به نام خدا

راهنمای آزمایشگاه ایمونولوژی
ویژه دانشجویان دندانپزشکی دانشگاه شاهد

تهیه کنندگان:
خانم دکتر رویا یارائی (دانشیار گروه ایمونولوژی)
آقای داود جمالی (کارشناس گروه ایمونولوژی)

ویرایش فروردین ۹۸

فهرست مطالب

مقدمه: نکاتی در مورد درس ایمونولوژی عملی ۱
کار با سمپلر ۲
تست‌های گروه‌های خونی (ABO، Rh، Du) ۳
تست کراس مچ ۷
آگلوتیناسیون ذرات باکتری (تست رایت wright) ۹
تست غربالگری سیفیلیس VDRL یا RPR ۱۲
تست ASO (تست آنتی استرپتولیزین O) خنثی سازی توسط آنتی بادی ۱۵
تست CRP (C-Reactive protein) ۱۸
تست نیتروبلوتترازولیوم(NBT) ۲۱
بررسی سیستم کمپلمان بروش تیتراسیون و همولیتیک (تست CH50) ۲۳
رسوبگذاری در ژل (ایمونودیفوزیون) تست RID ۲۵
تست کومس (Coomb's Test) ۲۸
تست الایزا Enzyme – Linked Immunosobent assay (ELISA) ۳۱

مقدمه: نکاتی در مورد درس ایمونولوژی عملی

- **نمرهٔ این درس چطور تقسیم شده است؟**

۱. نمرهٔ آزمایشگاه شامل نظم کلاس و گزارش کار: ۳ نمره (توسط کارشناس آزمایشگاه)
۲. امتحان از مباحث تئوری آزمایشگاه: ۸ نمره امتحان عملی: ۹ نمره

- **چطور می‌توان نمره خوبی از نظم آزمایشگاه گرفت؟**

۱. حضور به موقع در کلاس (بدون تاخیر) و رعایت نظم در طی انجام آزمایشات
۲. مطالعهٔ جزوه مربوطه و آمادگی برای انجام آزمایش قبل از کلاس
۳. گزارش کار صحیح و تحویل به موقع آن (حداکثر تا جلسهٔ بعد)
۴. فعال بودن در کار گروهی
۵. در صورت استفاده از وسایل گروه‌های دیگر آنها را مجدداً به همان میز برگردانید تا موجب کسر نمره آنها نشود. ضمناً هر گروهی که در پایان آزمایش بر روی میز آنها وسیله‌ای اضافی (مثلاً ۲ عدد از یک وسیله) باشد بی‌نظم محسوب می‌شود.

- **گزارش کار را چطور بنویسیم؟**

۱. گزارش کار باید حاوی بخش‌های ذکر شده باشد: هدف آزمایش، نمونه مورد استفاده، جواب مشاهده شده، تفسیر جواب (در صورت متفاوت بودن جواب با آنچه انتظار داشتید و دلایل احتمالی آن) و پاسخ سؤالات مطرح شده در انتهای هر مبحث
۲. کلیات روش کار که در جزوه موجود است ضرورتی ندارد.
۳. گزارش کار شامل همهٔ این موارد حداکثر می‌تواند ۲ صفحه باشد.

- **چطور خودمان و دیگران سالم! از آزمایشگاه خارج شویم؟**

۱. همهٔ نمونه‌های انسانی را متعلق به بیمار و خطرناک تلقی کنید و به نکات ایمنی مطرح شده توسط کارشناس توجه بفرمائید.
۲. هر وسیلهٔ یکبار مصرفِ استفاده شده را بلافاصله در بشر مخصوص زباله روی سکوهای میزها بیندازید.
۳. برای کشیدن محلولها با پیپت، از پوآر استفاده نموده و از مکیدن بوسیله دهان جدا خودداری کنید.
۴. نمونه‌ها و بخصوص نمونه‌های بیمار را نخورید!!!!
۵. مواظب سرسوزنهای استفاده شده باشید و آنها را بدون درپوش بر روی میز رها نکنید و در هنگام دور انداختن حتماً درپوش آن را بگذارید.
۶. در صورت عدم رعایت موارد فوق و ایجاد هرگونه مشکل مانند فرورفتن سرسوزن سرنگ در بدن و یا بریدن دست با شئ آلوده یا خوردن محلول‌ها بلافاصله کارشناس آزمایشگاه را مطلع سازید.

- **چطور از وسایل و دستگاه‌ها استفاده کنیم؟**

۱. در ابتدای هر جلسهٔ آزمایشگاه نحوه کار با وسایل مورد نیاز آن جلسه شرح داده می‌شود. لطفا توجه کافی داشته باشید.
۲. یکی از ابزارهای رایج در این آزمایشگاه سمپلر است. لطفا طرز کار آن را خوب یاد بگرید تا ناچار به تقلا هنگام کار (و گاهی انهدام!) این ابزار مفید و گران قیمت نباشید و آزمایشتان هم خراب نشود. (توضیح ویژه در مورد کار با سمپلر در صفحهٔ ۲).
۳. از کار با وسیله‌ای که طرز کار آنرا نمی‌دانید بپرهیزید و در صورت نیاز از کارشناس آزمایشگاه کمک بگیرید و در صورت وجود هر گونه مشکلی هنگام استفاده از ابزار و دستگاه‌ها حتما کارشناس آزمایشگاه را مطلع سازید.

بقیهٔ مقررات آزمایشگاه ایمونولوژی

۱. آزمایشات بصورت گروهی انجام می‌شود و هر گروه از دو نفر تشکیل شده که بر روی یک میز مستقر می‌شوند و در طول ترم اعضاء گروه و میز کار هر گروه ثابت خواهدبود.
۲. پوشیدن روپوش سفید و بستن دکمه‌های آن الزامی است (از جمله در جلسهٔ امتحان عملی).
۳. وسایل یکبار مصرف استفاده شده (نظیر سرسمپلر، سرنگ، پنبه، کاغذ پارافیلم و ...) را بر روی میز کار جا نگذارید.
۴. وسایل شستنی را در پایان کار بشوئید و بر روی میز کار گروه قرار دهید.

کارشناس آزمایشگاه ایمونولوژی – داود جمالی

ایمونولوژی عملی دندانپزشکی ۰/۵ واحد (۸ جلسه) زمان: دوشنبه ۱۳-۱۵ مدرس: دکتر یارائی کارشناس: آقای جمالی

ردیف	عنوان آزمایش	زمان	تاریخ
۱	گروه خون و کراس مچ	دوشنبه ۱۳-۱۵	۹۸/۷/۲۲
۲	رایت و فلوکولاسیون (RPR)	دوشنبه ۱۳-۱۵	۹۸/۷/۲۹
۳	تست ASO	دوشنبه ۱۳-۱۵	۹۸/۸/۱۳
۴	تست CRP و NBT	دوشنبه ۱۳-۱۵	۹۸/۸/۲۰
۵	تست تیتراژ کمپلمان	دوشنبه ۱۳-۱۵	۹۸/۸/۲۷
۶	رسوبگذاری در ژل RID	دوشنبه ۱۳-۱۵	۹۸/۹/۴
۷	تست کومبس	دوشنبه ۱۳-۱۵	۹۸/۹/۱۱
۸	تست ELISA	دوشنبه ۱۳-۱۵	۹۸/۹/۱۸
	مرور	دوشنبه ۱۴-۱۵	۹۸/۱۰/۹

حداقل مهارتهای عملی مورد نیاز (طبق سرفصل وزارتخانه):

- آزمایشهای پرسیپیتاسیون در لوله و ژل، آگلوتیناسیون میکربی رایت یا ویدال، آگلوتیناسیون خونی تعیین ABO و Rh، آزمایش فلوکولاسیون VDRL، و اندازه گیری ASO را به طور مستقل انجام دهد.
- با مشاهده آزمایشهای الکتروفورز (جایگزین با الایزا)، تست کومس، کراس مچ، تیتراژ کمپلمان و تست NBT بتواند نحوه انجام آزمایش را بطور دقیق توضیح دهد.

کار با سمپلر

از سمپلر برای برداشتن حجم مشخص و جابجائی نمونه‌های مایع استفاده می‌شود. سمپلر ثابت فقط یک حجم معلوم و مشخص را جابجا می‌نماید ولی سمپلر متغیر قابل استفاده برای حجم‌های بین کمترین و بیشترین حجم تعیین شده می‌باشد.

برای کار با سمپلر ابتدا نوک سمپلر (یا سرسمپلر) مناسب را به سمپلر محکم کنید. بعد دکمه کنترل / فشار (Control button/Push button) سمپلر را به آرامی تا توقف اول دکمه پائین بیاورید، سپس سرسمپلر را چند میلیمتر (حدود ۳ میلی‌متر و بسته به حجم سمپلر) در مایع فرو برده و دکمه فشار را به آرامی رها کنید تا مایع وارد نوک سمپلر شود، برای تخلیه در لوله یا ظرف مورد نظر، با فشار مجدد دکمه تا توقف اول، محلول را با تماس به جداره ظرف به آرامی خارج کرده و پس از ۳-۱ ثانیه با فشار تا توقف دوم، باقیمانده محلول را نیز کاملاً خارج نمائید.

- نکات مهمی که در کار با سمپلر می‌بایست رعایت شود، عبارتند از:

۱- اطمینان از اتصال کامل نوک سمپلر به سمپلر

۲- عمود نگهداشتن سمپلر در زمان مکش

۳- تخلیه محلول با تماس نوک سمپلر به جداره ظرف تحت زاویه ۱۰ تا ۴۰ درجه

۴- رها کردن آرام دکمه در زمان پر یا خالی کردن محتویات نوک سمپلر

۵- کشیدن کناره‌های خارجی نوک سمپلر پس از انجام مکش به جداره‌های فوقانی لوله به منظور حذف قطرات خارجی نوک سمپلر

۶- هنگام تخلیه محلول پس از پائین آوردن دکمه کنترل تا مرحله اول باید کمی تامل کرد (۳-۱ ثانیه) و سپس دکمه را تا توقف دوم پائین آورد.

۷- ضربه به سمپلر می تواند این وسیله را از کالیبراسیون خارج نماید.

۸- در هر موردی باید سرسمپلر مناسب انتخاب شود تا حجم محلول برداشتی بیش از حد نبوده و مایع وارد قسمت‌های داخلی دستگاه نگردد.

۹- هرگز نباید سمپلرهای متغیر را بر روی حجمی خارج از محدوده حجم ادعائی آن تنظیم کرد.

۱۰- تماس دست با نوک سمپلر آلوده ممنوع است.

۱۱- هرگز نباید سمپلر حاوی محلول به پهلو روی میز گذاشته شود.

۱۲- در صورت مکش محلول‌های اسیدی و سایر مواد با خاصیت خورندگی به کارشناس آزمایشگاه اطلاع دهید.

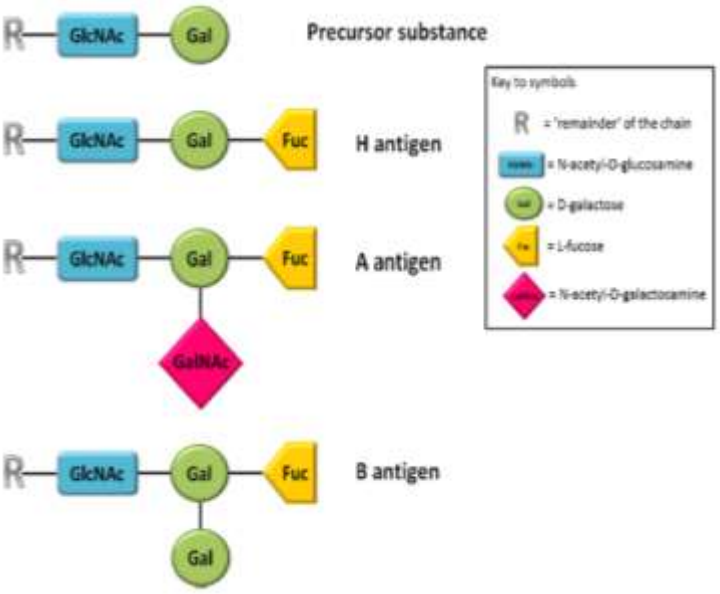
تست‌های گروه‌های خونی (ABO، Rh، Du)

مقدمه (گروه‌های خونی)

هر سیستم گروه خونی از آنتی‌ژن‌هایی تشکیل شده است که توسط الل‌های مختلف یک ژن (یا چند ژن بسیار نزدیک و مرتبط به یکدیگر) ساخته می‌شوند و بر سطح گلبول‌های قرمز حضور دارند. این آنتی‌ژن‌ها می‌توانند از جنس پروتئینی یا کربوهیدرات‌های متصل به پروتئین یا لیپید باشند. اولین سیستم گروه خونی در شروع قرن بیستم توسط لندشتاینر معرفی شد؛ او مشاهده کرد که اریتروسیت‌های بعضی از افراد در مجاورت سرم سایر افراد بصورت توده در می‌آیند (آگلوتیناسیون)، حال اینکه این اتفاق در حضور سرم خود همان افراد رخ نمی‌دهد. لندشتایز با استفاده از این روش گلبول‌های قرمز را به چهار گروه تقسیم‌بندی نمود: A، B، AB و O. امروزه مشخص شده که این آنتی‌ژن‌ها از جنس کربوهیدرات هستند و در سطح اریتروسیت‌ها (و سایر سلول‌های بدن) حضور دارند. تا به حال بیش از ۶۰۰ آنتی‌ژن اریتروسیتی (نزدیک به ۴۰ گروه خونی) معرفی شده‌اند.

سیستم ABO یا سیستم ABH

سیستم ABO مهمترین سیستم گروه خونی است. شاخص‌های آنتی‌ژنیک در این سیستم ملکول‌های کربوهیدراتی هستند که توسط انزیم‌های گلیکوزیل ترانسفراز به ماده H اضافه می‌شوند. لذا برای شکل‌گیری آنتی‌ژن‌های A و B توسط این انزیم‌ها، وجود ساختمان پایهٔ کربوهیدراتی به نام مادهٔ H (به عنوان سوبسترای این آنزیم‌ها) ضروری است. برای تشکیل این ماده، محصول ژن H یک قند فوکوز به انتهای زنجیره قندی پایه یا پیش‌ساز اولیه (که روی پروتئین‌ها یا لیپیدهای سطح سلول وجود دارد) اضافه می‌کند و H تشکیل می‌شود.



شکل ۱ –ساختمان آنتی‌ژن‌های ABO

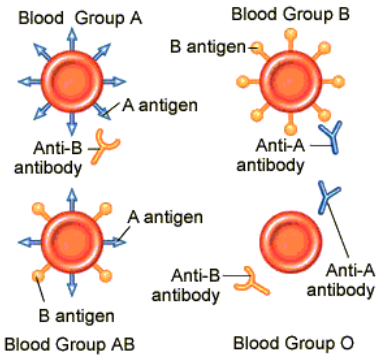
انزیم‌های ترانسفراز که گروه‌های خونی ABO را ایجاد می‌کنند خودشان محصول ژن‌های آللیک A، B و O هستند. جایگاه ژنی H (کروموزوم ۱۹) و ABO (کروموزوم ۹) مستقل می‌باشند. به این ترتیب که افراد گروه A علاوه بر ژن H دارای ژن A (بیان‌کننده آنزیم الفا–ان– استیل–گالاکتوزامینیل ترانسفراز) هستند که باعث انتقال N–استیل گالاکتوز آمین به ماده H می‌شود و گروه خونی A را می‌سازد. افراد گروه B در همین جایگاه ژنی یا لوکوس، دارای ژن B (کنترل کننده آنزیم الفا–گالاکتوزیل ترانسفراز) هستند که باعث انتقال دی–گالاکتوز به ماده H می‌شود. در صورت وجود ژن O (Zero) در این لوکوس فعالیت انزیمی وجود ندارد و هیچگونه انتقالی صورت نمی‌گیرد و ماده H دست نخورده می‌ماند یعنی جزء دیگری به این ساختمان پایه اضافه نمی‌شود (گروه خونی O یا H)، ولی در افراد گروه AB هر دو الل A و B وجود دارد (هر کدام روی یک کروموزم) و لذا هر دو نوع آنتی‌ژن بر سطح گلبول‌های قرمز دیده می‌شود.

گروه A دارای چند زیرگروه فرعی مثل A1, A2, A3 و چندین گروه بسیار نادر Am, Ax, Ael است و گروه B دارای زیرگروه فرعی Bm, Bx, Bel که تفاوت آن‌ها عموما بر اساس مقدار آنتی‌ژن روی غشاء سلول و نحوهٔ قرار گرفتن آنها می‌باشد. در انتقال خون ناسازگاری گروه‌های خونی فرعی نیز می‌تواند موجب ایجاد واکنش شود.

اگر ژن H فعال وجود نداشته باشد (h/h) گروه خون بمبئی– Bombay – نامیده می‌شود که فاقد فنوتیپ A یا B است.

ایزوهماگلوتینین‌ها:

افراد نسبت به آنتی‌ژن‌های گروه خونی خودشان واکنشی نشان نمی‌دهند ولی بر ضد آنتی‌ژن‌های گروه خونی که فاقد آن هستند؛ بطور طبیعی آنتی‌بادی تولید می‌نمایند. افراد گروه خونی A دارای anti-B در سرمشان می‌باشند؛ افرادی که گروه خونی B هستند در سرمشان دارای anti-A می‌باشند؛ افراد گروه خونی O دارای anti-B و anti-A می‌باشند و دارندگان گروه خونی AB فاقد این آنتی‌بادی سرمی می‌باشند. بر این اساس مشخص می‌شود که کدام گروه خونی سازگار با بیمار و قابل انتقال است.



شکل۲-گروه‌های خونی و آنتی‌بادی

آنتی بادی سرمی	آنتی‌ژن اریتروسیتی	گروه خونی
antiA , antiB	H	O
antiB	A	A
antiA	B	B
-	A , B	AB
antiA , antiB , antiH	–	بمبئی

آنتی بادی های ضد آنتی‌ژن‌های B و A اغلب از نوع IgM بوده جزو آنتی‌بادی‌های طبیعی محسوب می‌شوند که اصطلاحاً آنها را ایزوآگلـوتینین و در این مورد ایزوهمآگلوتینین می‌نامند. وجود آنتی‌بادی‌های طبیعی در سرم افراد بر ضد گروه‌های مخالف می‌تواند ناشی از تحریک آنتی‌ژنیک توسط مواد بسیار معمولی و شایع باشد. در باکتری‌های روده و گیاهان مواد شیمیایی مشابه با آنتی‌ژن‌های B و A شناخته شده است که با این آنتـی‌ژن‌هـا واکنش متقاطع دارند.

آنتی‌بادی‌های طبیعی در اطفال از ۶-۳ ماهگی قابل شناسایی می‌باشند. در سنین ۱۰-۵ سالگی مقدار آنها به حداکثر می‌رسـد و بـا افـزایش سـن و برخی از حالات نقص ایمنی کاهش می‌یابند. نوزاد پس از تولد حین تماس با میکروفلور دستگاه گوارش می‌تواند مواردی که ساختمان پلی‌ساکاریدی مشابه با خودش دارند را تحمل نموده و در برابر سایرین پاسخ ایمنی هومورال تولید کند. در نتیجه پس از مدتی تیتـر ایزوآگلـوتینین‌هـا در سـرمش افزایش یافته و سپس به حد بالغین می‌رسد. بنابراین تعیین نوع گروه خونی بر اساس سرم و نوع آنتی‌بادی طبیعی آن نیز امکان‌پذیر است.

ترشحی (سکرتور):

ترشح آنتی‌ژن‌های گروه خونی ABO در مایعات بدن (بزاق؛ عرق؛ شیر و غیره) توسط آلل‌های ژن Se و se کنترل می‌شود. این ژن‌هـا مسـتقل از ژن‌های ABO بوده و بصورت هم‌بارز به ارث می‌رسند. ۸۰ درصد از مردم از گروه Se هستند. ژن Se نوع اتصال قنـد گـالاکتوز بـه ان–اسـتیل–گلوکزآمین در ساختار تتراساکاریدی پایه را کنترل می‌کند. بدین صورت که ژن Se با تشکیل پیوند β1-3 بین گالاکتوز و ان–استیل–گلوکزآمین و ایجاد گانگلوزید تیپ ۱ و ژن se با تشکیل پیوند β1-4 و ایجاد گانگلوزید تیپ ۲ به ترتیب فرم ترشحی و فرم غشایی را می‌سازد. این ژن‌ها علاوه بر ABH؛ بر آنتی‌ژن‌های فرعی دیگری مثل لوئیس را نیز تاثیر دارند. در مطالعات جنائی و قضائی از مایعات بـدن مـی‌تـوان بـرای شناسـایی ایـن آنتی‌ژن‌ها استفاده نمود.

گروه خونی Rh – رزوسRhesus:

اولین بار در سطح گلبول های قرمز میمون رزوس (Rh) آنتی‌ژن‌های سیستم Rh دیده شد که ساختمان آن از جنس پروتئین می باشد. سیستم Rh پس از ABO مهمترین گروه خونی محسوب می‌شود. آنتی‌بادی‌های ضدRh باعث بیماری همولیتیک نوزادان و همچنین واکنش‌هـای همولیتیـک ناشی از انتقال خون می‌شوند. آنتی‌بادی طبیعی بر علیه این آنتی‌ژن‌ها وجود ندارد ولی در اثر تماس فرد فاقد آنتـی‌ژن (Rh^-) بـا گلبـول‌هـای قرمـز دارای آنتی‌ژن (Rh^+) در بدن وی آنتی‌بادی ساخته می‌شود که معمولا از نوع IgG است. این سیستم چند آنتی‌ژن دارد که مهمترین آنها آنتی‌ژن D است و افراد بر اساس آن Rh^+ یا Rh^- محسوب می‌شوند. از نظر بالینی Rh مثبت (Rh^+) به معنی وجود آنتی‌ژن D و Rh^- دلیـل بـر عـدم وجـود آنتی‌ژن D است. یک فرد سالم به هیچ وجه آنتی‌سرم D (anti-D) ندارد. این آنتی‌بادی‌ها در فرد Rh^- و فقـط در حالـت‌هـای غیـر عـادی ماننـد ناسازگاری‌های خونی anti-D در فرد به وجود می‌آیند. بر همین اساس تستی بنام کومبس جهت تشخیص این ناسازگاری‌ها طراحی شده است.

آنتی بادی های ضد گروه خونی Rh اصطلاحا از نوع گرم و IgG می‌باشد ولی ایزو اگلوتیناسیون سیستم ABO از نوع سرد و IgM مـی‌باشـد. از ان‌جایی که ساختمان IgM پنتامر و IgG مونومر است بنابراین قدرت اگلوتیناسیون IgM بسیار بیشتر از IgG می‌باشد. از طرف دیگر شاخص های انتی‌ژنی سیستم Rh در مقایسه با ABO، در سطح گلبول‌های قرمز بسیار کمتر و پراکنده‌تر است، بنابراین تشکیل شبکه آگلوتیناسیون با آنتی‌بـادی اختصاصی، در سیستم Rh مشکلتر از سیستم ABO می‌باشد.

فنوتیپ Du :

فنوتیپ Du یا آنتی ژن ضعیف D حدود ۱٪ موارد Rh مثبت را شامل می‌شود و با سازکارهای ژنتیکی مختلف ایجاد می‌شود به طور مثال جهش‌هایی که منجر به بیان ضعیف آنتی‌ژن D می‌گردند و یا جهش یا ترکیب‌های ژنتیکی در جایگاه D که منجر به از دست دادن برخی اپی‌توپ های آنتی‌ژن D می‌شوند و ممکن است در آزمایشگاه به عنوان Rh- تشخیص داده شوند در حالیکه در بدن افراد Rh- مشکلات گلبول قرمز Rh+ معمولی را ایجاد کنند. بنابراین نمونه های خونی که Rh منفی شناخته شده‌اند، اگر برای دهنده خون است باید معرف کومبس به آن اضافه شود تا موارد فنوتیپ Du تشخیص داده شود. فنوتیپ Du به عنوان گروه خونی Rh مثبت در نظر گرفته می‌شود.

گروه‌های خونی فرعی دیگری مثل kell، Duffy، لوئیس و.... وجود دارد که در افرادی با انتقال خون‌های مکرر اهمیت پیدا می‌کند.

کاربرد :

۱. جهت سازگاری بین دهندگان وگیرندگان خون

۲. پیشگیری از ایمیونیزاسیون مادران Rh منفی بـر علیـه آنتـی‌ژن D نـوزاد در دوران بـارداری یـا هنگام زایمان
۳. در پزشکی قانونی جهت رد ابّوت و جمعیت شناسی و ژنتیک

شکل۶ –هماگلوتیناسیون

روش کار و تفسیر نتایج تعیین گروه خون

روش مستقیم (تعیین گروه خونی از روی گلبولهای قرمز یا Cell Typing)

اساس این آزمایش هماگلوتیناسیون است و به دو روش قابل انجام است: روش اسلایدی و روش لوله

روش اسلایدی:

۱. توسـط لانسـت در نـوک انگشـت خـود سـوراخی ایجـاد نمائید.
۲. سه قطره از خون خـود را در سه نقطه اسلاید قرار دهید.
۳. یـک قطـره از هـر کـدام از جداگانه روی قطره خون بریزید.

قطره‌خون anti-D	قطره‌خون anti-B	قطره‌خون anti-A
●●	●●	●●

آنتـی‌سـرم‌هـای A، B و D را بـه طـور

۴. این دو را کاملاً با هم مخلوط کرده و واکنش آگلوتیناسیون را ملاحظه نمائید. (حداکثر در دو دقیقه)

- گروه‌های خونی مختلف به این صورت جواب می‌دهند:

ABO Group	آگلوتیناسیون با Anti-A	آگلوتیناسیون با Anti-B
A	+	−
B	−	+
AB	+	+
O	−	−

روش غیر مستقیم: تعیین گروه خونی از روی سرم بیمار Serum Typing (Back typing)

تعیین گروه خونی در لوله و با استفاده از سوسپانسیون گلبول قرمز نیز امکان‌پذیر است.

۱. دو قطره از سرم مجهول را در دو نقطه اسلاید قرار دهید.
۲. یک قطره از سوسپاسیون گلبول‌های قرمز A را بر روی یکی از قطره‌ها و یک قطره از سوسپاسیون گلبول‌های قرمز B را بر روی قطـره دیگـر قـرار دهید (سوسپانسیون گلبولی ۵-۲٪ تهیه شده در سرم فیزیولوژی: برای تهیه این سوسپانسیون پس از شستشوی گلبـول‌هـای قرمـز و سـانتریفوژ از فشرده آنها سه میکرولیتر برداشته و به حجم ۱۰۰ میکرولیتر می‌رسانیم، این نسبت‌ها بر حسب نیاز می‌تواند تغییر کند).

قطره سرم B Cell	قطره سرم A Cell
●●	●●

۳. قطره‌های کنار هم را کاملاً با هم مخلوط کـرده و واکـنش آگلوتیناسـیون را ملاحظه نمائید. (حداکثر در دو دقیقه)

- گروه‌های خونی مختلف به این صورت جواب می‌دهند:

آگلوتیناسیون با B Cell	آگلوتیناسـیون بـا A Cell	ABO Group
+	−	
−	+	
−	−	
+	+	

روش غیرمستقیم (و بررسی Du)

اگر در نمونه حاوی آنتی سرم D آگلوتیناسیون دیده شود، فرد Rh مثبت است. اما اگر آگلوتیناسیون دیده نشود، فرد Rh منفی و یا Du می‌باشد. به همین دلیل برای اطمینان از منفی بودن جواب آزمایش در صورت عدم مشاهده آگلوتیناسیون یک بار شست و شو انجـام مـی‌گیـرد و سـپس آنتـی هیومن گلوبولین (AHG) اضافه می‌شود. در صورت مشاهده آگلوتیناسیون فرد Du می‌باشد. اساس این تست هماگلوتیناسیون غیرمستقیم است.

روش لوله:

۱. در سه لوله آزمایش یک قطره از سوسپانسیون گلبولی ۵-۲٪ می‌ریزیم.
۲. به یکی Anti A ، به دیگری Anti B و به سومی Anti D اضافه می‌کنیم.

۳. لوله را به مدت ۱۵ الی ۳۰ ثانیه در دور ۳۰۰۰rpm یا به مدت یـک دقیقـه در دور ۱۰۰۰rpm سانتریفوژ می‌کنیم.
۴. لوله‌ها را تکان داده حضور یا عدم حضور آگلوتیناسیون را در آنها بررسی می‌کنیم.

Rh	آگلوتیناسیون با Anti D
Rh^+	+
Rh^-	-

در گزارش‌کار خود پاسخ دهید:

۱. گروه خون شما چیست؟
۲. آیا در روش غیرمستقیم تعیین Rh فرد امکان‌پذیر است؟ توضیح دهید.
۳. چرا در افراد بمبئی گروه خون ABO در خون قابل تشخیص نیست؟
۴. تعیین گروه خونی به روش مستقیم برای چه افرادی امکان پذیر نیست؟

منابع:

۱. پاکزاد، پرویز؛ اصول و تفسیر آزمایشهای سرولوژی بالینی؛ چاپ هفتم، مؤسسه فرهنگی انتشاراتی نور دانش، تهران،۱۳۸۱.
۲. قلعه نویی، بهنام؛ سرولوژی و ایمونولوژی کاربردی همراه با اصول و تفسیر آزمایش‌ها؛ ۱۳۹۶.
۳. رضایی‌پور کاردوست؛ ربابه :سرولوژی ؛ ایمونولوژی و ایمونوشیمی آزمایشگاهی؛انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران؛ ۱۳۶۹.
۴. غفاری، سید حمیدالله؛ مطالعات موردی در ایمونولوژی بالینی، ویرایش سوم، نشر طبیب، تهران، پائیز ۱۳۸۲.
5. Howard PR, Blaney KD. Basic and applied concepts of immunohematology. Mosby Publication, 1993, ch.13.

تست کراس مچ

مقدمه – انتقال خون و سازگاری گروه خونی

آزمون کراس مچ جهت بررسی سازگاری سیستم ایمنی گیرنده با خون تزریق شده در شرایطی که احتمال بروز مشکل مطرح باشد به کار میرود (بعد از تعیین گروه خون سیستم ABO گیرنده و دهنده و قبل از انتقال خون). این تست وجود آنتی‌بادی خارج از انتظار در سرم فرد گیرنده بر علیه آنتی‌ژن‌های مختلف (از جمله گروه‌های خونی فرعی و غیره) که در سطح سلول‌های دهنده قرار دارند را بررسی می‌کند. برای این منظور گلبول قرمز دهنده را با سرم گیرنده مجاور می‌کنند. در این حال اگر سرم حاوی آنتی‌بادی باشد به گلبول‌های قرمز متصل می‌شود.

این تست معمولا روی سرم گیرنده و گلبول هر کیسه خون به طور جداگانه انجام می‌شود که به آن کراس مچ ماژور گفته می‌شود و در کراس مچ مینور روی گلبول قرمز گیرنده و سرم دهنده خون انجام می‌شود. خونی قابل انتقال است که هیچگونه واکنش در لوله‌های آزمایش و در هیچ شرایطی ایجاد نکند. (شکل دیگری از تست کراس مچ در آزمایشات رایج قبل پیوند برای بررسی حضور آنتی‌بادی علیه HLA عضو پیوندی در بدن گیرنده انجام می‌گیرد.)

روش کار و تفسیر نتایج تست کراس مچ

این ازمایش به دو روش ماژور و مینور انجام می‌شود.

۱) روش آزمایش کراس مچ ماژور:

الف) مرحله اول یا فاز سرم فیزیولوژی:

۱) دو لوله آزمایش کوچک با شماره های یک و دو مشخص کنید و به ته لوله‌ها دو قطره سرم تازه گیرنده خون بریزید.

۲) یک قطره از سوسپانسیون گلبول های قرمز ۵٪ خون دهنده را به ته لوله شماره یک و دو اضافه کنید.

۳) دو لوله را تکان داده و در حرارت اتاق به مدت ۱۵ دقیقه قرار دهید و لوله ها را به مدت کوتاهی (حدود ۳۰ثانیه تا یک دقیقه) در ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ نمایید.

۴) محلول بالای دو لوله را برای همولیز نگاه کنید و سپس به آرامی لوله را تکان داده و در صورت وجود آگلوتیناسیون نتایج را یادداشت و گزارش نمایید. و اگر همولیز یا آگلوتیناسیون مشاهده نشد مرحله دوم آزمایش را ادامه دهید.

ب) مرحله دوم یا فاز گرما و آلبومین:

۱) به ته دو لوله آزمایش به هر کدام مقدار دو قطره از محلول آلبومین گاوی ۳۰٪ اضافه نموده و لوله ها را تکان دهید.

۲) لولها را به مدت ۱۵ الی ۳۰ ثانیه در بن ماری ۳۷ قرار دهید و به مدت کوتاهی سانتریفوژ کرده تا گلبول ها رسوب کنند .

۳) لوله‌ها را به آرامی از سانتریفوژ بیرون آورده و تکان داده و نتیجه را در صورت بروز آگلوتیناسیون یادداشت نمایید. اگر آگلوتیناسیون مشاهده نشود مرحله سوم آزمایش را ادامه می‌دهیم.

ج)مرحله سوم یا فاز کومبز یا آنتی گاما گابولین:

۱) لوله شماره ۱و۲ را با سرم فیزیولوژی پر کرده و سپس سانتریفوژ کرده تا شسته شوند و این کار را سه مرتبه انجام می دهیم.

۲) به هر یک از لوله ها یک یا دو قطره از سرم کومبس (آنتی گاما گلبولین انسانی) اضافه می‌کنیم و لوله‌ها را تکان داده تا گلبول‌ها از ته لوله کنده شده و با سرم کومبس مخلوط شوند دو لوله آزمایش را به مدت کوتاهی سانتریفوژ می‌کنیم.

۳) لوله‌ها برای وجود یا عدم وجود آگلوتیناسیون بررسی می‌کنیم. در صورت مشکوک بودن می‌توانید محتویات لوله‌های آزمایش را بر روی لام ریخته و آگلوتیناسیون واقعی را از کاذب در زیر میکروسکوپ مشاهده کنید.

۲) آزمایش کراس مچ مینور:

روش این آزمایش کاملا مانند آزمایش ماژور است ولی با این تفاوت که از گلبول‌های قرمز گیرنده خون و سرم دهنده خون استفاده می‌شود. اهمیت کراس مچ مینور کمتر از ماژور است. در موارد نادری ممکن است دهنده خون بر علیه آنتی‌ژن‌های گروه خون گیرنده خون حساس باشد و تزریق خون کامل موجب بروز حوادثی شود در چنین مواردی اگر آزمایش کراس مچ مینور مثبت شود تزریق گلبول‌های قرمز تخلیص شده معمولا بی‌خطر است.

در گزارش‌کار خود پاسخ دهید:

۱. نتیجه تست کراس مچ را گزارش دهید؟
۲. ناسازگاری کراس مچ نتیجه وجود آنتی‌بادی علیه چه آنتی‌ژنی است؟

منابع:

۶. پاکزاد، پرویز؛ اصول و تفسیر آزمایشهای سرولوژی بالینی؛ چاپ هفتم، مؤسسه فرهنگی انتشاراتی نور دانش، تهران،۱۳۸۱.

۷. قلعه نویی، بهنام؛ سرولوژی و ایمونولوژی کاربردی همراه با اصول و تفسیر آزمایش ها؛ چاپ اول،۱۳۹۶.

۸. محمد وجگانی،...

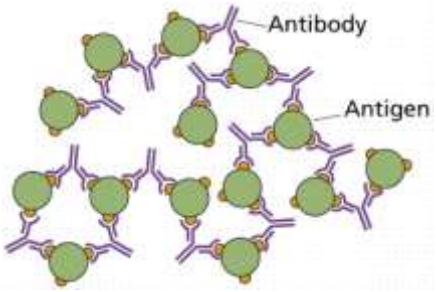
۹. رضایی‌پور کاردوست؛ ربابه :سرولوژی ؛ ایمونولوژی و ایمونوشیمی آزمایشگاهی؛انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران؛ ۱۳۶۹.

۱۰. غفاری، سید حمیدالله؛ مطالعات موردی در ایمونولوژی بالینی، ویرایش سوم، نشر طبیب، تهران، پائیز ۱۳۸۲.

11. Howard PR, Blaney KD. Basic and applied concepts of immunohematology. Mosby Publication, 1993, ch.13.

آگلوتیناسیون ذرات باکتری (تست رایت wright)

مقدمه



شکل ۱- شبکه حاصل از آگلوتیناسیون

مکانیسم تستwright به صورت واکنش مجموعهٔ مشابهی از آنتی‌بادی‌ها با آنتی‌ژن‌های ذره‌ای مثل باکتری؛ مخمر یا گلبول قرمز در شرایط مناسب به صورت آگلوتیناسیون مشاهده می‌شود. در این حالت شبکه‌ای از آنتی‌بادی‌هایی که مثل پل بین آنتی‌ژن‌ها قرار گرفته‌اند تشکیل می‌شود که نتیجهٔ آن با چشم قابل مشاهده است (شکل یک). بر سطح یک سلول اپی‌توپ‌های متعددی وجود دارد که آنتی‌بادی‌های دو یا چند ظرفیتی اختصاصی می‌توانند با آنها واکنش نمایند. مهمترین آنتی‌بادی آگلوتینه‌کننده IgM و در درجه بعد IgG است در مواردی شاهد حضور IgA هستیم که قدرت اگلوتیناسیون بسیار ضعیفی دارد. تست آگلوتیناسیون کاربردهای بالینی زیادی دارد و از آن در تعیین گروه خون؛ تعیین عیار (تیتر) آنتی‌بادی سرم وتعیین نوع سلول باکتریایی استفاده می‌شود.

هدف تست: از بین تستهای آگلوتیناسیون با باکتری می‌توان به تست‌های رایت و ویدال اشاره کرد که مکانیسم مشابهی دارند. هدف از تست رایت تشخیص بیماری بر اساس وجود آنتی‌بادی ضد بروسلا و تعیین عیار آنتی‌بادی در بیماران مشکوک به عفونت بروسلایی (عامل بروسلوز یا تب مالت) می‌باشد. در عفونت ناشی از عوامل بیماری‌زای خاص (نظیر سالمونلاها؛ بروسلاها و غیره) در سیستم گردش خون بیمار در مقابل آن باکتری، آنتی‌بادی‌های اختصاصی تولید می‌شود که در مورد بسیاری از عوامل بیماری‌زا قدرت آگلوتینه‌کردن سوسپانسیون کشته‌شدهٔ باکتری (حاوی آنتی‌ژن) را دارند. بدین ترتیب با استفاده از آگلوتیناسیون می‌توان وجود آنتی بادی‌های فرد آلوده را در سرم شناسایی و عیار آن را مورد بررسی قرار داد. البته گاهی اوقات ممکن است در میزبان آلوده پاسخ مناسبی به آنتی‌ژن میکروبی ایجاد نشود و لذا همیشه پاسخ منفی نشان‌دهنده عدم وجود آلودگی نیست (مثلا در افراد دچار نقص ایمنی). با کمک آگلوتیناسیون علاوه بر بررسی وجود آنتی‌بادی در سرم بیمار می‌توان نوع میکروارگانیسم آلوده کننده را نیز تعیین کرد (مانند تست ویدال در تشخیص سالمونلا).

تشخیص قطعی بروسلا بر اساس جدا کردن گونه‌های بروسلا از کشت خون؛ مغزاستخوان یا بافت است که در ابتدای بیماری گرفته می‌شود. نتایج کشت مغز استخوان بالاتر از کشت خون است اما با توجه به کند بودن رشد باکتری و موارد منفی کاذب از تست سرولوژی استفاده می‌شود. علاوه بر آگلوتیناسیون تستهای سرولوژیک دیگری نیز برای تشخیص بروسلوز قابل انجام است (از جمله با استفاده از روش الایزا و ایمونواسی). جهت تشخیص سریع تب مالت آزمایش رزبنگال طراحی گردیده است. آزمایش رزبنگال در منابع مختلف به اسامی رزبنگال پلیت تست، کاردتست (Card test)، آزمون سریع یا راپید (Rapid test) و غیره نامیده می‌شود. در ایران آنتی‌ژن این تست از کلنی‌های صاف (Smooth) بروسلا آبورتوس (سویه ۹۹ یا ۱۹) که فاکتورهای آنتی‌ژنی مشترکی با دیگر سویه‌های بروسلا دارند تهیه می‌شود. برای انجام تست آنتی‌ژن رزبنگال و سرم بیمار (یک قطره از هر کدام) روی یک صفحه شیشه‌ای یا سفید با هم مخلوط می‌گردد و نتیجه (آگلوتیناسیون) بررسی می‌شود.

آزمون سریع یا راپید (Rapid test) با رز بنگال متفاوت است

روش کار و تفسیر نتایج تست رایت

تست رایت به دو روش قابل انجام می‌باشد که روش دوم در این آزمایشگاه انجام می‌شود:

الف ـ روش اسلایدی (مانند تستCRP البته با رقتهای مختلف جهت تعیین عیار آنتی‌بادی)

ب ـ روش لوله‌ای

روش لوله ای:

۱- ۱۱ لوله را در جا لوله‌ای قرار دهید.

۲- در لوله اول ۰/۹ میلی‌لیتر و در لوله‌های بعدی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی بریزید.

۳- به لوله اول ۰/۱ میلی‌لیتر سرم بیمار را اضافه کرده و مخلوط نمائید.

۴- از لوله اول ۰/۵ میلی‌لیتر به لولهٔ دوم اضافه‌کرده وبعداز مخلوط کردن ۰/۵ میلی‌لیتر از لولهٔ دوم به لولهٔ سوم منتقل‌نموده و این کار را تا لولهٔ دهم ادامه دهید.

۵- از لولهٔ دهم پس از مخلوط کردن ۰/۵ میلی‌لیتر دور بریزید. به این ترتیب حجم سرم رقیق شده در تمامی لوله‌ها برابر ۰/۵ خواهد بود و لولهٔ شماره ۱۱ بعنوان کنترل آنتی‌ژن بوده وفاقد سرم می‌باشد.
(شماره‌های ۲ تا ۵ مراحل رقت‌سازی می‌باشد)

۶- به تمامی لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۵ میلی‌لیترآنتی‌ژن رقیق شده مورد نظر (برای تست رایت آنتی‌ژن بروسلا) اضافه نمائید. (آنتی‌ژن به نسبتی که روی بر چسب آن یا در دستور کار همراه آن نوشته شده رقیق می‌شود.)

۷- لوله‌ها را با پارافیلم ببندید و جالوله را با لوله‌های آزمایش به آرامی تکان دهید تا آنتی‌ژن با محتویات لوله مخلوط شود.

مراحل فوق در جدول زیر خلاصه شده است:

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
سرم فیزیولوژی(ML)	۰/۹	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
سرم بیمار(ML)	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	---
	↺	↺	↺	↺	↺	↺	↺	↺	↺	↺	
آنتی‌ژن (ML)	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
تیتر نهایی سرم	۱/۲۰	۱/۴۰	۱/۸۰	۱/۱۶۰	۱/۳۲۰	۱/۶۴۰	۱/۱۲۸۰	۱/۲۵۶۰	۱/۵۱۲۰	۱/۱۰۲۴۰	شاهد

۸- جالوله‌ای را بمدت ۲۴ساعت در بن‌ماری ۳۷درجه قرار دهید.

۹- در پایان زمان ذکر شده؛ جالوله‌ای را با احتیاط از بن‌ماری بیرون آورده مطابق روش زیر یکی از رقت‌ها را بعنوان عیار آنتی‌بادی اعلام نمائید.

روش خواندن جواب تست:

یکی از رقتها بعنوان عیار آنتی‌بادی یا تیتر نهایی سرم اعلام میشود.

تیتر نهایی سرم رقت آخرین لوله‌ای می‌باشد که درجه آگلوتیناسیون آن لوله +۲ یا بالاتر باشد یعنی بیشتر از۵۰٪ آنتی‌ژن آن آگلوتینه شده باشد.

بنابراین لازم است تمام لوله‌ها از +۱ تا +۴ درجه‌بندی شوند، برای این کار بدین ترتیب عمل می‌نمائیم:

۱- چنانچه تمام آنتی‌ژن موجود در لوله آگلوتینه شده و مایع بالای رسوب کاملا شفاف باشد درجهٔ آگلوتیناسیون آن لوله +۴ می‌باشد.

۲- اگر تقریبا ۷۵٪ آنتی‌ژن موجود در لوله آگلوتینه شده و مایع بالای رسوب کمی کدر باشد درجهٔ آگلوتیناسیون آن لوله +۳ می‌باشد.

۳- اگر تقریبا ۵۰٪ آنتی‌ژن موجود در لوله آگلوتینه شده و مایع بالای رسوب نسبتا کدر باشد درجهٔ آگلوتیناسیون آن لوله +۲ می‌باشد.

۴- اگر تقریبا ۲۵٪ آنتی‌ژن موجود در لوله آگلوتینه شده و مایع بالای رسوب کدر باشد درجهٔ آگلوتیناسیون آن لوله +۱ می‌باشد.

۵- چنانچه هیچ رسوبی در ته لوله مشاهده نشود و مایع لوله کاملا کدر باشد (لوله ۱۱ اینگونه می‌شود) درجهٔ آگلوتیناسیون آن لوله – است. لازم به توضیح است که تمام حالات فوق ممکن است پیش نیاید و از درجهٔ +۴ یا +۳ به درجهٔ – برسیم بنابراین آخرین لوله با درجهٔ بالاتر از +۲ جواب تست می‌باشد.

تفسیر جواب:

تیتر نهایی سرم می‌تواند تا حدی شدت بیماری را نشان دهد. هر چه تیتر نهایی به لوله‌های انتهائی نزدیکتر شود در واقع نشان میدهد که مقدار آنتی‌بادی با آنکه رقیقتر شده اما به بدلیل حاد بودن بیماری و زیاد بودن مقدار آنتی‌بادی در سرم هنوز قدرت آگلوتینه‌کردن ذرات باکتری را دارد. البته برای هر باکتری خاص یک مرز حاد بودن بیماری براساس تیتر نهایی مشخص شده است که در مورد بروسلا و تست رایت این مرز؛ رقت ۱:۸۰ می‌باشد یعنی:

تیتر نهایی قبل از ۱:۸۰ سالم

تیتر نهایی برابر ۱:۸۰ مشکوک و احتمالا در حال پیشرفت بیماری (تکرار تست یک هفته بعد)

تیترنهایی بعد از ۱:۸۰ احتمالا بیمار

نکات:

همانطور که اشاره شد در بیماری بروسلوز افزایش تیتر آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های بروسلا مشاهده می‌شود که شروع آن با IgM است و به دنبال آن افزایش IgG دیده می‌شود. در صورت بهبود بیماری تیتر IgG بتدریج ظرف چند ماه کاهش پیدا می‌کند ولی در صورت عدم معالجه تیتر آن رو به افزاش می‌گذارد. بررسی دو نمونه متوالی از سرم که افزایش یا کاهش تیتر آنتی‌بادی را نشان دهد می‌تواند روند بیماری را روشن سازد.

معمولا تیتر۱:۸۰ و بالاتر مثبت تلقی می‌شود ولی در افرادی که به دلیل شغلی در تماس مداوم با میکروب بروسلا یا واکسن آن هستند (مثل دامپزشکان یا عرضه کنندگان محصولات دامی) گاهی اوقات تیتر به ۱:۳۲۰ می‌رسد. این افراد فاقد علایم بیماری هستند که این نکته اهمیت تاریخچه را در تشخیص بیماری خاطر نشان می‌کند.

کومس رایت:

در مراحل مزمن ویا عود بیماری گاهی اوقات آنتی بادی های مسدودکننده (یا ناکامل) ایجاد می‌شوند که برای تشخیص آنها از سرم کومبس استفاده می‌شود (تست کومبس رایت). تست کومس رایت در لوله هایی با جواب منفی انجام می‌شود به طوری که محتویات لوله ها را با سرم فیزیولوژی شست‌وشو می‌دهید. سپس به همه لوله‌ها ۱میلی لیتر آنتی‌هیومن‌گلوبولین ۱٪ اضافه کنید. چند دقیقه در دمای ۳۷ درجه قرار داده و سپس سانتریفوژ میکنیم و نتایج آگلوتیناسیون را بررسی می‌کنیم.

تست رایت 2-ME:

یکی دیگر از مشکلات تفسیر این تست این است که در بیمار هم آنتی‌بادی IgG و هم IgM تولید می‌شوند و در این تست، آگلوتیناسیونِ انجام شده توسط هر دو اندازه‌گیری می‌شود. در حالیکه اگر مشکوک به عود بیماری یا مزمن شدن آن باشیم تیتر IgG اهمیت بیشتری دارد چون در بسیاری از افرادی که از بیماری بهبود یافته‌اند تیتر IgM تا سالها دوام می‌آورد. به منظور اینکه فقط IgG موجود در سرم اندازه‌گیری شود، آنتی‌بادی IgM با استفاده از عامل احیاءکننده ۲-مرکاپتواتانل (2-ME) غیر فعال می‌شود و در نتیجه آگلوتیناسیونی که مشاهده می‌شود فقط مربوط به IgG خواهد بود (تست رایت 2-ME). با روش الایزا نیز می‌توان تیتر هر کلاس از آنتی بادی را جداگانه سنجش نمود.

لطفا در گزارش کار خود موارد زیر را قید بفرمائید و به سؤالات پاسخ دهید:

۱. تیتر نهایی قرائت شده
۲. تفسیر تیتر بدست آمده
۳. مکانیسم عمل سرم کومس در مورد آنتی بادی‌های مسدودکننده (در صورتیکه تست کومس را گذرانده‌اید)
۴. آنتی‌بادی مسدودکننده در این تست به چه آنتی‌بادی گفته می‌شود؟
۵. در صورتیکه پاسخ این آزمون در نوزاد مثبت باشد چطور می‌توان فهمید آنتی‌بادی مربوطه به مادر تعلق دارد یا نوزاد در دوران جنینی آلوده شده است؟
۶. به نظر شما نقش IgA در این بیماری چیست؟

منابع:

۱. پاکزاد، پرویز؛ اصول و تفسیر آزمایشهای سرولوژی بالینی؛ چاپ هفتم، مؤسسه فرهنگی انتشاراتی نور دانش، تهران، ۱۳۸۱، ص۱۵۰-۱۲۷.

۲. رضایی‌پور کاردوست؛ ربابه :سرولوژی ؛ ایمونولوژی و ایمونوشیمی آزمایشگاهی؛انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران؛ ۱۳۶۹، ص۵۴-۴۸.

3. Slack M.P.E "Gram-Negative coccobacilli” in "Infectious Diseases" eds: Armstrong D.G. and Cohen J. Mosby ,1999.

تست غربالگری سیفیلیس VDRL یا RPR

مقدمه

سیفیلیس یک بیماری مقاربتی مسری است که توسط اسپیروکت Treponema pallidum ایجاد می‌شود. ارگانیسم از طریق آسیبی در مخاط یا لایهٔ اپی‌تلیال و خون آلوده منتقل می‌شود. بعد از ۱۰–۶۰ روز واکنش التهابی بدون درد بصورت زخمهای به نام شانکر (chancre) معمولا در محل ورود ایجاد می‌شود. این زخمهای *سیفیلیس اولیه* اغلب خودبخود خوب می‌شود ولی عفونت هنوز باقی است. سیفیلیس در اوایل آن معمولا با استفاده از پنی‌سیلین خوب می‌شود. در غیر اینصورت ظرف شش هفته تا شش ماه بعد از ناپدید شدن شانکر راش پوستی و اختلالات دیگر آغاز می‌شود (*مرحلهٔ دوم سیفیلیس*). باز هم ممکن است علائم بالینی ناپدید شوند (*مرحلهٔ نهفته سیفیلیس*) که این مرحله می‌تواند تا پایان عمر ادامه بیابد، یا با بهبودی خودبخود پایان یابد یا به *مرحلهٔ سوم سیفیلیس* پیش رود. شکل پیشرفتهٔ سیفلیس می‌تواند موجب جنون کوری، فلج، بیماری‌های عروقی، آسیب‌های مفصل و استخوان و زخمهای پوست و مخاط شود. در زنان حامله دچار سیفلیس فعال (حتی مرحله اولیه) ارگانیسم می‌تواند به جنین منتقل شود (سیفلیس مادرزادی).

شناخته‌شده‌ترین ترپونمای بیماری‌زا ترپونما پالیدوم است که سه زیرگونه دارد:

(۱) ترپونما پالیدوم زیرگونه پالیدوم عامل سیفلیس

(۲) ترپونما پالیدوم زیرگونه اندومیکوم عامل سیفلیس اندمیک

(۳) ترپونما پالیدوم زیرگونه پرتنوئه عامل یاز

آنتی بادی‌های تولید شده در بیمار به سه گروه قابل تقسیم است:

۱. آنتی‌بادی‌های غیر اختصاصی به نام" رآژین سیفیلیسی"
۲. آنتی‌بادی‌های غیر اختصاصی ضد میکروب‌های گروه ترپونما
۳. آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد ترپونما پالیدوم

آنتی‌بادی غیر اختصاصی یا رآژین سیفیلیسی (که آنتی‌بادی واسرمن هم نامیده می‌شود) از نوع IgM بوده و به طور غیر اختصاصی به فسفولیپیدهای بسیاری از بافتها از جمله کاردیولیپین متصل می‌شود. آزمایشات مختلفی از جمله VDRL و RPR بر اساس تشخیص این رآژین طراحی شده‌اند و معمولاً ارزش غربالگری دارند.

آنتی‌بادی‌های ضد ترپونماها معمولاً IgG هستند و بر علیه آنتی‌ژن‌های مشترک بین ترپونما پالیدوم و تروپونماهای غیر بیماریزا ساخته شده‌اند (تستKolmer).

آنتی‌بادی اختصاصی ضد ترپونما پالیدوم که از کلاس IgG است و می‌تواند باعث بی‌حرکت شدن ترپونما پالیدوم زنده شود. با روش‌هایی مثل ELISA و FTA-ABS نیز می‌توان وجود این آنتی‌بادی را تشخیص داد.

با توجه به این نکات روش‌های آزمایشگاهی تشخیص سیفلیس را می‌توان به سه دسته تقسیم کرد:

۱. تشخیص مستقیم اسپیروکت

- میکروسکوپ زمینه سیاه – مورفولوژی تاب‌خورده خاص و توانائی حرکت اسپیروکت با استفاده از میکروسکوپ زمینه سیاه در نمونه‌های بدست آمده از زخم جستجو می‌شود. برای تشخیص حتما نیاز به تکنسین کارآزموده وجود دارد.
- تست نمونه با آنتی‌بادی فلورسان – آنتی‌بادی‌های نشاندار شده با فلورسان (به روش مستقیم یا غیر مستقیم) به ترپونما پالیدوم متصل می‌شود. با استفاده از میکروسکوپ فلورسان وجود تابش فلورسان که نشان‌دهندهٔ وجود ارگانیسم است در نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. استفاده از آنتی‌بادی فلورسان موجب افزایش ویژگی می‌شود ولی ممکن است زیرگونه‌های ترپونما پالیدوم واکنش نمایند. لازم است دقت شود هنگام تهیه نمونه‌ها ارگانیسم طی شستشو حذف نشود.

شکل ۱-تصویرمیکروسکوپ زمینه سیاه

۲. تست‌های اختصاصی برای آنتی‌بادی‌های ترپونمائی.

- تست غیرمتحرک کردن ترپونما پالیدوم (Treponema Pallidom Immobilization Test -TPI) – توانائی آنتی‌بادی (تولید شده در بیمار) و کمپلمان برای بی‌حرکت کردن ترپونماهای زنده (آزمایشگاهی) را اندازه‌گیری می‌کند.
- تست جذب آنتی‌بادی فلورسان ترپونمائی(Fluorescent Treponemal antibody Absorption Test - FTA) – تست غیر مستقیم آنتی بادی فلورسان که به سرم رقیق شده بیمار با کمپلمان غیر فعال شده با حرارت نیاز دارد. سرم با سویه ترپونمائی غیربیماریزای Reiter مخلوط می‌شود تا آنتی‌بادی‌های غیراختصاصی دارای واکنش متقاطع حذف شوند. سرم بعد از "جذب" این آنتی‌بادی‌ها با سویهٔ Nichols *ترپونما پالیدوم* مورد آزمایش قرار می‌گیرد، شسته شده و با آنتی‌بادی کونژوگه (آنتی‌ایمونوکلوبولین نشاندار با فلورسئین ایزوتیوسیانات) و توسط تکنسین مجرب زیر میکرسکپ فلورسان مورد بررسی قرار می‌گیرد. شدت فلورسان از ۰–۴+ درجه‌بندی می‌شود: ۲+ و بالاتر از آن واکنش مثبت محسوب می‌شود.

- تست هماگلوتیناسیون (مثل HATTS و MHA-TP) از گلبولهای قرمز پوشیده با آنتی‌ژن‌های سویهٔ Nichols *تریپونما پالیدوم* استفاده می‌کند. واکنش‌های غیراختصاصی سرم از قبل حدود شده است. آگلوتیناسیون نشان‌دهندهٔ پاسخ مثبت است.

۳. تستهای رآژین غیر اختصاصی(شامل تستهای Venereal Diesease Research Laboratory-VDRL و Rapid Plasma Reagin-RPR)

که اعتقاد بر این است این آنتی‌بادی در واقع یک اتوآنتی‌بادی است متعاقب آسیب بافتی تولید می‌شود. تست‌های فلوکولاسیون و رسوب برای تشخیص حضور رآژین (آنتی‌بادی ضد کاردیولیپین) هستند. در نمونه‌های سرم ممکن است نیاز به غیرفعال کردن کمپلمان با حرارت داشته باشد. کنترل مناسب و دقت در انجام ازمایش لازم است. آنتی‌ژن مورد استفاده در آنها عمدتاً کاردیولیپین (فسفولیپید قلب گاو) متصل به ذغال است.

RPRیک تست حساس ولی غیر اختصاصی است رآژین در بیماران سیفلیسی و نیز گاهی در سرم بیماران مبتلا به دیگر بیماری‌های حاد یا مزمن یافت می شود. یکی از نکات مهم در مورد این آنتی‌بادی رآژینی، کاهش تیتر آن متعاقب درمان است که این امر در مورد آنتی‌بادی اختصاصی دیده نمی‌شود.

در تست RPR از همان آنتی‌ژن تست VDRL استفاده می‌شود ولی مزیتهای زیر را نسبت به VDRL دارد:

۱. سرم بیمار نیاز به حرارت جهت غیر فعال کردن کمپلمان ندارد (به دلیل اضافه کردن کولین کلراید).
۲. جهت مشاهده نتیجه می‌توان با چشم غیر مسلح آنرا رویت نمود (به دلیل اضافه کردن ذرات ذغال).
۳. آنتی‌ژن به صورت از قبل آماده وجود دارد و نیازی نیست در هنگام تست آماده شود.
۴. یک تست مناسب برای مانیتورینگ اثر دارو در بیماران می‌باشد.

کاربرد

در تشخیص سیفلیس معمولا ابتدا تست‌هایی انتخاب می‌شوند که مربوط به رآژین سیفلیسی هستند چون بسیار سریع و آسان هستند. در صورت مشکوک بودن پاسخ، تستهای تکمیلی که وجود سایر آنتی‌بادی‌ها را ارزیابی می‌کنند انجام خواهند شد.

اساس و هدف تست: در شرایطی که آنتی‌ژنهای دخیل در واکنش آنتی‌ژن–آنتی‌بادی از جنس لیپیدی و بصورت کلوئید یا معلق در محلول باشند پدیدهٔ فلوکولاسیون (Flocculation) می‌تواند مشاهده شود.

روش کار و تفسیر نتایج تست RPR

سرم بیمار با مقدار کمی آنتی‌ژن کاردیولیپین (که با اضافه کردن کلسترول، لسیتین و ذغال تقویت شده است) مخلوط می‌شود و اگر سرم بیمار حاوی رآژین (آنتی‌بادی علیه کاردیولیپین) باشد رسوب از نوع فولکولاسیون دیده می‌شود.بر روی اسلایدهایی که دایره سفید رنگ دارند انجام می‌گیرد تا ذرات سیاه فلوکولاسیون قابل تشخیص باشند.

(همه مواد و نمونه‌ها قبل از انجام تست به درجه حرارت اتاق رسیده باشد):

۱. جدول مربوط به گزارش نتیجه را با دقت پر کنید (اطلاعات کیت و نمونه)
۲. اسلاید را با پنبه آغشته به الکل تمیز نمائید بطوری که از هرگونه پرز و چربی پاک شود.
۳. یک قطره کنترل مثبت؛ یک قطره کنترل منفی و یک قطره نمونه سرم را روی سه دایره جداگانه اسلاید قرار دهید (حجم هر قطره به طور تقریبی ۵۰ میکرولیتر یا ۰/۰۵ میلی لیتر باشد) و به آرامی بدون اینکه خارج شود در سطح دایره پخش کنید.
۴. آنتی‌ژن را قبل از مصرف با حرکت ملایم مخلوط و یکنواخت کنید. (با توجه به اینکه آنتی‌ژن بطور طبیعی در اثر ثابت ماندن رسوب می‌کند؛ حتما باید قبل از مصرف آنرا با حرکت ملایم یکنواخت کنید. در غیر این صورت احتمال پاسخ اشتباه وجود دارد.)
۵. یک قطره از سوسپانسیون آنتی‌ژن روی هر یک از قطرات کنترل‌ها و سرم اضافه کنید و با دست اسلاید را حداکثر تا ۸ دقیقه حرکت دورانی داده؛ از نظر فلوکولاسیون بررسی کنید (دقت کنید که در این مرحله از همزدن با اپلیکاتور خودداری نمائید). در صورت وجود روتاتور با اتاقک مرطوب حتما از آن استفاده کنید.
۶. نتیجه را در اسرع وقت زیر نور لامپ یا جائی که نور کافی باشد قرائت نمائید تا واکنش مثبت ضعیف از منفی قابل تشخیص باشد. خواندن پاسخ پس از گذشت زمان زیادتر باعث اشتباه می‌شود.
۷. با توجه به وجود آزید در معرف‌ها؛ و با توجه به اینکه این ماده در مجاورت مس و سرب تشکیل آزید فلزی می‌دهد که ممکن است باعث انفجار شود پس از ریختن این مواد در دستشویی آنرا با مقدار زیاد آب دفع کنید. اسلایدها را شسته و خشک نمائید.

خواندن تست:

سوسپانسیون خاکستری رنگ یکنواخت نشان دهنده جواب منفی است.

وجود توده‌های مجتمع سیاه رنگ در زمینه شفاف نشان‌دهنده جواب مثبت است که بسته به اندازه توده‌ها به مثبت شدید تا مثبت ضعیف یا (+۱) تا (+۴) تقسیم‌بندی می‌شود.

■ این تست به صورت نیمه‌کمی نیز قابل انجام می‌باشد. تمام نمونه‌هایی که در روش کیفی به هر میزان مثبت شوند باید مجددا با روش نیمه‌کمی آزمایش شوند.

جهت انجام آزمایش به روش نیمه‌کمی؛ سرم بیمار بوسیله سرم فیزیولوژی بصورت سریال با نسبت ۱/۲ رقیق شده و تمام رقتها بـر روی اسـلاید از نظر فلوکولاسیون بررسی می‌شوند. بالاترین رقتی که که مثبت ایجاد کند تیتر آنتی‌بادی است.
تیترهای بالاتر از ۱/۳۲ بیماری فعال را نشان می‌دهد و بهتر است هر سه ماه یکبار و به مدت یک سال تیتر رآژین پیگیری شود.
بنابراین از تست برای ارزیابی درمان می‌توان استفاده کرد یعنی سیر صعودی تیتر دلیل بر عفونت فعال و سیر نزولـی آن دلیـل بـر موفقیـت درمـان می‌باشد.

تفسیر نتایج: برای داشتن جواب قابل اعتماد، دقت در نمونه‌گیری و انجام صحیح مراحل آزمایش مهم است. به علت خطای آزمایشگاه و یا مصـرف آنتی‌ژن فاسد و غیره ممکن است پاسخ صحیح نباشد که این موارد با دقت در انجام تست و در مواد و لوازم آن و تکرار تست قابـل برطـرف شـدن است. از طرف دیگر بیماریهای مرتبط با سیفیلیس (yaws ، pinta و سیفیلیس اندمیک غیر مقاربتی) کـه عامـل ایجادکننـدهٔ آنهـا بـه آسـانی از *ترپونما پالیدوم* قابل تفکیک نیست می‌توانند موجب پاسخ‌های مثبت شوند. موارد زیر نیز باید مورد توجه قرار بگیرد.
الف- نتیجه منفی:
۱. بیمار مبتلا به سیفیلیس نیست.
۲. هنوز در ابتدای بیماری سیفیلیس است و آنتی‌بادی *به علت* پائین بودن تیتر آن قابل تشخیص نمی‌باشد.
۳. بطور موقت در نتیجه معالجه ناقص و یا علل دیگری مانند نوشیدن مایعات الکلی؛ آزمایش منفی شده است.
۴. بیمار در مرحله سیفیلیس نهفته و یا غیر فعال است.
۵. بیمار مبتلا به سیفیلیس است ولی به علت بیماری‌های کمبود و یا نقص سیستم ایمنی؛ قادر به تولید آنتی‌بادی نمی‌باشد.
۶. خطای آزمایشگاه
ب- نتیجه مثبت:
۱. ممکن است بیمار مبتلا به سیفیلیس باشد. برای تشخیص قطعی باید آزمایشهای تکمیلی را انجام داد.
۲. مثبت کاذب بیولوژیکی است.
۳. خطای آزمایشگاه

موارد مثبت کاذب بیولوژیک مانندHIVدر مراحل اولیه(زیرا اختلال عملکرد ایمنی در این افراد باعث تحریک تولید آنتی بادی های پلی کلونال مـی گردد)؛ تب؛ حاملگی؛ مصرف داروهای بیهوشی؛ معتادین تزریقی و در افراد مسن؛ همچنین بیماری‌های عفونی مزمن: جذام، مالاریا، توکسوپلاسموز، منونوکلئوز عفونی، سل، لوپوس اریتماتوز و پنومونی ویروسی.
موارد منفی کاذب می‌تواند به دلیل مصرف الکل مشاهده شود یا بیمار در روزهای اولیه ابتلا به بیماری باشد.

سؤالات:
- وجود چه ماده‌ای در سرم بیمار بررسی می‌شود؟
- ترکیب انتی‌ژن‌های RPR چیست؟ کدام بخش ان باعث می‌شود نیازی به غیر فعـال کـردن سـرم نباشـد؟ EDTA و کـولین کلرایـد و تیمروسال برای غیرفعال کردن کمپلمان
- دلایل اولویت RPR نسبت VDRL چیست؟
- در این تست چرا ذرات ذغال اضافه شده است؟
- مثبت کاذب بیولوژیک به چه معناست؟ سه مثال ذکر کنید.
- چه نمونه‌ای برای انجام این تست مناسب نیست؟
- تست منفی نمی‌تواند اثبات کند که بیمار قطعا مبتلا نیست. چهار دلیل برای این مطلب ذکر کنید.

منابع:

۱. پاکزاد، پرویز؛ اصول و تفسیر آزمایشهای سرولوژی بالینی؛ چاپ هفتم، مؤسسه فرهنگی انتشاراتی نور دانش، تهران، ۱۳۸۱، ص۲۲۵-۲۴۵.
۲. رضایی‌پور کاردوست؛ ربابه :سرولوژی ؛ ایمونولوژی و ایمونوشیمی آزمایشگاهی؛انتشـارات جهـاد دانشـگاهی دانشـگاه علـوم پزشـکی شـهید بهشتی، تهران؛ ۱۳۶۹,
۳.Slack M.P.E “Gram-Negative coccobacilli” in " Infectious Diseases" eds: Armstrong D.G. and Cohen J. Mosby ,1999.

تست ASO (تست آنتی استرپتولیزین O) خنثی سازی توسط آنتی بادی

مقدمه

میکروب‌های استرپتوکوک گروه A لانسفیلد (Lancefield) یا استرپتوکوک‌های چرکزا (Streptococcus pyogenes) اکثرا موجب بروز عفونت گلو و پوست در انسان می‌شوند. از عوارض مهم عفونتهای استرپتوکوکی گروه A لانسفیلد؛ تب روماتیسمی (۲-۳٪) و گلومرونفریت حاد (و مزمن) پس از عفونت استرپتوکوکی (۲-۵٪) است.

استرپتوکوک‌های بیماریزا، سم‌ها (Exotoxin) و آنزیم‌های (Exoenzymes) متفاوتی ترشح می‌کنند. این مواد علاوه بر خاصیت بیماریزایی می‌توانند خاصیت آنتی‌ژنیک هم داشته باشند و لذا بیمار برضد آنها آنتی‌بادی تولید می‌کند. از جمله این سموم؛ استرپتولیزین‌ها O هستند (استرپتولیزین O و استرپتولیزین S).استرپتولیزین O که یک همولیزین (منهدم کننده گلبول قرمز) است علاوه بر لیز گلبولهای قرمز؛ قادر است لکوسیت‌ها؛ پلاکت‌ها؛ میتوکندری‌ها و لیزوزم‌ها؛ سلول‌های کشت بافتی و همچنین سلول‌های بافت قلبی را در محیط خارج از بدن صدمه زده و یا لیز نماید. استرپتولیزین O از جمله سموم آنتی‌ژنیک می‌باشد و در مقابل آن پاسخ آنتی‌بادی تولید می‌شود، در واقع وجود آنتی‌بادی در سرم نشان‌دهندهٔ تماس فرد با این عامل بیماریزا است (ولی استرپتولیزین S ایمونوژن ضعیفی است). بنابراین تست ASO جهت اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های میکروب استرپتوکوک در سرم (یعنی تیتر آنتی‌استرپتولیزین O) به منظور تشخیص بیماریهای مربوط به این عوامل قابل استفاده است. بررسی تیتر آنتی بادی بر علیه سموم دیگر مثل دزوکسی ریبونوکلئاز B (Dnase B) نیز امکان‌پذیر بوده و می‌تواند نشان دهندهٔ سابقهٔ تماس فرد با عامل بیماریزا باشد.

تست ASO بدلایل زیر متداول می‌باشد:

۱- به آسانی قابل انجام و تکرار است.
۲- آنتی‌ژن استرپتولیزین O بوسیله اکثر سوشهای گروه A استرپتوکوک ترشح می‌شود.
۳- آنتی‌ژن استرپتولیزین O بطور تجارتی در دسترس می‌باشد.
۴- این آزمایش شناخته شده و استاندارد است.

اساس و مکانیسم تست: استرپتولیزین O قادر است در شرایط آزمایشگاه گلبولهای قرمز را منهدم (لیز) نماید. تست ASO بر اساس خنثی‌سازی (نوترالیزاسیون) آنزیم استرپتولیزینO توسط آنتی بادی‌های خنثی کنندهٔ تولید شده در سرم بیمار طراحی شده است. برای انجام این تست؛ رقتهای مختلفی از سرم بیمار را در مجاورت مقدار معینی آنزیم استرپتولیزینO قرار می‌دهند. درصورت وجود آنتی بادی بر علیه استرپتولیزینO در سرم بیمار؛ این آنتی‌بادی‌ها به استرپتولیزینO متصل شده و آن را خنثی می‌کنند. هر چه مقدار آنتی بادی بیشتر باشد توانایی آن در مهار اثر سم (یا خنثی‌سازی آن) بیشتر است و باعث می‌شود که سم نتواند تاثیر خود را داشته باشد. با توجه به اینکه استرپتولیزینO ؛ گلبولهای قرمز را منهدم می‌کند؛ از گلبولهای قرمز بعنوان شاهد تست استفاده می‌شود. بنابراین در رقت‌هایی که مقدار آنتی‌استرپتولیزینO بالاست عمل لیز گلبولهای قرمز صورت نمی‌گیرد و آنها سالم می‌مانند ولی در رقتهایی که میزان آنتی‌استرپتولیزین O کاهش می‌یابد لیز گلبولهای قرمز بر اثر استرپتولیزینO صورت می‌گیرد. یعنی بر اساس میزان خنثی‌سازی استرپتولیزینO توسط رقتهای مختلف سرم (لیز یا عدم لیز گلبولهای قرمز در رقت‌های مختلف) تیتر آنتی‌استرپتولیزین O تعیین می‌گردد.

روش کار:

اندازه گیری ASO در سرم بیمار به روشهای زیر انجام می‌گیرد:

الف: روش آگلوتیناسیون روی لام با استفاده از ذرات لاتکس پوشیده از آنتی استرپتولیزینO

ب: روش میکرو در ظروف مخصوص میکروتیتراسیون

ج: روش ماکرو در لوله آزمایش

از بین سه روش فوق؛ متد ماکرو در ایران متداولتر است و از طرفی پدیده خنثی‌سازی سم توسط آنتی‌بادی در این روش به خوبی قابل مشاهده است لذا این روش برای آزمایشگاه شما انتخاب شده است.

- با توجه به این که در این تست از گلبول‌های قرمز استفاده می‌شود لازم است قبل از انجام تست گلبول‌های قرمز گروه خونی O آماده شوند. برای این مرحله گلبولهای قرمز حداقل سه بار در سرم فیزیولوژی شسته شده و سوسپانسیون ۵٪ آن تهیه می‌شود.
- استرپتولیزین O توسط موسسات مختلف تهیه می‌شود و به فروش می‌رسد (به صورت پودر که باید در مقدار معینی آب مقطر که روی شیشهٔ آن نوشته شده حل گردد).

- نکته: استرپتولیزین O در مقابل اکسیژن ناپایدار(Oxygen labile) می‌باشد، بنابر این محلول استرپتولیزین O را نباید به شدت تکان داد و یا در محیط آزمایشگاه به مدت طولانی نگهداری کرد (در مقابل حرارت هم پایدار نیست). لذا باید از هر کاری که سبب ایجاد حباب هوا در آن شود پرهیز کرد زیرا توسط اکسیژن هوا اکسیده شده و نهایتا خنثی می‌شود. برای حل شدن پودر آن در آب مقطر؛ کافی است که شیشه را بآرامی چند بار حرکت بدهیم تا پودر حل شود. ضمنا این محلول بایستی ظرف بیست دقیقه مصرف شود.
- سرم مورد استفاده بهتر است بدون آلودگی و در شرایط استریل از خون تهیه شود.

در پاره‌ای از مواقع توصیه می‌شود که سیستم کمپلمان سرم را قبل از مصرف در ۵۶ درجه به مدت نیم ساعت غیر فعال نمائید.

جهت انجام تست ابتدا رقتهای زیر را از سرم بیمار با استفاده از بافر ASO تهیه نمائید:

رقت ۱:۱۰ ۰۰/۵ml سرم بیمار + ۴/۵ml بافر

رقت ۱:۱۰۰ ۰۱ml رقت۱:۱۰ + ۹ml بافر

رقت ۱:۵۰۰ ۲ml رقت ۱:۱۰۰ + ۸ml بافر

۱۴ لوله جهت درست کردن رقتهای مختلف تست ASO در جا لوله‌ای قرار دهید.

رقت‌های فوق را با کمک جدول صفحهٔ بعد به رقت‌های مورد نظر تبدیل نمائید و مطابق همان جدول مواد و محلول‌های تست را به آنها اضافه نموده مطابق دستور هر مرحله عمل نمائید.

رقت‌های اولیه سرم		رقت‌های سرم												کنترل گلبول قرمز	کنترل SO
		۱/۱۰		۱/۱۰۰					۱/۵۰۰						
شمارهٔ لوله / مواد مختلف		۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴
بافر ASO (ml)		۰/۲	۰/۸	۰	۰/۲	۰/۴	۰/۶	۰/۷	۰	۰/۲	۰/۴	۰/۶	۰/۸	۱/۵	۱
سرم بیمار (ml)		۰/۸	۰/۲	۱	۰/۸	۰/۶	۰/۴	۰/۳	۱	۰/۸	۰/۶	۰/۴	۰/۲	–	–
محلول SO		۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	–	۰/۵
لوله‌ها را با جا لوله‌ای در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار دهید. توجه فرمائید که در لوله‌ها در این مدت محکم مسدود شده باشد.															
سوسپانسیون ۵٪ (O) گلبول قرمز		۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
لوله‌ها را با جا لوله‌ای در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد در حالی که در لوله‌ها مسدود شده باشد به مدت ۴۵ دقیقه قرار دهید و هر ۱۵ دقیقه یکبار محتویات آن را خوب مخلوط نمائید. پس از انکوباسیون لوله‌ها را در دور ۱۵۰۰ در دقیقه به مدت یک دقیقه سانتریفوژ نموده و همولیز یا عدم همولیز را در لوله‌ها مورد بررسی قرار دهید و تیتر سرم را محاسبه نمائید.															
تیتر سرم برحسب تاد		۱۲	۵۰	۱۰۰	۱۲۵	۱۶۶	۲۵۰	۳۳۳	۵۰۰	۶۲۵	۸۳۳	۱۲۵۰	۲۵۰۰	عدم لیز	لیز کامل

پاسخ تست: تیتر آنتی‌بادی بر ضد استرپتولیزینO با واحد تاد (Todd) بیان می‌شود. واحد تاد عبارتست از عکس بالاترین رقت سرم که مانع از عمل همولیز کامل گلبولهای قرمز توسط استرپتولیزینO می‌شود.

اولین بار در سال ۱۹۳۲ ؛ تاد واحد ASO را تعریف کرد. بر این اساس، یک واحد ASO برابر مقداری از سرم است که می‌تواند ۲/۵ دوز حداقل مقدار همولیتیک استرپتولیزینO (MHD) را خنثی کند. یک دوز حداقل مقدار همولیتیک استرپتولیزینO برابر مقداری است که می‌تواند ۰/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون گلبولهای قرمز ۵٪ را کاملا لیز نماید. اگر از استاندارد سازمان بهداشت جهانی استفاده شود، تیتر آنتی‌بادی بر حسب واحد بین المللی بیان می‌شود. طبق این استاندارد واحد بین المللی برابر قدرت فعالیتی است که در ۰/۰۲۱۳ میلی‌گرم سرم استاندارد بین المللی وجود دارد و هر میلی‌لیتر محلول استرپتولیزین برای انجام تست حاوی یک واحد استرپتولیزین است. این دو واحد از نظر کارهای عملی در آزمایشگاه تفاوت مهمی ندارند.

روش خواندن جواب: جهت اعلام جواب، عکس رقت آخرین لوله‌ای که کاملا مانع از همولیز گلبولهای قرمز می‌شود (عدم لیز کامل در آن دیده می‌شود) به عنوان تیتر آنتی‌استرپتولیزین O اعلام می‌گردد. بعنوان مثال در یک آزمایش ؛ لوله‌های ۱ تا ۵ فاقد همولیز ؛لوله شماره۶ دارای همولیز ضعیف و بقیه لوله‌ها همولیز مشخص دارند؛ در اینصورت تیتر ASO بر حسب تاد برابر ۱۶۶ خواهد بود (لولهٔ هفتم).

- لوله ای که در آن لیز مشاهده نگردد پس از پایان تست کاملاشفاف خواهد شد چون گلبولهای قرمز آن سالم مانده و در سانتریفوژ ته نشین می‌شود. ولی لوله‌های لیز شده به دلیل متلاشی شدن گلبولهای قرمز و پخش محتویات آنها در محلول؛ قرمز باقی می‌مانند.
- جهت اعلام جواب حتما باید عکس رقت آخرین لوله‌ای که عدم لیز کامل داریم بصورت واحد تاد اعلام شود (یکی از اعداد ردیف آخر جدول) و اعلام شماره لوله به هیچ وجه پذیرفتنی نیست.

تفسیر جواب: معمولا جواب کمتر از ۲۰۰ واحد تاد طبیعی در نظر گرفته می‌شود.

فاکتورهای مختلفی در تفسیر تست دخالت دارند از جمله سن بیمار؛ سابقه قبلی و تستهای همزمان دیگر (مثل CRP و آزمایش ادرار) می‌تواند به تشخیص کمک کند.

اگر تست ASO در فاصله زمانی ۲-۱ هفته تکرار شود و افزایش تیتر مشاهده گردد ارزش بالینی زیادی دارد و نشان دهندهٔ عفونت حاد است. کاهش تیتر نیز معمولا نشان‌دهندهٔ بهبود عفونت است.

تیتر در بیماریهایی مثل مخملک، سل و... هم‌چنین در مواردی مثل بالا بودن کلسترول خون افزایش می‌یابد و می‌تواند موجب مثبت کاذب شود.

لطفا در گزارش کار خود موارد زیر را قید بفرمائید:

۱. تیتر ASO برحسب تاد
۲. تفسیر تیتر بدست آمده

سؤالات:

۱. چند نمونه از سموم و آنزیمهای مترشحه از باکتریهای ذکر شده را نام ببرید.
۲. آیا در این تست پدیدهٔ پروزون مشاهده می‌شود؟ چرا؟
۳. به چه دلیل از گلبولهای قرمز گروه O استفاده می‌شود؟ چند بار شستشوی آن به چه دلیل لازم است؟
۴. با وجود اینکه سم استرپتولیزین S در مقابل شرایط محیطی (اکسیژن و دما) مقاوم است ولی در این تست از استرپتولیزین O استفاده می‌شود که ناپایدار است. چرا؟
۵. یکی از موارد مثبت کاذب این تست را انتخاب نموده و دلیل آن را توضیح دهید.

منابع:

- پاکزاد، پرویز؛ اصول و تفسیر آزمایشهای سرولوژی بالینی؛ چاپ هفتم، مؤسسه فرهنگی انتشاراتی نور دانش، تهران، ۱۳۸۱، ص۱۹۳-۲۰۳.
- رضایی‌پور کاردوست؛ ربابه :سرولوژی ؛ ایمونولوژی و ایمونوشیمی آزمایشگاهی؛انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران؛ ۱۳۶۹، ص ۸۶-۹۰.

تست CRP (C-Reactive protein)

مقدمه

CRP برای اولین بار در سال ۱۹۳۰ توسط دو دانشمند Tillet و Francis توصیف شد. آن‌ها مشاهده کردند سرم بیماران مبتلا به پنومونی با دیواره سلولی باکتری پنوموکوک واکنش می‌دهد و با توجه به اینکه واکنش مربوطه در پاسخ به پلی‌ساکارید C رخ میداد، فاکتور موجود در سرم که چنین واکنشی را انجام می‌دهد را پروتئین واکنش دهنده با C نامیدند (CRP). هرچند بعد ها مشخص شد که افزایش میزان CRP تنها مختص سرم بیماران مبتلا به پنومونی نیست بلکه در سایر بیماری های عفونی و غیرعفونی نظیر التهاب، سرطان، تروما نیز در سرم دیده می‌شود و در واقع. CRP یکی از پروتئین‌های فاز حاد است. CRPمی‌تواند اتصال به فسفوکولین غشای میکروارگانیسم‌ها و اجزای فسفولیپیدی سلول‌های آسیب دیده بدن متصل شود. این پروتئین همچنین توانایی فعال کردن سیستم کمپلمان و اتصال به سلول‌های بیگانه‌خوار به عنوان اپسونین دارد. بدین ترتیب CRP به عنوان رفتگر باعث انتقال لاشه‌های سلولی ونابودی فراورده‌های آن‌ها توسط سلول فاگوسیتی می‌شوند.

پروتئین‌های فاز حاد با مکانیزم‌های متفاوت اما هدف یکسان یعنی مقابله با شرایط حاد در بدن عمل می‌کنند. در پدیده‌های التهابی، غلظت گروهی از گلیکوپروتئینهای فازحاد در پلاسما افزایش پیدا می‌کند که در اغلب موارد معرف مناسبی برای فعالیتهای التهابی و تخریب بافتی هستند. بیش از ۲۰ پروتئین فاز حاد وجود دارد که از مهمترین آنها CRP است که تغییرات آن به موازات پدیده‌های التهابی است. همه پروتئینهای فاز حاد در مقابل آسیب بافتی سریعاً ساخته می‌شوند و از دو تا پنج برابر افزایش دارند (جدول). در بین آنها CRP در کمتر از ۱۲ساعت افزایش پیدا می‌کند درحالیکه اجزای کمپلمان یا سرولوپلاسمین (Ceruloplasmin) چند روز طول می‌کشد تا افزایش یابند. نیمه‌عمر اکثر پروتئینهای فاز حاد ۴-۲ روز است ولی نیمه‌عمر CRP پنج تا هفت ساعت می‌باشد، لذا افت آن پس از پایان شرایط التهابی سریعتر است و با توجه به اینکه تا ۱۰۰ برابر افزایش دارد و سریعتر پاسخ می‌دهد معرف حساستری است و در جستجوی بیماریهای التهابی و بدخیمی‌ها و کنترل درمان بیماریهای التهابی مناسب است. تقریباً در۷۰ بیماری افزایش CRP دیده‌شده مثل عفونتهای باکتریایی، ویروسی، سکته‌قلبی، تومورهای‌بدخیم و بیماریهای روماتوئید. لذا عملکرد آن اختصاصی نبوده و به تنهائی ابزار تشخیص اختصاصی بیماری نیست.

Examples of Clinically Useful Acute-Phase Proteins

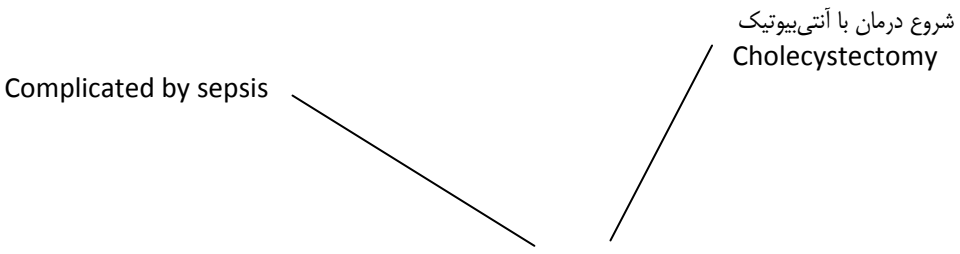
Protein	Normal concentration (g/L)	Concentration in acute inflammation (g/L)	Response time (hours)
C-reactive protein	0.0008-0.004	0.4	6-10
Alpha-antichymotrypsin	0.3-0.6	3.0	10
Alpha-antitrypsin	2.0-4.0	7.0	24
Orosomucoid (α_1 acid glycoprotein)	0.5-1.4	3.0	24
Haptoglobin	1.0-3.0	6.0	24
Fibrinogen	2.0-4.5	10.0	24
C_3	0.55-1.2	3.0	48-72
C_4	0.2-0.5	1.0	48-72
Ceruloplasmin	0.15-0.6	2.0	48-72

کاربرد

تست CRP در مواردی از عفونت‌ها که تشخیص میکروبی دشوار است کاربرد گسترده دارد مثل سپتی‌سمی و مننژیت در نوزادان، عفونت‌های افراد نقص ایمنی، سوختگی‌های همراه با عفونت، عفونت‌های خطرناک پس از عمل جراحی مثل آبسه‌های زیر دیافراگم Subphrenic ، انتقال مقدار زیادی خون و ... از اندازه گیری CRP به خصوص اندازه‌گیری کمی به صورت مداوم و مستمر در کنترل درمان (وضعیت رد یا پذیرش پیوند عضو و موارد دیگر) و بررسی سیر بیماری استفاده می‌شود.

CRP در کنارCPK-MB یک شاخص مهم در تشخیص انفارکتوس قلبی محسوب می‌شود. هم CRP و هم ESR در تشخیص موارد عفونی و التهابی کاربرد دارد اما CRP ارزش تشخیصی برخوردار است به طوری که در بعضی بیماری های خونی مثل آنمی بدون وجود التهاب یا عفونت ESR افزایش پیدا می‌کند که در این موارد CRP طبیعی است. افزایش مقدار CRP در سرم نه فقط از نظر تشخیصی مهم است بلکه از نظر شدت بیماری و واکنش بیمار نسبت به درمان نیز اهمیت دارد، زیرا بلافاصله بعد از درمان مناسب یا برداشت تومور میزان CRP کاهش پیدا می‌کند.

افزایش CRP که متعاقب جراحی دیده می‌شود در شرایط عادی حدود ۲ روز به حداکثر خود می‌رسد و به تدریج ظرف ۱۰-۷روز به حدنرمال می‌رسد. اگر CRP همچنان بالابماند یا بیشترشود می‌تواند نشانه‌ای از عفونت باشد قبل از آنکه علائم و نشانه‌های بالینی آن دیده شود (شکل ۱).

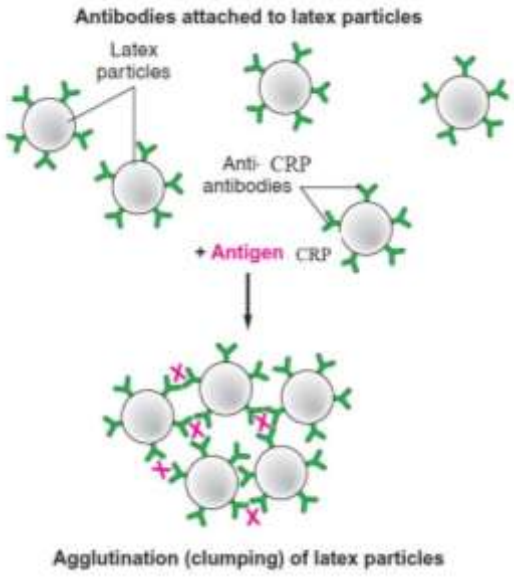


شکل ۱ - نمودار میزان CRP پس از جراحی

CRP در آرتریت روماتوئید هم نشانهٔ فعالیت کوتاه‌مدت و هم دراز مدت بیماری است. کنترل میزان CRP در تشخیص اولیه پاسخ فرد به دارو مفید است(اغلب چندماه قبل از آنکه نتایج بالینی و رادیولوژیک تأیید کند.) مـثلاً در آرتریـت روماتوئیـد مـی‌تـوان از CRP اسـتفاده کـرد تـا اثـر داروی ضدالتهابی (مثل آسپرین) وماهیت عول آنها مشخص شود. داروهای مشابه آسپرین در شرایط التهابی باعث کاهش پروتئنهای فاز حاد نمی‌شوند.
اندازه‌گیری CRP در مورد سکته‌های قلبی نیز کاربرد دارد. ولی در برخی بیماریهـای التهـابی مـزمن، CRP معـرف خـوبی نیسـت مثـل لوپـوس و اریتماتومی سیستمیک (SLE) که در آن CRP چندانی ندارد.

روش کار و تفسیر نتایج تست CRP_ لاتکس

برای اندازه‌گیری CRP هم روش کیفی و هم روش کمی وجود دارد. اساس روش کیفی، **آگلوتیناسیون پاسیو معکوس** می‌باشد.
آگلوتیناسیون پاسیو: اگر آنتی‌ژن ما پروتئین باشد که بطور معمول واکنش آن با آنتی‌بادی به صورت رسوبگذاری اسـت ولـی بخـواهیم نتیجـه آزمایش را بصورت آگلوتیناسیون ببنیم که حساس‌تر است یک راه آن قراردادن پروتئین مورد نظر بر سطح گلبولهای قرمـز یـا ذرات لاتکـس اسـت اصطلاح پاسیو زمانی به کار می‌ورد که از لاتکس استفاده شود و اپی‌تـوپ مـورد نظر به طور طبیعی بخشی از آنتی‌ژن نباشد و اصطلاح معکـوس زمـانی اسـتفاده می‌شود که به جای آنتی‌ژن آنتی‌بادی را به ذرات لاتکس کونژوگه کرده باشیم.



شکل۲- تست CRP

اساس تست واکنش بین سرم بیمار (حاوی CRP) و آنتی‌بادی علیـه CRP اسـت که در سطح ذرات لاتکس وجود دارد. ذرات پوشیده از آنتی‌بادی در حضـور CRP آگلوتینه می‌شوند که با چشم غیر مسلح قابل تشخیص است.
نمونه: سرم بیمار که ترجیحاً تازه تهیه‌گردیده باشد.

روش کیفی:

۱. سرم بیمار را با تامپون به نسبت ۱/۲۰ رقیق کنید.
۲. اسلاید را با پنبه الکل تمیز نمائید.
۳. یک قطره از سرم بیمار رقیق‌شده برروی دایره شماره ۲، یـک قطـره از کنترل منفی بر روی دایره شماره ۱ و یک قطـره از کنتـرل مثبـت بـر روی دایره شماره ۳ بریزید.
۴. سوسپانسیون لاتکس را با دست ویا ورتکس طـوری تکـان دهیـد تـا کاملاً یکنواخت شود.
۵. بر روی هر قطره روی دایره‌ها(هرسه دایره) یک قطره از سوسپانسیون لاتکس بریزید.
۶. با همزن پلاستیکی قطرات هر دایره را مخلوط و در سطح دایره پخش کنید.
۷. بلافاصله اسلاید را با دست به مدت ۲دقیقه حرکت دورانی دهید.
۸. نتیجه آگلوتیناسیون را بررسی نمائید.

۹. در پایان اسلاید را زیر شدت شیر آب بگیرد تا آلودگی روی آن بر اثر شدت آب برود.

آگلوتیناسیون CRP_ لاتکس نشان‌دهندهٔ وجود CRP حداقل بمیزان 10±2 میلی‌گرم در لیتر است (بسته به حساسیت کیت – به بروشور آن مراجعه شود) و تست مثبت تلقی می‌شود، اما قدرت واکنش مثبت در روش کیفی متفاوت و بصورت زیر گزارش می‌شود:
آگلوتیناسیون واضح با ذرات درشت: تست CRP مثبت
آگلوتیناسیون با ذرات ریز: تست CRP مثبت ضعیف
و در صورت عدم آگلوتیناسیون:
کاملاً شیری یکنواخت: تست CRP منفی

در افرادی که دچار التهاب یا نکروز بافتی نباشند CRP در سرم دیده نمی‌شود یا غلظت آن بسیار کم است (بطور معمول بین ۰٫۸ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر).

روش نیمه‌کمی:

در صورت مثبت بودن پاسخ ، سرم بیمار را به صورت متوالی رقیق کنید:
۱/۲۰ ، ۱/۴۰ ، ۱/۸۰ ، ۱/۱۶۰ ، ۱/۳۲۰

هر یک از سرمهای رقیق‌شده را طبق روش کیفی آزمایش نمائید و نتایج مثبت را مشخص نمائید. با استفاده از آخرین رقتی که جواب مثبت می‌دهد و مطابق جدول زیر غلظت تقریبی CRP را تعیین کنید: بطور مثال اگر در نمونه‌ای رقتهای ۱/۲۰ ، ۱/۴۰ و ۱/۸۰ مثبت و رقتهای ۱/۱۶۰ ، ۱/۳۲۰ منفی شد، آخرین رقت جواب داده ۱/۸۰ می‌شود که غلظت CRP در جدول برای این رقت ۴۰mg/l می‌باشد (در این مورد حساسیت کیت ۰٫۵ میلی‌گرم در لیتر است)

رقت سرم	غلظت CRP (mg/l)
۱/۲۰	۱۰
۱/۴۰	۲۰
۱/۸۰	۴۰
۱/۱۶۰	۸۰
۱/۳۲۰	۱۶۰

تفسیر نتایج:

خطا (جوابهای کاذب):

اگر نمونه بیمار چربی‌دار، همولیزشده، دارای فاکتور روماتوئیدی بالا یا دارای آلودگی شدید با باکتری باشد ممکن‌است مثبت کاذب دیده‌شود. اگر زمان واکنش بیش از ۲ دقیقه طول بکشد در اثر خشک‌شدن ممکن است مثبت کاذب دیده شود. همچنین وجود سایر پروتئینهای مداخله‌گر در سرم که می‌تواند مهمترین عامل تشکیل مثبت کاذب باشد و یکی ازدلایل رقیق کردن سرم جلوگیری از مداخله همین پروتئین‌ها است.
اگر بلافاصله بعد از اضافه کردن لاتکسCRP شاهد اگلوتیناسیون بودیم باید نسبت به درستی آزمایش مشکوک شویم زیرا ممکن است مربوط به یک واکنش غیر اختصاصی یا اتواگلوتیناسیون باشد.
منفی کاذب در اثر مقدار CRP بسیار بالا که موجب پدیدهٔپروزون (Prozone) می‌گردد ایجاد می‌شود که قبل از اینکه آن‌را منفی گزارش کنیم برای رفع آن باید سرم رقیق کنیم و آزمایش را تکرار کنیم.
محدودیت‌های تست:
تست CRP_ لاتکس کیفی یا نیمه‌کمی انجام می‌شود و برای اندازه‌گیری دقیق CRP از روشهای دیگری باید استفاده کرد. این تست CRP در حدود ۱۰mg/l را می‌تواند مشخص کند و مقادیر کمتر از آن قابل تشخیص نیست. حساسیت تست برابر ۰/۵mg/l است. اندازه‌گیری کمی CRP به روش‌های مختلفی نظیر SRID و نفلومتری و ایمونوتوربیدومتری قابل انجام است.

به سوالات زیر در گزارش کار خود پاسخ دهید:
۱. در صورت مثبت بودن تست CRP چه بیمارئی در فرد مورد بررسی گزارش می‌شود؟
۲. ذرات لاتکس در این تست با چه پوشیده شده‌اند؟
۳. در صورتیکه سرم را رقیق نکنیم با چه مقدار CRP در سرم پاسخ تست مثبت خواهد شد؟
۴. دلیل نامگذاری ملکول CRP چیست؟

منابع:

۱. پاکزاد، پرویز؛ اصول و تفسیر آزمایشهای سرولوژی بالینی؛ چاپ هفتم، مؤسسه فرهنگی انتشاراتی نور دانش، تهران،۱۳۸۱، ص ۱۴۰–۱۵۳.
۲. قلعه نویی، بهنام و همکاران؛ سرولوژی و ایمونولوژی کاربردی همراه با اصول و تفسیر آزمایش‌ها؛ جلد ۱؛ انتشارات نوردانش؛ ۱۳۹۶

تست نیتروبلوتترازولیوم (NBT)

مقدمه

بیماری گرانولوماتوز مزمن (CGD; Chronic granulomatous disease) یکی بیماری‌های نقص ایمنی است که به دو فرم وابسته به کروموزوم X مغلوب (در دوسوم موارد) یا اتوزومال مغلوب (در یک‌سوم موارد) به ارث می‌رسد. علت این بیماری جهش در یکی از ژن‌های کدکننده کمپلکس‌های پروتئینی مسئول تولید اکسیژن سوپراکسید (O^-) با نام کمپلکس اکسیداز فاگوسیتی (Phox) یا آنزیم NADPH اکسیداز می‌باشد.

کمپلکس آنزمی NADPH اکسیداز بصورت داخل غشایی در فاگوسیت‌های تک‌هسته‌ای و نوتروفیل‌ها وجود دارد. از نظر ساختاری دارای یک زیرواحد داخل غشایی کاتالیتیک دارای حلقه هِم (Heme) با نام $gp91^{phox}$ (یا زیرواحد آلفا که در بازوی کوتاه کروموزوم X کد می‌شود) می‌باشد که به زیرواحد تراغشایی دیگری با نام $p22^{phox}$ (یا زیرواحد بتا که در کروموزوم ۱۶ کد می‌شود) متصل می‌گردد. همچنین تعدادی از زیرواحدهای سیتوزولی تنظیمی برای فعال شدن آنزیم مورد نیاز است. جهش زیرواحد آلفا باعث ایجاد فرم وابسته به کروموزوم X بیماری و جهش در سایر اجزاء آنزیم منجر به فرم اتوزومال مغلوب بیماری می‌گردد.

در طی پاسخ‌های دفاعی بدن در برابر میکروب‌ها، فعال‌سازی کمپلکس آنزیمی فوق با احیاء اکسیژن مولکولی تولید ترکیبات ROS مثل رادیکال هایپراکسید یا سوپراکسید (O_2^-) می‌کند. رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مسیری در نهایت به اسیدهای هیپوهالوس تبدیل می‌شود که برای باکتری سمی است. این فرآیند را انفجار تنفسی (Respiratory burst) می‌گویند.

بیماری CGD اغلب در دوران کودکی ایجاد شده و با عفونت‌های راجعه قارچی و باکتری‌های داخل‌سلولی کاتالاز مثبت (که پراکسید هیدروژن را تخریب می‌کنند) همراه است. بعلت نقص در کشتن میکروب‌های فاگوسیت‌شده، لنفوسیت‌های T باعث فعال‌کردن مداوم و مزمن ماکروفاژها شده و سبب ایجاد گرانولوما می‌شود.

تست نیترو بلوتترازولیوم (NBT):

یکی از تست‌های تشخیصی برای CGD، **تست نیتروبلو تترازولیوم (NBT; Nitroblue Tetrazolium Test)** می‌باشد که تکنیکی نیمه کمی است و در سال ۱۹۶۸ توسط Park و همکارانش به عنوان تست تشخیصی اصلی برای بیماری گرانولوماتوز مزمن (CGD) معرفی شد و در سال ۱۹۷۱ توسط Feigin و همکارانش تائید و گسترش یافت. علاوه بر این، تست NBT جهت تشخیص موارد دیگری نیز کاربرد دارد از جمله:

۱. تشخیص لکوسیتوزیس باکتریایی از عفونت‌های با منشا غیر باکتریایی.
۲. تشخیص پاسخ به درمان‌های آنتی‌بیوتیکی.
۳. مانیتور افراد مستعد به ابتلای عفونت‌های باکتریایی.
۴. اخیراً تست NBT برای پیگیری بیماری لیشمانیوزیس روستایی پیشنهاد شده است.

نیترو بلوتترازولیوم ماده‌ای زردکم‌رنگ و شفاف در معرض فاگوسیت‌ها قرار می‌گیرد و توسط آنها بلعیده می‌شود. این ماده توسط آنزیم اکسیداز فاگوسیتی احیاء و ایجاد رسوب ارغوانی در فاگوسیت‌ها می‌شود. در افراد مبتلا به CGD، احیاء NBT صورت نگرفته (تست منفی) و رسوب ارغوانی ایجاد نمی‌شود.

در این تست، محلول نیتروبلو تترازولیوم زردرنگ، زمانی که به‌وسیله‌ی NADPH اکسیداز موجود در نوتروفیل های فعال‌شده احیاء می‌شود، به رسوب آبی- خاکستری‌رنگ فورمازان تبدیل می‌شود. میزان احیای NBT با محاسبه‌ی درصد نوتروفیل‌هایی که در سیتوپلاسمشان رسوب فورمازان ایجادشده از طریق بررسی میکروسکوپی به دست می‌آید. میزان NBT احیاءشده متناسب با میزان رادیکال‌های اکسیژن تولیدی به‌وسیله‌ی فاگوسیت‌ها در انفجار تنفسی دارد. در صورتی که نوتروفیل‌های بیمار توانایی تولید سوپرتکسید را نداشته باشند، رسوب فوق مشاهده نمی‌گردد.

برای انجام تست، نمونه‌ی خون هپارینه با محلول NBT انکوبه شده، از آن اسمیر تهیه می‌شود و پس از رنگ‌آمیزی تحت بررسی میکروسکوپی قرار می‌گیرد تا درصد نوتروفیل‌هایی که رسوب فورمازان در آنها تشکیل‌شده مشخص شود. این درصد معمولاً در عفونت‌های باکتریال افزایش پیدا می‌کند. قابل توجه است که خون حاوی هپارین یا EDTA جهت تست NBT تا حدود یک ساعت در ۲۵ درجه سانتیگراد پایدار است.

در بعضی بیماری‌ها که با نقص متابولیک عملکرد نوتروفیل‌ها همراه‌اند، حتی زمانی که عفونت باکتریایی فعال وجود داشته باشد، تست NBT کم یا نرمال نشان داده می‌شود. این شرایط با تغییر دادن تست NBT در جهت نشان دادن تحریکات in vitro سیستم فاگوسیت، ممکن است قابل‌تشخیص باشد. این تحریک می‌تواند به‌وسیله‌ی ذرات لاتکس، زایموزان، اندوتوکسین باکتری یا غلظت بالای هپارین در ترکیب خون-NBT انکوبه ایجاد گردد.

تحریک In vitro خونی که از فرد نرمال –بدون نقص هومورال یا سلولار و بدون نقص متابولیسم گرانولوسیت ها– گرفته‌شده، افزایش درصد فورمازان درون نوتروفیل ها را نشان خواهد داد. سلول‌های بیماران دارای نقص (مانند CGD)، حتی اگر تحریک صورت بگیرد، پاسخ مثبت نشان نمی‌دهند.

روش کار

۱. به میزان ۲ تا ۳ قطره خونی که بدون انعقاد و تازه باشد را بر لام اسیدواش ریخته و سپس با استفاده از اپلیکاتور یک گستره درست می شود.
۲. لام در تانک مرتبط به اندازه ی ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه خواهد شد.
۳. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه لام با بافر PBS شسته داده می شود تا لخته های روی لام خارج شوند.
۴. بعد از اینکه لام خشک شد بر روی آن محلول NBT-PMA ریخته می شود.
۵. بعد از این مرحله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه خواهد شد، پس از ۲۰ دقیقه مجددا لام ها را توسط بافر PBS شسته داده می شود.
۶. بعد از اینکه لام ها خشک شدن بر روی آن ها مانول ریخته خواهد شد و پس از ۱ دقیقه لام ها شسته می شوند. بعد از خشک شدن لام ها، بر روی آن ها سافرانین ریخته خواهد شد و بعد از ۵ دقیقه لام ها شسته می شوند.
۷. پس از آن لام را زیر میکروسکوپ قرار داده و جهت دیدن نوتروفیل ها با گرانول های آبی تیره بررسی خواهد شد.

منابع:

۱. روش های عملی در ایمونولوژی ، دکتر عبدالرضا وارسته با همکاری دکتر محمود محمودی و ... ، ترجمان خرد ، مشهد ،۱۳۸۷
۲. سرولوژی و ایمنولوژی کاربردی ، دکتر بهنام قلعه نویی دکتر غلامرضا عزیزی مرضیه هوشور سعید طهماسبی ، نشر حیدری ، ۱۳۹۶

بررسی سیستم کمپلمان بروش تیتراسیون و همولیتیک (تست CH50)

مقدمه

سیستم کمپلمان از اجزای پروتئینی تشکیل شده که از نظر ساختمان شیمیایی با یکدیگر متفاوتند و معمولا در خون بصورت غیر فعال می باشند. کار ایمونولوژیکی هر پروتئین اختصاصی است اما فعالیت آنها به هم وابسته می باشد بطوری که بصورت پی در پی فعال شده (اصطلاحا فعال شدن آبشاری گفته می شود) و موجب فعال شدن سایر اجزای مجموعه می شوند و این مولکولهای فعال شده بنام زایموژن معروف می باشند.
سیستم کمپلمان مکانیسم مهم دفاعی بر علیه عفونت‌ها می‌باشد، به فعالیت تخریبی آنتی بادی ها کمک می کند در واکنشهای دفاعی التهابی و ایمنی بدن نقش دارد و بطور کلی دارای ارتباط با ایمنی ذاتی و هومورال می باشد.
سیستم کمپلمان ممکن است از طیق مسیرکلاسیک ویا آلترناتیو فعال شود.
مسیر کلاسیک روش اصلی بوده و با همراهی مجموعه آنتی بادی و آنتی ژن عمل می کند. فاکتورهای C1 ، C2 و C4مخصوص مسیر کلاسیک و فاکتورهای B ، D و پروپردین خاص مسیر آلترناتیو هستند سایر فاکتورها از قبیل C3 و نیز C5,6,7,8,9 در هر دو مسیر وجود دارند.
علاوه بر اینها ، پروتئینهای تنظیمی خاص سیستم ایمنی کمپلمان وجود دارند که در صورت فقدان آنها فعالیت سیستم کمپلمان به درستی صورت نمی گیرد.

سیستم کمپلمان در بیماریها

سیستم کمپلمان از دو جهت در بیماریها نقش دارد:

۱. کمبود یا افزایش فعالیت: کمبود هریک از اجزا کمپلمان منجر به عدم فعالیت سیستم کمپلمان می گردد. از طرفی فعال شدن بیش از حد کمپلمان بدلیل کمبود اجزای تنظیمی در زمان و یا مکان نامناسب منجر به التهاب شدید ، لیز سلولی و تخلیه پروتئین های کمپلمان به دلیل مصرف آنها می شود. بطور مثال کمبود C2 بعنوان شایعترین آنها و کمبود C3 با عفونت های چرک زای شدید همراه می باشد.کمبود دو پروتئین تنظیمی CD59 و DAF سبب بیماری PNH یا هموگلوبینوری حمله ای شبانه می گردد.
۲. تشکیل کمپلکس ایمنی: در پاسخ به میکروارگانیسمهای مقاوم، برخی بیماریهای التهابی و یا خود ایمن کمپلکسهای ایمنی تشکیل می شوند که این کمپلکسهای آنتی بادی و آنتی ژن با فعال کردن سیستم کمپلمان در پاتوژنز بیماری نقش دارند. از جمله بیماران روماتیسمی، لوپوس اریتروماتوز سیستمیک(SLE) و گلومرولونفریت.

روشهای اندازه گیری اجزا سیستم کمپلمان

روشهای اندازه گیری و سنجش پروتئینهای کمپلمان در آزمایشگاه شامل:

۱. سنجش کمی که مقدار اجزای کمپلمان به روش های روتین نظیر sRID ، الایزا و یا نفلومتری اندازه گیری می گردد.
۲. سنجش عملکردی (Functional): با توجه به فعال شدن آبشاری اجزا کمپلمان گاهی با اندازه گیری کمی و علیرغم سنجش مقادیر بالا یا پایین ، فعالیت سیستم مغایر با آن می باشد و سنجش های کمی چندان کمک کننده نخواهد بود به همین سبب تست هایی تحت عنوان سنجش همولیتیک ابداع شدند. از مهمترین تستهای عملکردی سنجش سیستم کمپلمان CH50 جهت ارزیابی عملکرد مسیر کلاسیک و AH50 جهت ارزیابی عملکرد مسیر آلترناتیو می باشد.

تست CH50

در این تست گلبولهای قرمز گوسفند که متصل به آنتی بادی اختصاصی خود هستند در معرض همولیز توسط کمپلمان قرار مـی گیرنـد. طبق تعریف، یک واحد CH50 عبارت است از حداقل تیتری از سرم که برای همولیز ۵۰٪ گلبول های حساس شده گوسفند لازم است.
پارامترهای موثر بر CH50 عبارتند از : غلظت گلبولهای قرمز ، شرایط بافر مورد استفاده و دما

***مواد لازم:**

۱. گلبولهای قرمز گوسفند : برای استفاده از گلبولهای قرمز گوسفند ازخون دفیبرینه گوسفند که به دلیل حذف فیبرین انعقاد در آن انجام نمی گیرد، استفاده می شود.
۲. همولیزین: سرم خرگوش حاوی آنتی بادی گلبول قرمز گوسفندی می باشد.
۳. نمونه سرم بیمار : با توجه به حساسیت کمپلمان ها ملاحظاتی برای تهیه نمونه باید صورت پذیرد. سرنگها و تجهیزات بکار رفته باسد سرد باشند، سرم باید توسط سانتریفیوژ یخچالدار (۴ ^{o}C) جدا شود، پس از جداسازی سرم را داخل لوله های تمیز انتقال داده و آن را تا زمان آزمایش در دمای یخچال (۸-۲ درجه سانتیگراد) نگاه دارید، در صورت انجام نشدن تست طی چند روز آینده، سرم را در فریزرهای ۷۰ -^{o}Cنگاه دارید. قبل از انجام آزمایش، نمونه فریز شده را در دمای اتاق قرار دهید و پس از ذوب شدن نمونه آن را به خوبی مخلوط نمایید، ذوب و فریز مکرر نمونه مـورد قبـول نمی باشد. نمونه حرارت دیده قبل از انجام آزمایش نیز مورد قبول نمی باشد.

***روش کار:**

۱. تهیه گلبولهای قرمز حساس شده: گلبولهای قرمز حساس شده در واقع، گلبولهای گوسفند پوشیده شده با آنتی بادی (آنتی سرم خرگوش) هستند. برای حساس نمودن گلبولهای قرمز پس از شستشو و تهیه سوسپانسیون ۵٪ از آن ، ۱۵ سی سی از سوسپانسیون را با ۱۵ سی سی بافر و ۱۰۰ میکرولیتر همولیزین مخلوط کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید. این گلبولهای قرمز حساس شده به مدت ۲۴ ساعت قابل استفاده می باشد.

۲. ۱۱ لوله آزمایش را در رک قرار داده و به کلیه لوله ها به اندازه ۰/۵ سی سی از گلبولهای قرمز حساس شده اضافه کنید.

۳. از سرم بیمار به نسبت ۱/۴۰ رقت تهیه نموده و بترتیب از مقادیر کم به زیاد از این رقت سرم به لوله ها اضافه شود و برای ایجاد سریال رقتی سرم به هر یک از لوله ها تا حجم ۱/۵ سی سی بافر اضافه نمایید (مقادیر سرم و بافر طبق جدول ذیل)

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
sRBC حساس شده	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
سرم ۱/۴۰	۰	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۰/۴	۰/۵	۰/۶	۰/۷	۰/۸	۰/۹	۱
بافر	۱	۰/۹	۰/۸	۰/۷	۰/۶	۰/۵	۰/۴	۰/۳	۰/۲	۰/۱	۰

۵. به مدت یک ساعت لوله ها را در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و بعد به تمامی لوله ها ۳/۵ سی سی بافر اضافه نمائید.

۶. لوله ها را خیلی آرام تکان دهید و با دور ۱۰۰۰rpm بمدت ۵ دقیقه سانتریفوژ کنید مایع رویی هر لوله را به لوله های جدید منتقل و جذب آنها را در طول موج ۵۴۱ نانومتر بخوانید (OD ایجاد شده، ناشی از هموگلوبین حاصل از لیز گلبولهای قرمز خون می باشد.)

***محاسبه:**

با در نظر گرفتن لوله ۱ بعنوان عدم لیز و بعنوان بلانک (صفر درصد لیز) و لوله شماره ۱۱ بعنوان ۱۰۰٪ لیز و محاسبه میزان درصد لیز سایر لوله ها، لوله ای که ۵۰٪ سبب لیز گلبولهای قرمز شده را مشخص کنید.

با استفاده از میزان سرم استفاده شده در این لوله و نسبت رقت سرم باید محاسبه شود که چقدر سرم باید رقیق شود تا یک سی سی آن بتواند ۵۰٪ گلبولهای قرمز حساس شده را لیز کند. این عدد بدون واحد است و CH50unit نامیده می شود.

میزان نرمال آن معمولا ۸۰–۷۰ می باشد.

منابع:

۱. روش های عملی در ایمونولوژی ، دکتر عبدالرضا وارسته با همکاری دکتر محمود محمودی و ... ، ترجمان خرد ، مشهد ،۱۳۸۷

۲. سرولوژی و ایمنولوژی کاربردی ، دکتر بهنام قلعه نویی دکتر غلامرضا عزیزی مرضیه هوشور سعید طهماسبی ، نشر حیدری ، ۱۳۹۶

رسوبگذاری در ژل (ایمونودیفوزیون) تست RID

مقدمه

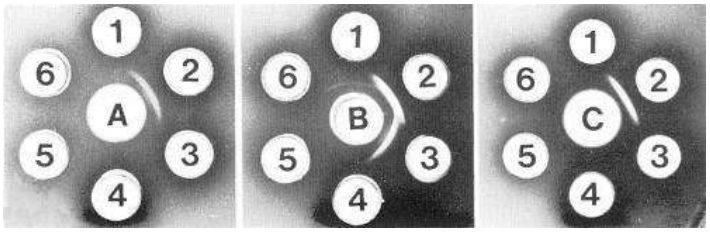
وقتی آنتی‌ژن‌های محلول در شرایط آزمایشگاهی با آنتی‌بادی مناسب خود مجاور می‌شوند پدیده‌ای قابل مشاهده به نام رسوبگذاری (پرسیپیتاسیون Percipitation) روی می‌دهد. بدیهی است برای اینکه آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها شبکه‌ای تشکیل دهند که به شکل رسوب قابل مشاهده باشد باید اولا چند ظرفیتی باشند و ثانیا در شرایط مطلوب قرار داشته باشند. برای فراهم کردن شرایط مناسب به عوامل متعددی باید توجه شود (دما، زمان و ...) اما وجود غلظت مناسب از هر دو (آنتی‌ژن و آنتی‌بادی) بسیار ضروری است و اصلی‌ترین عامل محسوب می‌شود در شرایطی که یکی از این دو غلظت بیشتری داشته باشد رسوب ایجاد نمی‌شود یا مقدار آن کم است.

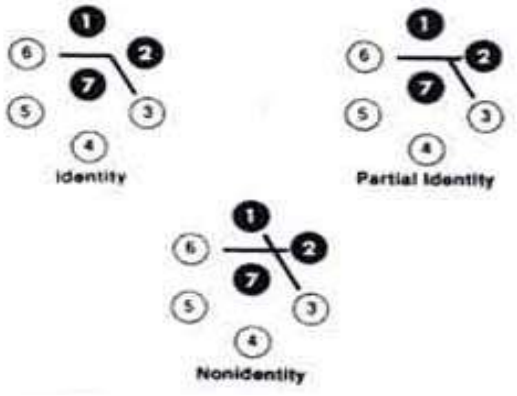
روش‌های مختلفی برای بررسی کیفی و اندازه‌گیری کمّی این رسوب وجود دارد که یکی از رایجترین آنها رسوبگذاری در ژل است (ایمونودیفوزیون Immunodiffusion). رسوبگذاری در ژل بر اساس انتشار آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در محیط نیمه جامد (معمولا ژل آگارز) است تا جایی که به غلظت بهینه (اپتیمم) برای ایجاد رسوب برسند. در این شرایط یک خط رسوبی تشکیل می‌شود.

دو روش مشهور برای تست‌های انتشار در ژل وجود دارد که یکی از آنها روش اشترلونی یا انتشار دوجانبه (Ouchterlony = Double Diffusion) است و برای بررسی کیفی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی و پی بردن به تفاوتها و شباهتهای بین آنتی‌ژنهای مختلف مناسب است.

- در روش انتشار دوجانبه ؛ حفراتی در ژل ایجاد می‌شود و آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در حفرات مجزا ریخته می‌شوند. سرعت نفوذ هر کدام از این ملکولها در ژل نسبت مستقیم با غلظت و نسبت معکوس با وزن ملکولی آنها دارد. بنابراین محل و شکل و ضخامت خطوط رسوبی تشکیل شده در شرایط مختلف متفاوت است و می‌توان همزمان چندین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی را بررسی کرد.

شکل ۱ نمونه‌ای از خطوط تشکیل شده درروش ایمونودیفیوژن دوجانبه .

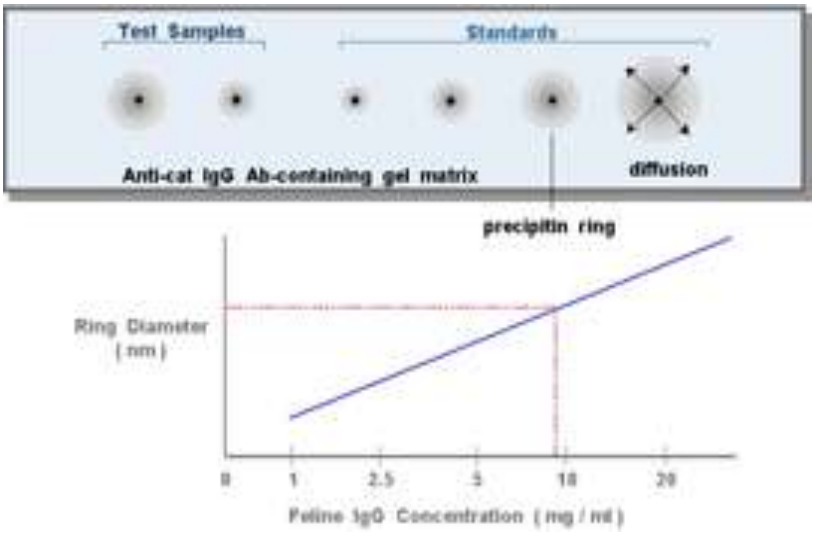




روش دیگر انتشار شعاعی (Radial immunodiffusion)است که روشی کمّی بوده و از نظر حساسیت و دقت روش مناسبی برای اندازه‌گیری مقدار بسیاری از آنتی‌ژنهاست.

- در روش انتشار شعاعی غلظت یکی از این دو (معمولا آنتی‌بادی) ثابت است و بصورت یکنواخت در ژل پخش شده است و فقط آنتی‌ژن‌ها در حفرات ایجاد شده در ژل ریخته می‌شوند. همزمان با انتشار آنتی‌ژن در ژل؛ در محلی که غلظتهای مناسب وجود داشته باشد رسوب تشکیل می‌شود که به صورت هاله‌ای قابل مشاهده است. قطر این رسوب متناسب با غلظت آنتی‌ژن می‌باشد.

این روش در آزمایشگاه ایمنولوژی بالینی کاربرد رایجی دارد و برای اندازه‌گیری غلظت اجزاء سرم مثل کمپلمان و ایمنوگلوبولین و ... به کار می‌رود.



شکل ۲ نمونه‌ای از هاله‌های ایجاد شده در روش انتشار شعاعی و نحوه ترسیم منحنی.

روش کار: جهت انجام آزمایش از پلیتهایی استفاده می‌شود که چندین حفره دارند بنابراین علاوه بر سرم

بیمار از چند کالیبراتور (استاندارد) که سرمهایی هستند با غلظتهای مشخص اجزاء سرم؛ استفاده‌می‌شود.
مراحل انجام تست بدین شرح می‌باشد:

۱. به تعداد کالیبراتورها چند حفره را شماره‌گذاری کنید و حفره‌هایی را که می‌خواهید سرم کنترل و مجهول را در آن بریزید بترتیب با C و X مشخص کنید.
۲. بکمک سمپلر و بدقت حجم مورد نیاز از هر نمونه (برای IgM و IgG هر کدام ۵µl و برای IgA؛ ۲µl) را داخل چاهک از پیش تعیین شده بریزید.

● روش ریختن نمونه در چاهک بکمک سمپلر: برای گذاشتن نمونه؛ نوک سمپلر حاوی نمونه را در ته چاهک قرار داده و به آرامی شروع به تخلیه سمپلر کنید و همزمان با پر کردن چاهک؛ نوک سمپلر را از چاهک خارج نمائید زیرا چاهکها برای پذیرش حجم مورد نظر ایجاد شده‌اند و توجه بیشتر، در گذاشتن نمونه و سرریزنکردن از چاهک نتیجه دقیقتری را بهمراه دارد.
ریختن نمونه به شکل نادرست اعم از کم و زیاد ریختن حجم سرم و یا حوادثی که حرکت رسوبی واکنش را از حالت دایره خارج نماید مانند سرریز شدن نمونه از چاهک و لبریز شدن روی ژل و نیز زخمی کردن ژل سبب دریافت نتیجهٔ نادرست می‌شود.

۳. پس از گذاشتن نمونه‌ها در چاهکهای مربوطه سرپوش پلیت راگذاشته و حدود ده دقیقه آن را بدون حرکت قرار دهید تا سرمها به درون ژل نفوذ نمایند.
۴. پس از جذب نمونه‌ها در ژل؛ پلیت را وارونه در روی سطحی صاف در دمای آزمایشگاه به مدت تعیین شده برای هر ایمونوگلوبولین قرار دهید.(IgA=24h; IgG=48h; IgM=72h)
۵. قطر رسوب دایره مربوط به هر یک از کالیبراتورها؛ کنترل و نمونه بیماران را جداگانه بکمک خطکش مخصوص RID اندازه‌گیری کنید. مشاهده و اندازه گیری واکنش رسوبی دایره‌ها در مقابل پس زمینه سیاه و تابش نور از پهلو به شکل دقیقتری انجام می‌گیرد.

● روش کار با خطکش مخصوص RID: این خطکش دو محور اندازه‌گیری دارد؛ یکی خطکش میلیمتری در لبه و دیگری مثلث اندازه‌گیری قطر دایره رسوبی تا ۱۰mmدر وسط می‌باشد.این مثلث شامل دو خط کج و یک خط موازی با افق ، در وسط بشکل میانه می‌باشد؛ خطوط کوتاه عمودی با فاصله معینی دو خط کج را مدرج کرده‌اند ارقام پایین مثلث قطر دایره رسوبی و ارقام بالای آن مجذور قطر دایره رسوبی (d^2) را نشان می‌دهند. برای اندازه‌گیری قطر دایره‌های رسوبی؛ پلیت را پشت خطکش در راس مثلث قرار داده و آنقدر جابجا کنید تا محیط خارجی دایره با دو خط کج کاملا مماس شود وخط میانه درست از وسط چاهک بگذرد.در این حالت رقم پایین خط عمودی که از وسط چاهک می‌گذرد قطر دایره رسوبی می‌باشد.برای اندازه‌گیری هاله‌های بیضی‌شکل (که بر اثر عدم دقت در زمان ریختن نمونه‌ها در چاهک ایجاد می‌شوند) قطری را که میانگین قطر بزرگ وکوچک می‌باشد مدنظر قرار می‌گیرد.
در صورتیکه دایره ایجاد شده بیش از ۱۰mm باشد از لبه و مدرج خطکش استفاده می‌شود.

۶. منحنی استاندارد را با کمک مقادیر بدست آمدهٔ کالیبراتورها رسم و غلظت سرم مجهول را بدست آورید.

● روش رسم منحنی و اندازه‌گیری غلظت: بر روی محور افقی؛ غلظت ایمونوگلوبولین در کالیبراتورهای مورد استفاده (مقادیر را از جدول ۱ پیدا کنیدو دقت شود اشتباهاً اعداد غلظت مربوط به ایمونوگلوبولین دیگری استفاده نشود) و بر روی محور عمودی؛ مجذور قطر دایره‌های رسوبی هر کالیبراتور (d^2) را جداگانه علامت‌گذاری کنید و سپس منحنی **خطی** نقاط بدست آمده را رسم نمائید.

جدول شماره ۱: مقادیر غلظت ایمونوگلوبولینها در کالیبراتورهای کیت مورد استفاده

پروتئین	کالیبراتور شماره ۱ mg/dl	کالیبراتور شماره ۲ mg/dl	کالیبراتور شماره ۳ mg/dl
IgA	۱۶۰	۳۰۰	۵۴۰
IgG	۹۰۰	۱۵۰۰	۲۰۵۰
IgM	۶۵	۱۵۰	۲۴۰

پس از رسم منحنی، از نقطه مربوط به مجذور قطر دایرهٔ رسوبی سرم کنترل (C)؛ خطی موازی محور افقی رسم کرده تا منحنی راقطع کند سپس از آنجا خطی عمودی رسم کنید وتا روی محور افقی ادامه دهید. غلظت بدست آمده باید در محدوده مقادیر موجود در جدول ۲ باشد که در این صورت نشان می‌دهد که اندازه‌گیری دایره‌ها و رسم منحنی درست بوده است.

جدول شماره ۲: مقادیر غلظت ایمونوگلوبولینها در سرم کنترل

Unit	IgA	IgG	IgM
mg/dl	۱۰۵-۲۵۰	۶۵۰-۱۲۳۰	۵۰-۱۴۵

برای بدست آوردن غلظت نمونهٔ مجهول؛ مانند نمونهٔ کنترل عمل کنید (با استفاده از مجذور قطر دایره رسوبی آن) و غلظت را بدست آورید.
نکته۱: در صورتیکه کاغذ نیمه لگاریتمی در اختیار داشته باشیم بجای استفاده از مجذور قطر؛ می‌توانیم نمودار غلظت به قطر دایره‌های رسوبی را روی این کاغذ رسم نموده که منحنی خطی‌تری بدست می‌آید و جواب دقیقتر خواهد بود.
نکته۲: اگر قطر دایره رسوبی نمونه بیمار خارج از دامنه کالیبراتور باشد باید با رقیق کردن نمونه؛ آزمایش را تکرار کرد و در زمان محاسبه غلظت ضریب رقت سرم را در نظر گرفت.

● مواردی که باید حتما در گزارش کار ذکر شود:

۱. قطر تمام دایره‌های رسوبی ومجذور آنها
۲. منحنی استاندارد
۳. غلظت بدست آمده جهت کنترل و مقایسه آن با مقادیر جدول ۲
۴. غلظت نمونه مجهول

به دو سوال زیر در گزارش کار خود پاسخ دهید:

- اگر آنتی‌ژن مورد استفاده در تستهای رسوبگذاری به صورت هاپتن تک‌ظرفیتی باشد (فقط یک شاخص آنتی‌ژنی داشته باشد) چه اتفاقی خواهد افتاد؟
- تصاویر موجود در شکل ۱ را تفسیر کنید.

منابع:

۱. پاکزاد، پرویز؛ اصول و تفسیر آزمایشهای سرولوژی بالینی؛ چاپ هفتم، مؤسسه فرهنگی انتشاراتی نور دانش، تهران،۱۳۸۱، ص۲۵۷-۲۹۱.
۲. رضایی‌پور کاردوست؛ ربابه :سرولوژی ؛ ایمونولوژی و ایمونوشیمی آزمایشگاهی؛انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران؛ ۱۳۶۹، ص ۱۲۰-۱۲۸.
3. Turgeon ML, Immunology & serology in laboratory medicine. Mosby Publication, 1996, ch.8.

تست کومس (Coomb's Test)

مقدمه

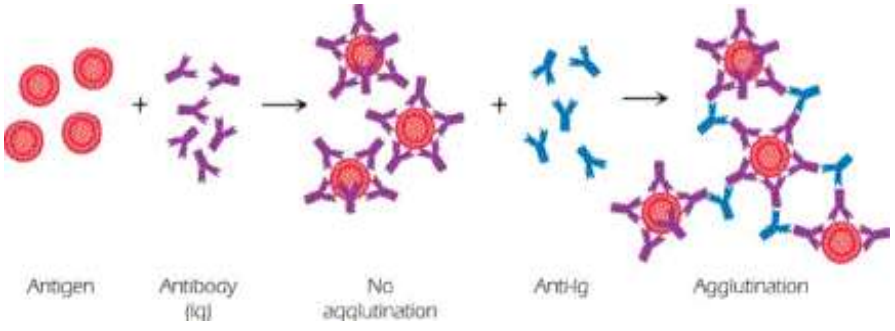
اساس تست کومبس هماگلوتیناسیون غیرمستقیم می‌باشد که هدف از انجام آن پی بردن به وجود آنتی‌بادی‌هایی است که به سطح گلبول‌های قرمز متصل می‌شوند ولی آگلوتیناسیون ایجاد نمی‌کنند. هماگلوتیناسیون غیرمستقیم به آزمایشی گفته می‌شود که برای نشان دادن آگلوتیناسیون، آنتی-بادی ثانویه مثل آنتی‌هیومن‌گلوبولین (غیر مستقیم) نیز استفاده شده باشد.

تعریف آنتی‌بادی ناکامل (Incomplete antibody):

در تست‌های آگلوتیناسیون آنتی‌بادی ناکامل به آنتی‌بادی‌هایی گفته می‌شود که به سطح گلبول‌های قرمز یا باکتری‌ها متصل می‌شوند ولی آگلوتیناسیون مشاهده نمی‌شود (در این حالت به این سلولها، سلول‌های حساس شده نیز گفته می‌شود). چنین آنتی‌بادی‌هایی قدرت اتصال همزمان به آنتی‌ژن‌های متعدد بر سطح سلول‌های مجاور و نزدیک کردن آنها به هم را به اندازه‌ای که آگلوتیناسیون دیده شود را ندارند؛ موارد زیر می‌تواند از دلایل آن باشد:

- ظرفیت آنها پائین است (مثلا آنتی‌بادی‌های دو ظرفیتی می‌توانند ناکامل باشند ولی IgM پنتامر به خوبی توانائی آگلوتیناسیون را دارد).
- این آنتی‌بادی‌ها بر علیه شاخص‌های آنتی‌ژنیک سطحی هستند که به دلیل نیروی دافعه بارهای الکتریکی بین سلول‌ها یا تعداد کم، نحوهٔ قرار گرفتن و پراکنده بودن آنتی‌ژن آگلوتیناسیون اتفاق‌نمی‌افتد (شرایط محیطی در این مورد بسیار مؤثر است).
- شکل مولکول آنتی‌بادی طوری است که نمی‌تواند بین سلول‌ها اتصال ایجاد کند (انعطاف‌پذیری و تحرک بازوها).
- بعضی مواقع اصطلاح آنتی‌بادی ناکامل برای قطعات تک‌ظرفیتی آنتی‌بادی (Fab) که از طریق آنزیماتیک ایجاد شده‌اند نیز بکار می‌رود.

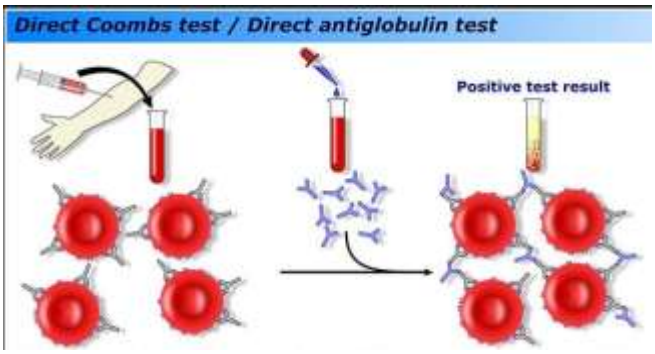
زمانیکه آنتی‌بادی‌های ناکامل یا غیرآگلوتین کننده به آنتی‌ژن‌های سطحی سلول‌ها می‌چسبند، قادر به آگلوتیناسیون آنها نیستند ولی با استفاده از معرف کومبس می‌توان موجب وقوع پدیدهٔ آگلوتیناسیون شد (شکل ۱) بنابراین به آن آگلوتیناسیون غیر مستقیم گفته می‌شود که موجب می‌شود آنتی‌بادی‌های ناکامل که بر سطح گلبول‌های قرمز چسبیده‌اند شناسائی شوند. معرف کومبس شامل آنتی‌بادی‌هایی است که بر علیه ایمونوگلبولین‌های سرم انسانی توسط خرگوش ساخته می‌شوند و با اتصال به بخش Fc آنتی‌بادی که در محل فعال شده‌اند موجب آگلوتیناسیون می‌شوند. بخش اصلی معرف کومبس آنتی‌هیومن‌گلبولین Anti Human Globulin (AHG) است که می‌تواند به تنهائی استفاده شود.

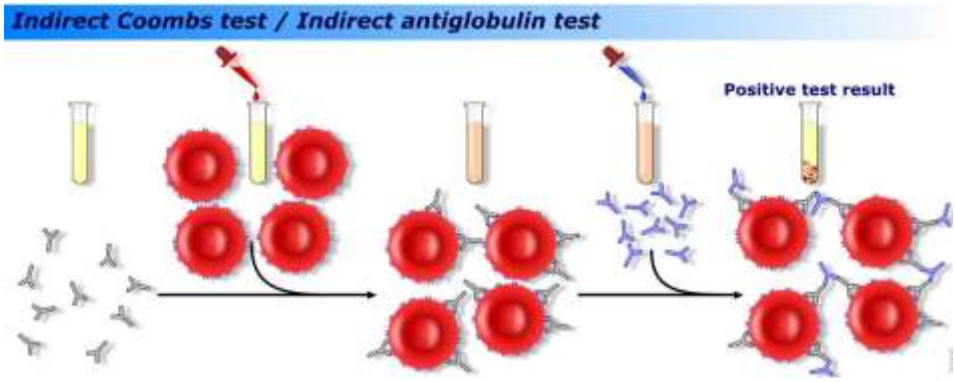


شکل ۱- ایجاد آگلوتیناسیون توسط آنتی بادی‌های ناکامل پس از اضافه کردن معرف کومس

کومس مستقیم و غیرمستقیم:

در تست کومس از آنتی‌هیومن گلبولین (AHG) استفاده می‌شود که سبب آگلوتینه شدن گلبول‌های قرمز حساس شده می‌شود. در صورتیکه هدف از انجام تست کومس پی بردن به وجود سلول‌های حساس شده در بدن فرد باشد از کومس مستقیم و در صورتیکه یافتن آنتی‌بادی‌ها در سرم مد نظر باشد کومس غیر مستقیم به کار می‌رود.. مثال مشهور و مهم از کومس مستقیم در بیماری همولیتیک نوزادان (HDN) و کومس غیر مستقیم مادران Rh- را می‌توان نام برد.





شکل۵ –کومس مستقیم و غیر مستقیم

بیماری همولیتیک نوزادان (HDN)

HDN یا اریتروبلاستوز جنینی در اثر تخریب گلبولهای قرمز جنین توسط آنتی‌بادی‌های IgG مادر ایجاد می‌شود. در اغلب موارد آنتی‌بادی‌های IgG در اثر مواجهه مادر با گلبولهای قرمز جنین در طی بارداری قبلی، ایجاد شده است. سلول‌های جنینی حاوی آنتی‌ژن‌هایی می‌باشند که از پدر به ارث رسیده و مادر را تحریک به ساختن IgG نموده‌اند. این عارضه در زنان Rh^- که دارای جنین Rh^+ هستند، اتفاق می‌افتد. در بارداری بعدی، آنتی‌بادی‌های آنتیD از کلاسIgG که قابلیت عبور از جفت را دارند، گلبول‌های قرمز جنین را تخریب می‌نمایند که موجب کم‌خونی شدیدی در جنین می‌شود و می‌تواند باعث آسیب قلبی و مرگ جنین در داخل رحم شود. تداوم تخریب گلبول‌های قرمز نوزاد موجب آزاد شدن بیلی‌روبین می‌شود. کبد جنین که فاقد آنزیم گلوکورونیل ترانسفراز است، توانایی کونژگه نمودن بیلی‌روبین غیرمستقیم را ندارد. در نتیجه افزایش سطح بیلی‌روبین خون (هیپربیلیروبینمی) موجب زردی نوزاد شده و ممکن است آسیب CNS را نیز همراه داشته باشد.

بیماری همولیتیک نوزادان وابسته به Rh (RhHDN) به دلیل آنتیD ایجاد می‌شود و شدیدترین نوع HDN است. یافته‌های آزمایشگاهی شامل DAT (تست آنتی‌گلوبولین مستقیم) شدیداً مثبت و درجات مختلف کم‌خونی و افزایش بیلی‌روبین خون است. با در نظر گرفتن علائم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی، ممکن است به درمان فوری نیاز باشد.

کاربرد روش کومبس مستقیم:

۱. تشخیص بیماری‌های همولیتیکی نوزادان مانند اریتروبلاستوز جنینی
۲. واکنش‌های انتقال خون ناجور
۳. تشخیص آنمی‌همولیتیک اتوایمیون
۴. حساس شدن گلبول‌های قرمز در نتیجه مصرف دارو یا علل ناشناخته
۵. جهت تعیین گروه خونی Du
۶. مطالعهٔ گلبولهای قرمزی که تخریب آنها بوسیله اتوآنتی‌بادیها یا آلوآنتی‌بادیها صورت می‌پذیرد.

روش کومبس غیر مستقیم:

- وجود آنتی‌بادی بر علیه گلبول‌های قرمز جنین در مادران
- تشخیص و درمان بیماری‌های همولیتک نوزادان که مربوط به حضور آلوآنتی‌بادیها می‌باشد.
- واکنش‌های انتقال خون ناجور
- تشخیص اتو آنتی‌بادی بر علیه گلبول‌های قرمز در سرم بیماران اتوایمیون
- آنتی‌بادی در سرم برعلیه گلبول‌های قرمز در نتیجه مصرف دارو

روش کار و تفسیر نتایج تست کومس

الف: روش مستقیم Direct:

از این روش برای شناسایی گلبول‌های قرمز حساس شده (که گاماگلوبولین یا سایر پروتئین‌های سرم به سطح آنها چسبیده‌اند) استفاده می‌شود. در این روش پس از تهیه خون؛ گلبول‌هارا شستشو داده (برای جدا کردن Igهای آزاد) سپس معرف AHG اضافه می‌کنیم در صورتیکه آگلوتیناسیون صورت بگیرد نشان می‌دهد که سلول‌های قرمز توسط آنتی‌بادی‌های ناکامل پوشیده شده بودند.

ب: روش غیر مستقیمIndirect:

روش غیر مستقیم یک واکنش دو مرحله‌ای است که برای شناسایی آنتی‌بادی‌های ناکامل موجود در سرم بیماران بکار می‌رود. در این روش ابتدا سرم مورد آزمایش را با سوسپانسیون آمادهٔ گلبول‌های قرمز مجاور می‌کنیم. پس از انکوباسیون سلولها را شستشو می‌دهیم. در مرحلهٔ بعد AHG اضافه می‌شود و وقوع آگلوتیناسیون نشان‌دهندهٔ وجود آنتی‌بادی در سرم می‌باشد.

در آزمایشگاه فقط روش غیر مستقیم انجام خواهد شد لذا مراحل این روش بطور کامل شرح داده می‌شود. (البته مراحل روش مستقیم مشابه مرحله هفتم به بعد است و با استفاده از خون بیمار انجام میشود):

۱. تهیهٔ گلبولهای قرمز O^+
۲. شستشوی گلبولهای قرمز سه بار با سرم فیزیولوژی
۳. تهیه سوسپانسیون ۵ درصد با سرم فیزیولوژی
۴. اضافه نمودن یک یا دو قطره از سوسپانسیون ۵ درصد به یک لولهٔ تمیز و خشک
۵. اضافه کردن یک یا دو قطره از سرم فرد مورد آزمایش به گلبولها و مخلوط نمودن
۶. انکوباسیون در ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه
۷. شستشوی گلبولهای قرمز سه بار با سرم فیزیولوژی
۸. اضافه نمودن یک یا دو قطره آنتی هیومن به محتویات لوله
۹. سانتریفوژ نمودن ۱۰۰۰ دور در دقیقه
۱۰. بررسی وجود یا عدم وجود آگلوتیناسیون

در گزارش‌کار خود پاسخ دهید:

۳. چرا در تست کومبس غیر مستقیم از گروه خون O^+ استفاده می‌شود؟
۴. آیا ممکن است اولین نوزاد Rh^+ از مادر Rh^- نیز مشکل بیماری همولیتیک نوزادان را داشته باشد؟ چرا؟

منابع:

۱۲. پاکزاد، پرویز؛ اصول و تفسیر آزمایشهای سرولوژی بالینی؛ چاپ هفتم، مؤسسه فرهنگی انتشاراتی نور دانش، تهران،۱۳۸۱.
۱۳. قلعه نویی، بهنام؛ سرولوژی و ایمونولوژی کاربردی همراه با اصول و تفسیر آزمایش ها؛ چاپ اول،۱۳۹۶.
۱۴. محمد وجگانی،...
۱۵. رضایی‌پور کاردوست؛ ربابه :سرولوژی ؛ ایمونولوژی و ایمونوشیمی آزمایشگاهی؛انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران؛ ۱۳۶۹.
۱۶. غفاری، سید حمیدالله؛ مطالعات موردی در ایمونولوژی بالینی، ویرایش سوم، نشر طبیب، تهران، پائیز ۱۳۸۲.

17. Howard PR, Blaney KD. Basic and applied concepts of immunohematology. Mosby Publication, 1993, ch.13.

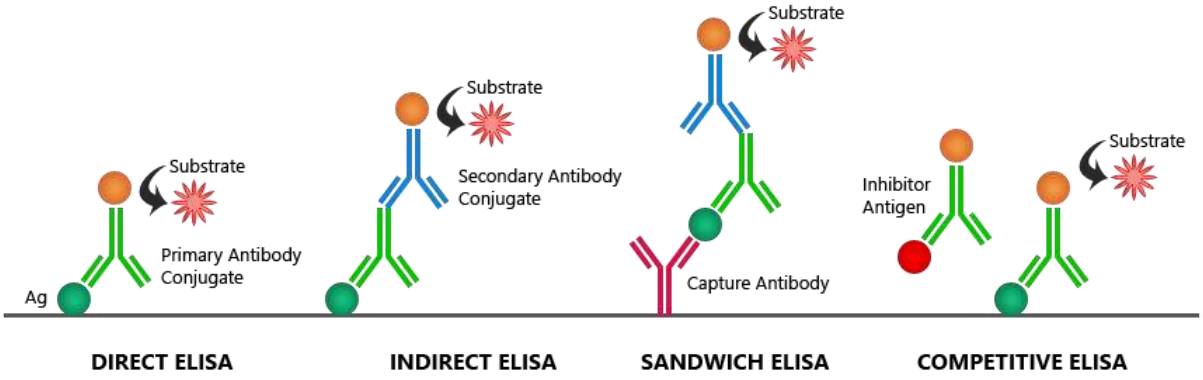
Enzyme – Linked Immunosobent assay (ELISA) تست الایزا

مقدمه

روش‌های ایمونولوژیک برای تعیین غلظت آنتی‌ژن دارای حساسیت و ویژگی عالی هستند و روشهای استانداردی در تحقیقات یا کاربردهای بالینی می‌باشند. اساس همه روش‌های ایمونوشیمیایی جدید برای تعیین مقدار، این است که یک آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی خالص وجود دارد که مقدار آن را می‌توان با یک مولکول معرف اندازه‌گیری کرد. وقتی مولکول معرف با یک رادیوایزوتوپ نشاندار شده باشد می‌توان با استفاده از دستگاهی که رادیو اکتیویته را تشخیص می‌دهد مقدار آنرا معلوم کرد.این سنجش رادیو ایمونواسی (RIA) نام دارد. اگر مولکول معرف به صورت کووالان به یک آنزیم وصل شده باشد، می‌توان با اسپکترومتر، میزان تبدیل سوبسترا بدون رنگ به محصولی رنگی توسط آنزیم را تعیین کرد و به این وسیله مقدار آن مولکول را معین نمود به این روش سنجش جذب ایمنی آنزیمی (الایزا) گفته می‌شود.

انواع مختلف الایزا :

۱. الایزا مستقیم
۲. الایزا غیر مستقیم
۳. الایزا ساندویچ
۴. الایزا رقابتی(میزان جذب نور با مقدار آنتی‌ژن رابطه عکس دارد)



شکل ۱-انواع الایزا

کاربرد

۱. در تشخیص بیماری هایی مثل HIV و هپاتیت C وB ، توکسوپلاسما، سرخک و سرخجه
۲. تشخیص آلرژن ها در محیط و غذا
۳. اندازه گیری اتوآنتی بادی در بیماری های اتوایمیون مثل لوپوس و آرتریت روماتوئید
۴. اندازه‌گیری توکسین در غذای آلوده
۵. غربالگری اهداکنندگان خون از نظر بیماری‌های مسری
۶. اندازه‌گیری سطوح هورمون در مایعات بدن
۷. بررسی بیمار آرتریت روماتوئید

ویژگی انزیم مورد استفاده در الایزا

۱. اختصاصیت بالا
۲. پایداری بالا
۳. عدم حضور آنزیم درآنتی‌ژن و آنتی‌بادی و مایعات مورد بررسی

رایج ترین آنزیم مورد استفاده در تست الایزا پراکسیداز و الکالین فسفاتاز می‌باشد

مقدار ثابتی از یک آنتی‌بادی (آنتی‌بادی اول) به ردیفی از سطوح جامد مثل حفرات میکروپلیت‌های پلاستیکی متصل می‌شود. نمونه آزمون که حاوی آنتی‌ژن با غلظت نامعلوم است و یک سری محلول‌های استاندارد که غلظت آنتی‌ژن آنها معلوم است به حفرات جداگانه اضافه می‌شوند تا به آنتی‌بادی متصل شوند. آنتی‌ژنهای متصل‌نشده پس از شستشو حذف می‌شوند و آنتی‌بادی دوم که با آنزیم نشاندار شده به حفرات اضافه شده و به اپی‌توپ‌های دیگری از آنتی‌ژن متصل می‌شوند. آنتی‌ژن مثل یک پل عمل می‌کند و لذا هرچه آنتی‌ژن بیشتری در محلول آزمون یا استاندارد وجود

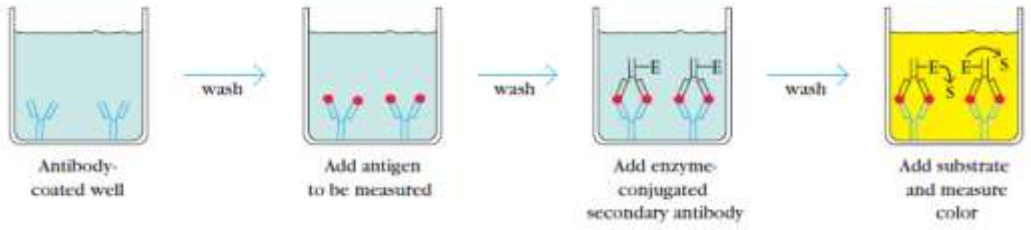
داشته باشند آنتی‌بادی نشاندار دوم بیشتر متصل می‌شود. از محلول‌های استاندارد استفاده می‌شود تا منحنی اتصال آنتی‌بادی دوم بر اساس غلظت آنتی‌ژن ، رسم شود و از روی آن مقدار آنتی‌ژن در نمونه‌های مجهول محاسبه گردد.
وقتی این آزمایش با دو آنتی‌بادی مونوکلونال انجام می‌شود، شاخص‌هایی که این آنتی‌بادیها روی آنتی‌ژن شناسایی می‌کنند نباید همپوشانی داشته باشند درغیر این صورت آنتی‌بادی دوم نمی‌تواند متصل شود. در حال حاضر از این آزمایش برای تشخیص بیماری ایدز و هپاتیت استفاده می‌شود.

مقدار ثابتی از یک آنتی‌بادی (آنتی‌بادی اول) به ردیفی از سطوح جامد مثل حفرات میکروپلیت‌های پلاستیکی متصل می‌شود. نمونه آزمون که حاوی آنتی‌ژن با غلظت نامعلوم است و یک سری محلول‌های استاندارد که غلظت آنتی‌ژن آنها معلوم است به حفرات جداگانه اضافه می‌شوند تا به آنتی‌بادی متصل شوند. آنتی‌ژنهای متصل‌نشده پس از شستشو حذف می‌شوند و آنتی‌بادی دوم که با آنزیم نشاندار شده به حفرات اضافه شده و به اپی‌توپ‌های دیگری از آنتی‌ژن متصل می‌شوند. آنتی‌ژن مثل یک پل عمل می‌کند و لذا هرچه آنتی‌ژن بیشتری در محلول آزمون یا استاندارد وجود داشته باشند آنتی‌بادی نشاندار دوم بیشتر متصل می‌شود. از محلول‌های استاندارد استفاده می‌شود تا منحنی اتصال آنتی‌بادی دوم بر اساس غلظت آنتی‌ژن ، رسم شود و از روی آن مقدار آنتی‌ژن در نمونه‌های مجهول محاسبه گردد.
وقتی این آزمایش با دو آنتی‌بادی مونوکلونال انجام می‌شود، شاخص‌هایی که این آنتی‌بادیها روی آنتی‌ژن شناسایی می‌کنند نباید همپوشانی داشته باشند درغیر این صورت آنتی‌بادی دوم نمی‌تواند متصل شود. در حال حاضر از این آزمایش برای تشخیص بیماری ایدز و هپاتیت استفاده می‌شود.

الایزا ساندویچ (ANTIBODY-SANDWICH ELISA ELISA)

این مناسب برای سنجش آنتی‌ژن‌های مختلف و بسیار حساس است. در این روش چاهکها با آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن مورد نظر پوشانده می‌شوند (آنتی‌بادی اول). پس از انکوباسیون و بلاک کردن فضاهای خالی و شستشو، نمونه حاوی آنتی‌ژن به چاهکها اضافه وو انکوبه می‌شود. شستشوی بعدی، ملکول‌های غیر متصل را حذف می‌کند. آنتی‌بادی دوم هم علیه آنتی‌ژن است ولی با آنتی‌بادی اول متفاوت بوده، به انزیم نیز متصل است (آنتی‌بادی کونژوگه) یا ممکن است ملکول بیوتین به آنتی‌بادی دوم متصل باشد و در مرحله بعد انزیم متصل به اویدین به آن اضافه گردد. مرحله نهائی بعد از شستشو، اضافه کردن سوبسترا و بررسی رنگ تولید شده خواهد بود.

- تهیه نمونه‌های استاندارد آنتی‌ژن با غلظت‌های مناسب و رسم منحنی استاندارد، برای محاسبه غلظت دقیق آنتی‌ژن در هر چاهک لازم است.



مواد لازم:

۱. پلیت ۹۶خانه الایزا که چاهکهای آن با آنتی‌بادی اول پوشیده (Coat) شده است
۲. ۶ تا ۸ استاندارد که غلظت آنتی‌ژن (مولکول مجهول در نمونه‌ها) در آنها مشخص می‌باشد و در کیتهای مختلف متفاوت بوده و توسط کارشناس آزمایشگاه اعلام می‌شود و جهت استفاده در گزارش کار خود در جاهای خالی زیر مقادیر آنها را یادداشت نمائید:
S_1=..... S_2=..... S_3=..... S_4=..... S_5=..... S_6=..... S_7=..... S_8=.....
* در بعضی از کیتها یک محلول رقیق‌کننده استاندارد نمونه‌ها وجود دارد.
۳. محلول شستشوی چاهک‌ها
۴. آنتی‌بادی دوم
۵. آنزیم (در بعضی از کیتها آنزیم از قبل به آنتی‌بادی دوم متصل و در یک ویال بنام آنتی‌بادی کونژگه وجود دارد.)
۶. سوبسترای آنزیم
۷. محلول متوقف‌کننده

روش‌کار:

۱. محل ریختن استانداردها و نمونه‌ها در چاهکهای پلیت ۹۶خانه را معین و یادداشت نمائید. (مثلاً S_1 در چاهک A1 ، S_2 در چاهک A2 ..... و X1 در چاهک B1 و .....)
۲. مقدار تعیین شده در کیت برای استاندارد ونمونه‌ها (µl.....) را در چاهکهای تعیین شده بریزید و در صورت نیاز به رقیق‌کننده مقدار تعیین‌شده برای آنرا (µl.....) به چاهکها اضافه نمائید.
۳. پلیت را در مدت زمان لازم (..... دقیقه) جهت اتصال آنتی‌ژن موجود در استاندارد ونمونه‌ها در دمای اتاق قرار دهید.

۴. پس از خالی کردن چاهکها با استفاده از محلول شستشو .... بار چاهکها را شسته و با استفاده از کاغذ صافی کاملاً خشک نمائید.
۵. مقدار تعیین شده در کیت برای آنتی‌بادی دوم یا آنتی‌بادی کونژگه (µl.....) را در چاهکها بریزید.
۶. پلیت را در مدت زمان لازم (..... دقیقه) جهت اتصال آنتی‌بادی دوم به آنتی‌ژن در دمای اتاق قرار دهید.
۷. پس از خالی کردن چاهکها با استفاده از محلول شستشو .... بار چاهکها را شسته و با استفاده از کاغذ صافی کاملاً خشک نمائید.
۸. مقدار تعیین شده در کیت برای آنزیم (µl.....) را در چاهکها بریزید. (در صورتی که آنتی‌بادی دوم بصورت کونژگه باشد این مرحله ومراحل ۹و ۱۰ وجود ندارد.)
۹. پلیت را در مدت زمان لازم (..... دقیقه) جهت اتصال آنزیم به آنتی‌بادی دوم در دمای اتاق قرار دهید.
۱۰. پس از خالی کردن چاهکها با استفاده از محلول شستشو .... بار چاهکها را شسته و با استفاده از کاغذ صافی کاملاً خشک نمائید.
۱۱. مقدار تعیین شده در کیت برای سوبسترا (µl.....) را در چاهکها بریزید
۱۲. پلیت را در مدت زمان لازم (..... دقیقه) جهت فعالیت آنزیمهای متصل بر سوبسترا در دمای اتاق قرار دهید.
۱۳. مقدار تعیین شده در کیت برای محلول متوقف کننده (µl.....) را در چاهکها بریزید.
۱۴. جذب نوری (OD) چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر تعیین نمائید.
۱۵. بر روی کاغذ میلیمتری با استفاده از OD بدست آمده برای استانداردها (محور Yها) و غلظت مشخص آنها (محور Xها) نمودار نقطه به نقطه رسم نمائید و از روی آن غلظت مجهول را محاسبه نمائید.

منابع:

۱. غضنفری طوبی, یارائی رویا. ایمونولوژی سلولی و مولکولی ابوالعباس؛ انتشارات پورسینا؛ تهران؛ ۱۳۸۰؛ ص ۶۶۹-۶۸۵
2. Lewis JA. Antiviral activity of cytokines. In “Cytokines: A practical approach.” 2ed Blackwill FR, IRL Press, Oxford, 1995, 400-405.