زمانی‌که درجه حرارت آب بالا باشد یا آن عامل بیماری به‌صورت اندمیک در بین جمعیت درآمده باشد، اما آنتی‌بادی هموارل حتی تا یک سال بعد از آلودگی می‌تواند قابل شناسایی باشد. همچنین در روش سرولوژیک نمونه‌برداری بدون به خطر انداختن ماهی است، زیرا به‌راحتی می‌توان با بیهوش کردن ماهی بدون وارد شدن آسیب و خطر مرگ، از ماهی خونگیری کرد و سپس سرم را برای جداسازی آنتی‌بادی‌های مورد نظر تهیه نمود. همچنین سرم ماهی برای انتقال و ذخیره‌سازی دارای ثبات بیشتری نیز است.

همانطورکه ذکر شد از مهمترین کاربردهای آنتی‌بادی مونوکلونال بررسی عملکرد واکسن‌ها با استفاده از روش سرولوژی است. به این طریق که بعد از واکسیناسیون از ماهیان تیمار شده سرم تهیه شده و آنتی‌بادی ضد پاتوژن مدنظر با استفاده از روش الایزا سنجیده می‌شود. اگر تیتر (مقدار) آنتی‌بادی ضد عامل پاتوژن (بیماری) در گروه واکسینه شده افزایش یافته باشد نشان دهنده کارآیی مناسب آن واکسن است. امروزه واکسن‌های مختلفی خصوصا برای بیماری‌های باکتریایی موجود است. یکی از مهمترین بیماری‌های باکتریایی در ماهیان دریایی پرورشی بیماری ویبریوزیس است که در حال حاضر واکسن تجاری آن در دسترس بوده و همچنان نیز واکسن‌های متعددی ساخته و جهت استفاده به پرورش دهندگان پیشنهاد می‌شود (اژدهاکش و همکاران، ۱۳۹۶). برای اطمینان از کارآیی واکسن های پیشنهادی و اطمینان از سلامت آنها ابتدا باید در مقیاس آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفته و امکان افزایش آنتی‌بادی مورد نظر ضد آن پاتوژن خاص سنجیده شود. پس بدین منظور از روش سرولوژی و آزمون الایزا استفاده می‌شود. برای استفاده از روش‌های سرولوژیک یکی از ابزارهای مهم، آنتی‌بادی مونوکلونال است که بر ضد یک آنتی‌بادی کاملا اختصاصی است. کاربرد فراوان آنتی‌بادی مونوکلونال در روش‌های سرولوژی آن را به یک ابزار ارزشمند تبدیل کرده است که تهیه و تولید آن در اختیار چند کشور و شرکت خاص است. در سالهای اخیر در کشور ما نیز تلاشهایی به‌منظور تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد IgM توسط محققان (دانشگاه شهید چمران اهواز) انجام شده است. آنتی‌بادی تولید شده در کشور برای جداسازی و تشخیص آنتی‌بادی بر ضد بیماری ویروسی VHS و بیماری باکتریایی استرپتوکوکوزیس در ماهی قزل‌آلا مورد استفاده قرار گرفته است که توانسته با راندمان بسیار بالا آنتی‌بادی‌های مورد نظر را جداسازی کند.

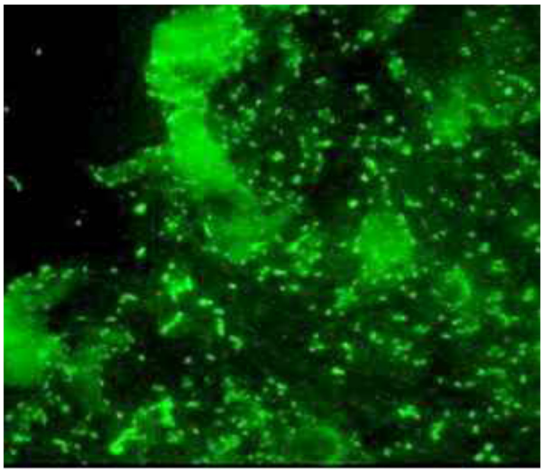
کلون‌های سلولی تولید کننده آنتی‌بادی مونوکلونال بسیار ارزشمند بوده و به‌طور معمول در اختیار سایر کشورها قرار داده نمی‌شود. امید است که با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تولید شده و بومی‌سازی این فناوری بتوان از آن در جهت ارزیابی سرولوژیک ماهیان بیمار و همچنین صرفه‌جویی ارزی، قدم برداشت.



شکل ۱- تصویر شماتیک روش تولید آنتی‌بادی مونوکلونال (Harlow and Lane, 1988)



شکل ۲- تشخیص مایکوباکتریوم مارینوم (*Mycobacterium marinum*) در طحال ماهی جنگجوی سیامی با استفاده از ایمونوهیستوشیمی (IHC) (بزرگنمایی ×۱۰۰۰)



شکل ۳- تشخیص رنی باکتریوم سالمونیناروم (*Renibacterium salmoninarum*) در کلیه ماهی قزل آلای رنگین کمان با استفاده از آزمون آنتی بادی غیر فلورسانس (IFAT) (بزرگنمایی ×۱۰۰۰)

نتیجه‌گیری

یکی از مشکلات اصلی در صنعت آبزی پروری در ایران عدم تشخیص قطعی بیماری‌ها در آبزیان پرورشی از جمله ماهیان دریایی است. در حال حاضر بیشتر پرورش ماهیان دریایی به‌صورت پرورش در قفس انجام می‌شود که به‌دلایل تاثیرات زیست محیطی مخرب بر اکوسیستم، هزینه و مقاومت‌های آنتی بیوتیکی امکان هیچ گونه ضدعفونی آب و دارو درمانی وجود ندارد. لذا تحقیق از طریق پیشگیری و ایمن‌سازی توسط واکسیناسیون باید مورد توجه قرار گیرد. در این رابطه نیز ارزیابی واکسیناسیون ضروری است و بدین جهت اهمیت آنتی بادی مونوکلونال بیش از پیش مشخص می‌شود. پس می‌توان با تولید آنتی‌بادی مونوکلونال ضد ایمنوگلوبولین M در تهیه برنامه‌ای مدون جهت کنترل عفونت‌های ناشی از پاتوژن‌های مختلف قدم برداشت تا بتوان از خسارات اقتصادی قابل ملاحظه‌ی ایجاد شده توسط این پاتوژنها در ماهیان دریایی و پرورشی جلوگیری نمود.

منابع:

اژدهاکش، ا.، پیغان، ر.، آهنگرزاده، م.، ۱۳۹۶، معرفی بیماری‌های مهم ماهیان دریایی پرورش در قفس با تاکید بر ماهی باس دریایی آسیایی Lates calcarifer و روش های پیشگیری از آن‌ها. فصلنامه ماهیان دریایی، شماره ۱، صفحه ۱۱.

میراحمدیان، ماهرو ۱۳۷۸. ایمونولوژی سلولی ملکولی .تالیف :عباس، ابول؛ لیچمن، اندرو و پوبر، جورد. چاپ اول، انتشارات سماط، تهران، صفحات ۵۵-۸۴.

AL-HARBI, A. H., TRUAX, R. & THUNE, R. L. 2000. Production and characterization of monoclonal antibodies against tilapia *Oreochromis niloticus* immunoglobulin. *Aquaculture,* 188**,** 219-227.

CHOI, D.-H., JANG, H.-N., HA, D.-M., KIM, J.-W., OH, C.-H. & CHOI, S.-H. 2007. Cloning and expression of partial Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) IgD. *Journal of biochemistry and molecular biology,* 40**,** 459-466.

GROTH, S. F. D. S. & SCHEIDEGGER, D. 1980. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *Journal of immunological methods,* 35**,** 1-21.

HARLOW, E. & LANE, D. 1988. A laboratory manual. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory,* 579**,** 139- 239.

KIBENGE, F. S., GODOY, M. G., FAST, M., WORKENHE, S. & KIBENGE, M. J. 2012. Countermeasures against viral diseases of farmed fish. *Antiviral research,* 95**,** 257-281.

MARX, U., EMBLETON, M. J., FISCHER, R., GRUBER, F. P., HANSSON, U., HEUER, J., DE LEEUW, W. A., LOGTENBERG, T., MERZ, W. & PORTETELLE, D. 1997. Monoclonal antibody production. *ATLA-NOTTINGHAM-,* 25**,** 121-138.

MORRISON, R. N. & NOWAK, B. F. 2002. The antibody response of teleost fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine,* 11**,** 46-54.

VAN DER HEIJDEN, M. H. T., ROOIJAKKERS, J. B. M. A., BOOMS, G. H. R., ROMBOUT, J. H. W. M. & BOON, J. H. 1995. Production, characterisation and applicability of monoclonal antibodies to European eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) immunoglobulin. *Veterinary Immunology and Immunopathology,* 45**,** 151-164.

ZHAO, J., XU, L., LIU, M., CAO, Y., YIN, J., LIU, H. & LU, T. 2014. Expression and rabbit antisera preparation of igm heavy chain gene in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fisheries of China,* 8**,** 1175-1181.

The use of monoclonal antibodies in the diagnosis of diseases and the performance of vaccines in marine aquaculture fish

Roya Rahnama*, Rahim Peyghan, Esmaeil Karami

Department of Aquatic Health, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
*Corresponding author: royarahnama60@yahoo.com

Abstract

Control and preventing the spread of diseases in the farmed fish requires a regular monitoring, eradication or vaccination program, and in this respect serology as a monitoring and diagnostic tool can be very useful. In recent years, monoclonal antibodies have been considered a tool in immunological research. Due to their high purity, monoclonal antibodies act as standard chemical agents. They have been quickly being used in clinical diagnostic techniques since a lot of them are needed in the production of commercial kits. Like serology in other animals, serum testing in fish also requires the use of anti-antigens (anti-IgM). For the same reason, during the last decade, efforts have been made to produce anti-IgM antibodies for the production of monoclonal antibodies, suitable for each species of freshwater and marine fishes. Therefore, the production of these antibodies in the interior, in addition to the help and development of the rapid and accurate detection of marine fish diseases can lead to currency savings.

Keywords: Monoclonal Antibody, Diagnosis of disease, Serology, Marine Fishes