دانشگاه علوم پزشکی فسا

گروه ایمونولوژی

دستور کار آزمایشگاه ایمونولوژی

انواع عکس العمل های سرولوژی

(Serological Reactions)

بوسیله آزمایشهای سرولوژیک می توان یک آنتی ژن یا آنتی بادی مجهول را شناسائی و مقدار آن را اندازه گیری نمود. وقتی کـه آنتـی ژن و آنتی بادی ضد آن (Specific antibody) با یکدیگر مخلوط شوند ، بر اساس فرم یا ساختمان مولکولهای آنتی ژن ، کمـپلکس آنتی بادی و آنتی ژن به شکلهای مختلفی تشکیل می شود. بنابراین بر اساس شکل مولکولهای آنتی ژن ، واکنشهای سرولوژی را به سه دسته تقسیم می کنند :

۱- واکنشهای رسوبی یا پرسیپیتاسیون (Precipitation reactions) : در این واکنشها آنتی ژن بصورت مولکولهـای محلـول اسـت مانند سرم پروتئینها یا مواد مترشحه میکروبی.

۲- واکنشهای متراکم یا آگلوتیناسیون (Agglutination reaction) : اگر آنتی ژن بصورت ذرات غیر محلول مانند باکتریها باشـد ، واکنش را آگلوتیناسیون و اگر آنتی ژن گلبول قرمز باشد ، واکنش را هماگلوتیناسیون (Hem agglutination) گویند.

۳- واکنشهای فلوکولاسیون (Flocculation reaction) : وقتی که آنتی ژن بصورت ذرات کلوئیدی باشد مثل کاردیولیپین قلب گاو در آزمایش VDRL ، واکنش را فلوکولاسیون می نامند.

گاهی بر اساس عملکرد (Function) آنتی بادی ، واکنشهای سرولوژی را تقسیم مـی کننـد. ماننـد واکنشـهای خنثـی شـدن سـمها (Toxin neutralization reactions) و واکنشهای خنثی ساختن میکروارگانیسم ها که از همه مهمتر واکنشـهای خنثـی سـازی ویروسها (Virus neutralization reactions) می باشند. بعضی از واکنشهای سرولوژی بر اسـاس دخالـت کمپلمـان صـورت مـی گیرند. به این گروه از واکنشهای سرولوژی که با شرکت کمپلمان انجام می شوند واکنشهای فیکساسیون کمپلمان (Complement fixation reactions) یا ثبوت مکمل و یا ایمیون همولیز (Immune hemolysis) می گویند.

اساس و پایه آزمایش های سرولوژی

امروزه آزمایشهای سرولوژی بالینی از روشهای سریع و آسان در تشخیص بیماریها می باشند. این آزمایشها بر اساس اتصال آنتـی بـادی اختصاصی (Specific antibody) به آنتی ژن مربوطه صورت می گیرد. آنتی ژن مورد نظر می تواند باکتری ، ویروس ، گلبول قرمز، پروتئین ، هورمون و یا چیز های دیگری باشد.

عواملی که در واکنش های آنتی بادی - آنتی ژن دخالت دارند

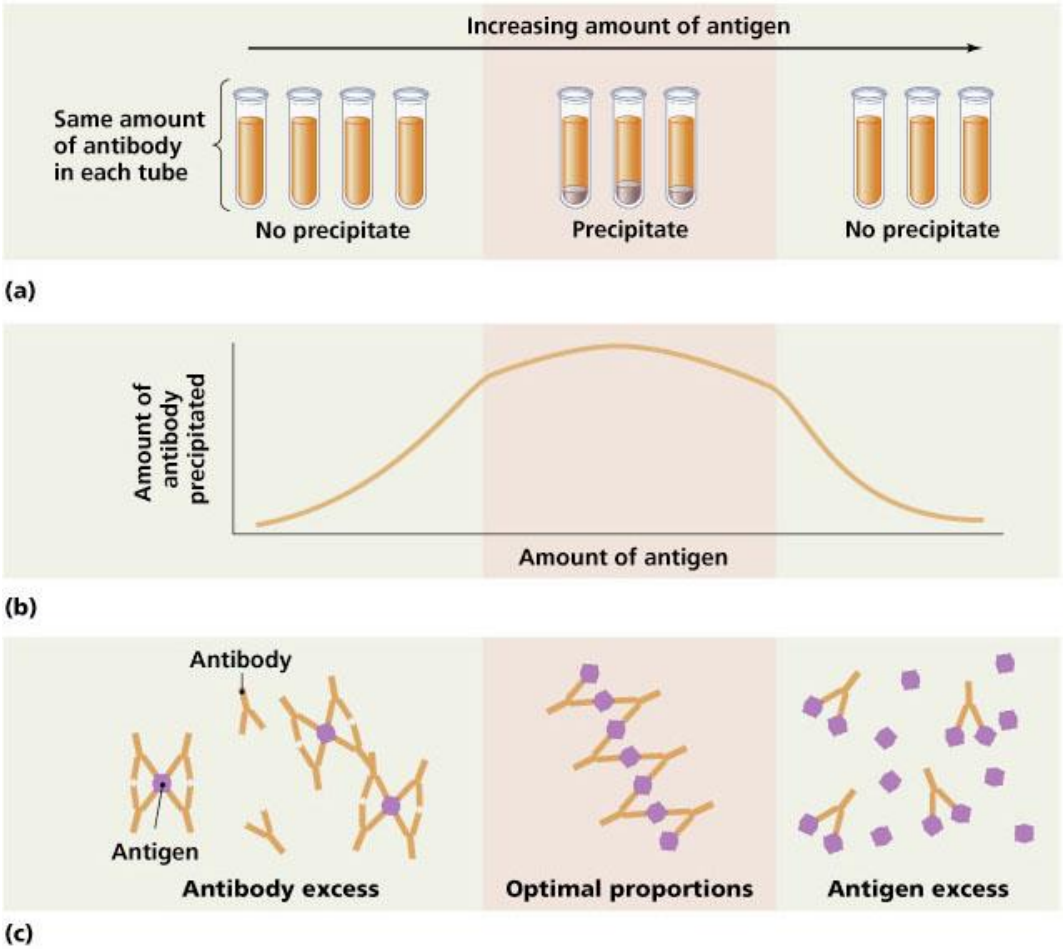
۱- قدرت اتصال آنتی بادی به آنتی ژن (Avidity) : هرچه قدرت اتصال آنتی بادی به آنتی ژن محکمتـر باشـد کمـپلکس آنتـی ژن و آنتی بادی مشکلتر از یکدیگر جدا می شوند.

۲- PH محیط : مناسب ترین PH برای واکنشهای سرولوژی PH= ۷/۲ می باشد.

۳- قدرت یونی محیط (Ionic strength) : عکس العملهای سرولوژی در محیطی که فاقد الکترولیتها باشد مانند آب مقطر صورت نمی گیرد. همچنین چنانچه غلظت نمک زیاد باشد باعث رسوب آنتی بادی و آنتی ژن پروتئینی می شود. معمولاً سرم فیزیولوژی ۰/۱۵ مولار و یا تامپون فسفات نمکی (Phosphate buffer saline)،(PBS با قدرت یونی ۰/۰۲ مولارفسفات در PH= ۷/۲ برای رقیق کردن سرم بیمار و عکس العملهای سرولوژی بسیار مناسب است.

۴- نسبت غلظت آنتی ژن و آنتی بادی (Optimal concentration ratio) : اولین بار هایدلبرگر (Heidelberger) و همکارانش نشان دادند که غلظت آنتی ژن و آنتی بادی اختصاصی باید با یکدیگر متناسب باشند تا تمام آنتی بادی موجود در لوله آزمایش به آنتی ژن مجاورش متصل شوند و حداکثر واکنش سرولوژی انجام پذیرد. این محققین مقادیر متفاوتی از یک آنتی ژن پلی ساکاریدی را در لوله های آزمایش ریخته و به آنها مقدار ثابتی از آنتی بادی ضد آن را اضافه نمودند. سپس مقدار پروتئین رسوب داده شده را به ترتیب لوله های آزمایش ، بر روی منحنی رسم کردند.

" شکل منحنی واکنش رسوبی مقدار ثابت آنتی کر با غلظت های مختلف آنتی ژن (منحنی هایدلبرگر) "



با توجه به این منحنی ، مشاهده می شود که در لوله های آزمایش ابتدائی از سمت چپ ، مقدار آنتی ژن نسبت بـه آنتـی بـادی کمتـر است. در این لوله ها مقدار آنتی بادی رسوب داده شده نیز کمتر از لوله های وسط می باشد. در لولـه هـای ابتـدائی ، مقـداری از آنتـی بادی آزاد می باشد به این ناحیه منطقه آنتی بادی اضافی و یا اصطلاحاً پرو – و یـا پـری زون Pro – or prezone مـی گوینـد. لولـه های وسط ، منطقه ای است که تقریباً تمام آنتی بادی موجود در لوله به آنتی ژن متصل شده و رسـوب کـرده اسـت. بـه ایـن ناحیـه ، منطقه تعادل Equivalence می گویند. در لوله های سمت راست منحنی ، نسبت مقدار آنتی ژن بتدریج نسبت به مقدار ثابت آنتـی بادی افزایش پیدا می کند و منحنی سیر نزولی را طی می کند و در نتیجه مقدار آنتی بادی که به آنتی ژن متصل شده و رسوب نموده است ، کاهش می یابد. این ناحیه را منطقه آنتی ژن اضافی و یا در اصطلاح پست زونPost zone می نامند.

کاربرد عملی منحنی هایدلبرگر در تمام آزمایشهای سرولوژی می باشد. بر اساس این آزمایش ، چنانکه در تیتراسیون سـرم بیمـاری در لوله های اول جواب آزمایش منفی ولی در لوله های وسط مثبت شود ، یا بطور غیر یکنواخت لوله های آزمایش مثبت و منفـی شـوند ، علت آن نامتناسب بودن نسبت غلظت های آنتی ژن و آنتی بادی به یکدیگر می باشد. به ایـن وضـعیت در اصـطلاح پدیـده منطقـه ای (Zone phenomenon) می گویند. از جمله آزمایشهای که این پدیده ممکن است در آن اتفاق بیفتد ، آزمـایش رایـت(Wright) برای تشخیص بیماری تب مالت می باشد.

۵- تاثیر مواد احیاء کننده (Reducing agents) : ایمونوگلبولینهای IgE، IgD و IgM نسـبت بـه مـواد احیـاء کننـده ماننـد ۲-مرکاپتواتانول (2-Mercaptoethanol) یا (2-ME) و دای تیوتریئیتول(Dithiothreitol) حساسیت بیشتری نسبت به IgG و IgA دارند. بنابراین در بعضی آزمایشهای سرولوژی چنانکه تشخیص و اندازه گیری IgG از IgM مورد نظر باشد ، با اضـافه کـردن مقدار معینی از یک ماده احیاءکننده به سرم IgM تجزیه شده ، ولی IgG سالم مانده و اندازه گیری می شود. مانند آزمایش 2ME Wrigth برا ی تشخیص بیماری تب مالت مزمن. یادآوری می شود که در غلظت زیاد مواد احیاء کننده ، تمام کلاسهای ایمونوگلبولین تجزیه می شوند.

۶- درجه حرارت (Temperature) : به نظر میرسد که درجه حرارت تاثیر چندانی بر روی عکس العمل های سرولوژی ندارد ولـی بـا این وجود در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد ، واکنشهای سرولوژی سریعتر قابل رویت می باشند.در درجات پـائین حتـی در صـفر درجه سانتیگراد نیز واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی صورت می گیرد. در حرارت بالاتر از ۵۶ درجه سانتیگراد بـه مـدت نـیم سـاعت ایمونوگلبولین های IgE و IgD همچنین کمپلمان خواص بیولوژیکی خود را از دست می دهند (در بعضی از تست های سرلوژی کـه سیستم کمپلمان باعث ایجاد حالت مثبت کاذب می شود می بایست قبل از انجام آزمایش به مـدت نـیم سـاعت سـرم را در دمـای ۵۶ درجه سانتی گراد قرار داد تا کمپلمان غیر فعال شود). در درجـه حـرارت هـای بـالاتر از ۷۰ در جـه سـانتی گـراد ، سـایر کلاسـهای ایمونوگلبولین نیز ممکن است دناتوره شوند و به آنتی ژن متصل نشوند. در بعضی بیماریها ، ایمونوگلبـولین خاصـی در سـرم پیـدا مـی شود که در درجه حرارت کمتر از ۳۷ درجه سانتی گراد رسوب می کند به این دسته از ایمونوگلبولینها در اصطلاح کرایوایمونوگلبـولین یـا کرایوگلبـولین (Cryoglobulin) مـی گوینـد و از کـلاس IgM و گـاهی IgG و بنـدرت IgA مـی باشـند. نـوع دیگـر ایـن ایمونوگلبولینها که در سرما با آنتی ژن گروههای خونی واکنش می دهد بنام آگلـوتی نـین سـرد (Cold agglutinin) نامیـده مـی شوند ، مانند آگلوتی نین ضد آنتی ژنهای گروه خونی سیستم I/i . از طرف دیگر بعضی از ایمونوگلبـولین در گرمـای حـدود ۶۰ تـا ۷۰ درجه سانتی گراد نا محلول و بطور برگشت پذیر رسوب می کنند. ایـن دسـته پروتئینهـا را پیروگلبـولین (pyrogloobulin) مـی گویند. پیرو گلبولینها بیشتر از کلاس IgG و گاهی IgM و IgA می باشند.

۷- زمان (Incubation time) : اتصال مولکولهای آنتی بادی به آنتی ژن معمولاً بسرعت و در عرض چند ثانیه صورت می گیرد ولـی برای تشکیل کمپلکس و دیدن واکنش مدن زمانی وقت لازم است و این زمان برای هر آزمایش با توجه به نوع آنتی ژن و کـلاس آنتـی

بادی متفاوت است. بطور کلی چنانکه آنتی بادی از کلاس IgM و مولکولهای آنتی ژن درشت باشند زمان لازم برای دیده شدن کمپلکس آنتی ژن و آنتی بادی کوتاهتر از کلاس IgG است ، مانند تعیین گروه خونی سیستم ABO در مقایسه با سیستم RhO

۸- تاثیر حرکت دادن (Stirring) ، تکان دادن (Shaking) و سانتریفیوژ کردن (Centrifugation) : برای سرعت بخشیدن به رویت عکس العمل بین آنتی ژن و آنتی بادی ، پس از مجاورت و مخلوط کردن آنها ، از راههای مختلفی می توان کمک گرفت. در صورتی که آنتی ژن و آنتی بادی بر روی لام مخلوط شده باشند می توان با حرکت دورانی آرام ، لام را حرکت داد. اگر آنتی ژن و آنتی بادی در لوله آزمایش بر روی هم ریخته شده اند می توان با تکان دادن لوله ، ظاهر شدن واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی را تسریع کرد. گاهی اوقات لازم است مولکولهای آنتی ژن و آنتی بادی با فشار در مجاورت یکدیگر قرار گیرند تا عکس العمل بین آنها صورت گیرد. برای این کار می توان از سانتریفیوژ کمک گرفت.

واکنشهای سرولوژی آزمایشگاهی (In-vitro) را می توان به دو دسته اولیه و ثانویه تقسیم نمود واکنشهای اولیه شامل اتصال اولیه یک آنتی ژن با یک مولکول آنتی بادی است. این واکنشها بخودی خود بندرت مستقیماً قابل رویت هستند. برای مشاهده این دسته واکنشها باید آنتی بادی یا آنتی ژن را بوسیله موادی از جمله فلورسنت ، رادیواکتیو یا آنزیم نشاندار کرد. آزمایشهائی که بر اساس واکنشهای اولیه سرولوژی انجام می شوند بترتیب بر حسب نوع ماده نشاندار بنام ایمونوفلوئورسنت ، رادیوایمونواسی(RIA) و الیزا (ELISA) خوانده می شوند. این دسته آزمایشات از حساسیت بالایی برخوردار هستند و مقادیر بسیار جزئی از آنتی بادی یا آنتی ژن را می توانند شناسایی کنند. واکنشهای ثانویه در حقیقت تجلی اجتماع چندین مولکول آنتی ژن و آنتی بادی است که به صورتهای پرسیپیتاسیون ، آگلوتی ناسیون ، فلوکولاسیون ، ثبوت مکمل ، خنثی سازی و غیره دیده می شوند.

واکنش های پرسی پیتاسیون

پرسی پیتاسیون از واکنش آنتی بادی **محلول** با آنتی ژن **محلول** به وجود می آید که با چشم غیر مسلح قابل مشاهده نیست. با انتشار آنتی ژن ها و آنتی بادی های محلول در محیط نیمه جامد (ژل آگار) می توان کمپلکس های آنتی ژن – آنتی بادی بوجود آورد که با چشم غیر مسلح نیز قابل مشاهده می باشند. . وقتی آنتی ژن و آنتی بادی در داخل ژل به یکدیگر برخورد می کنند به یکدیگر متصل شده و در همان محل در منطقه تعادل(اکی والان) تشکیل رسوبی قابل رویت می دهند.

واکنش ایمونوپرسی پیتاسیون

در واکنش ایمونوپرسی پیتاسیون ملکلول های آنتی ژن و یا آنتی بادی طی روند انتشار ساده در داخل یک بستر انتخابی (مثلاً داخل ژل آگارز) به حرکت در می ایند .حال اگر عوامل ذکر شده اختصاصی هم باشند در محل برخورد کمپلکسی تشکیل می شود که غیر محلول می باشد . واکنشی که به این ترتیب صورت پذیرفته به واکنش ایمونوپرسی پیتاسیون و کمپلکس های تشکیل شده به خطوط یا یاند های رسوبی معروف هستند.این باند های رسوبی معمولا در داخل بستر انتخابی و در محلی که این پدیده اتفاق افتاده بدون حرکت با قی می مانند(شکل ۲-۱۱) .شیوه های ایمونودیفوزیون را بر حسب جهت حرکت و تعداد عوامل واکنش کننده به دو دسته تقسیم می شوند:

1) Double immunodiffusion
2) Radial immunodiffusion

روش Double immunodiffusion

ایمونودیفوزیون دوگانه که نام دیگر آن اوچترلونی می باشد روشی است نیمه کمّی که در محیط نیمه جامد انجام می شود و مبنای آن حرکت آنتی ژن و آنتی ادی اختصاصی به طرف هم و ایجاد رسوبی ثابت و بدون حرکت ناشی از تشکیل کمپلکس آنتی ژن و آنتی بادی در بستر ژلی است . به رسوب تشکیل شده خط یا باند رسوبی می گویند(شکل ۲-۱۱).با این روش می توان اپی توپ آنتی ژن های نامعلوم را با یکدیگر مقایسه کرد، بدین معنی که اگر دو آنتی ژن مصرفی از نظر اپی توپ ها با هم مشابه ویا نیمه مشابه و یا غیر مشابه باشند شکل خطوط رسوبی آن ها با هم متفاوت خواهد بود.

روش کار

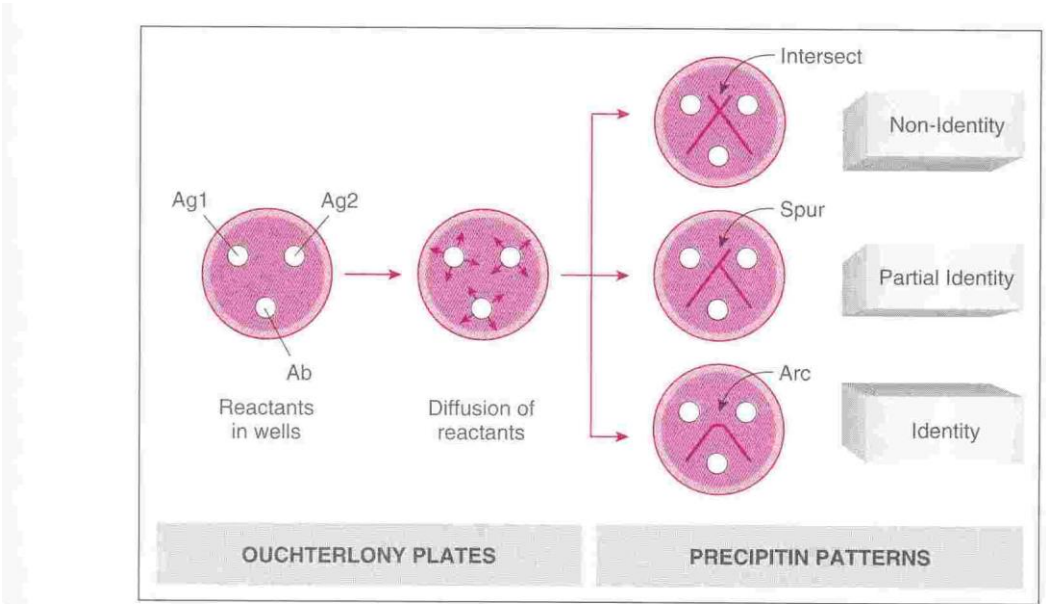
در این روش در حفرات تعبیه شده در ژل مقدار معینی آنتی سرم و آنتی ژن نامعلوم ریخته می شود .بهتر است آنتی ژن در حفرات کناری و آنتی سرم در حفره مرکزی ریخته شود .در طول مدت انکوباسیون که می تواند ۲۴ تا ۴۸ ساعت باشد آنتی ژن ها و آنتی بادی ها در داخل ژل نفوذ کرده و در محل برخورد آن ها رسوب سفید رنگ دیده می شود

ارزیابی نتایج

اگر آنتی بادی با آنتی ژن هایی که اپی توپ مشترک ندارند واکنش دهد، دو خط رسوبی تشکیل شده نسبت به هم به شکل علامت ضربدر دیده می شوندکه این حالت بیانگر مشابه نبودن این دو آنتی ژن نسبت به آنتی بادی مورد آزمایش است (عدم تشابه) (شکل بالا).

اگر مثلاً Ag1 یا Ag_2 در یک اپی توپ عمومی با هم مشترک باشند و آنتی بادی مورد آزمایش نیز با این اپی توپ واکنش دهد، دو خط رسوبی تشکیل شده اصطلاحاً به حالت مهمیز دیده می شوند. این شکل ازرسوب،صرفاً بیانگرواکنش متقاطع و وجود ارتباط سرولوژیک بین دو آنتی ژن مورد اشاره نسبت به آنتی بادی وسط است و نه یکسان بودن این آنتی ژن ها (تشابه نسبی)(شکل وسط).

اگرآنتی بادی مورد آزمایش با Ag_1 و Ag_2 واکنش داده باشد. فقط در فاصله ی بین حفره وسط و این حفره ها دو خط رسوبی با انتهای به هم پیوسته، ظاهر می شود. این شکل از رسوب بیانگر حضور شاخص های آنتی ژنی شبیه هم، در این دو آنتی ژن است (تشابه کامل آنتی ژنی) (شکل پایین).



روش **Radial immunodiffusion(RID)**

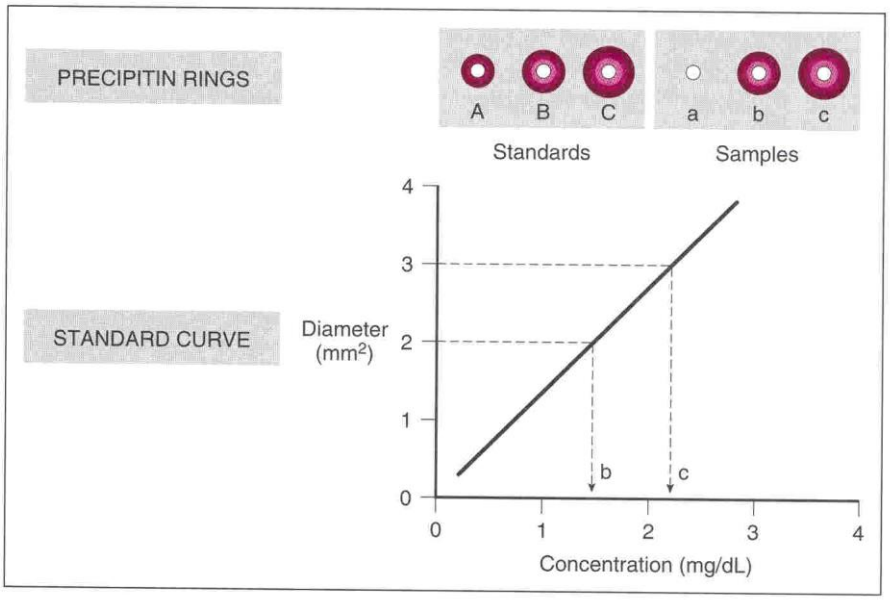
رادیال ایمونودیفوزیون مشابه روش ایمونودیفوزیون دوگانه است یعنی مبنای آن واکنش آنتی ژن و آنتی بادی در داخل ژل است با این تفاوت که از قبل در داخل ژل آنتی سرم اختصاصی ریخته می شود و موقع انجام آزمایش آنتی ژن را در داخل حفراتی می ریزند که درژل تعبیه شده است ، با نفوذ آنتی ژن در داخل ژل، غلظت آنتی ژن به آنتی بادی به تدریج تغییر کرده و به حدی می رسد که نقطه اکی والان نام دارد .

در منطقه اکی والان رسوب به شکل حلقه ای سفید رنگ دیده می شود.لازم به یاآوری است، مجذور قطر حلقه رسوبی نسبت مستقیم با غلظت آنتی ژن مورد آزمایش دارد(شکل ذیل) بدین سبب این روش کمّی است و با آن می توان غلظت پروتیین هایی نظیر IgG, IgA, IgG, و نیز پروتیین هایی نظیرC4 ,C3 و فاکتورB را اندازه گیری کرد .

روش کار

برای اندازه گیری اجزای فوق، مقدار معینی از نمونه سرمی فرد بیمار را ، به همراه پروتیین استاندارد در داخل حفرات معین، در داخل ژل، می ریزند. لازم به یادآوری است از قبل در داخل ژل آنتی سرم اختصاصی مونواسپسیفیک ریخته می شود . مثلا اگر قرار باشد IgG فرد یا بیمار اندازه گیری شود، ژل حاوی anti IgG و اگر قرار باشد C3 فرد یا بیمار اندازه گیری شود ژل حاوی antiC3خواهد بود.

در زمان انکوباسیون، با نفوذ نمونه مجهول (نمونه بیمار)و استاندارد (نمونه های کنترل) از حفرات به داخل ژل، در محل برخورد با آنتی سرم اختصاصی، کمپلکس ها در منطقه اکی والان، به شکل حلقه سفید رنگ دیده می شوند. قطر حلقه های رسوبی مربوط به نمونه مجهول و نمونه استاندارد را می توان با خط کش و بر حسب میلی متر اندازه گیری کرد. با داشتن قطر حلقه های رسوبی مربوط به نمونه استاندارد و با داشتن غلظت هر یک از آن ها می توان منحنی استاندارد رسم کرد(شکل) سپس از روی آن ها، غلظت آنتی ژن مورد نظر را اندازه گیری نمود.



کاربرد بالینی شامل اندازه گیری ایمونوگلوبولین ها، C3,C4, C5 هنگام عفونت است.

گر چه مبنای روش رادیال ایمونودیفوزیون، اندازه گیری آنتی ژن ها به طور کمّی است، ولی می توان با بـر عکـس کـردن روش اجـرا، آنتی بادی ها را نیز اندازه گیری کرد . بدین منظور در داخل ژل به جای آنتی بادی، آنتی ژن ریخته می شود.

روش های الکتروفورزی

از زمانی که معلوم شد روش های ایمونودیفوزیون ساده یا روش پرسی پیتاسیون به تنهایی قادر نیستند مخلـوط هـای بسـیار پیچیـده پروتئینی را از هم تفکیک کنند ، روش الکتروفورز وارد عرصه آزمایشگاه بالینی شد، بدین معنی که با به کارگیری ولتاژ در بستری کـه از جنس کاغذ یا آگارز یا ورقه های استات سلولز است، امکان تفکیک مخلوط های پیچیده پروتئنی فراهم گردید.

همانطور که می دانیم در اصل، حرکت ملکول ها در میدان الکتریکی به شارژ سطحی هر یک وابسته است، در واقع pH محیط، نقـش مهمی در تعیین بار الکتریکی آن ملکول ها دارد(شکل۵-۱۱). در پی یونیزه شدن ملکول های پروتیینی، آن ها بر حسـب ایـن کـه بـار سطحی مثبت یا منفی داشته باشند به طرف قطب منفی یا مثبت به حرکت در می آیند. این گونه تفکیک شدن های مخلـوط پیچیـده پروتیینی، مبنایی برابداع و گسترش روش های ایمونولوژیکی گردید .روش های مـذکور در زمینـه ملکـول هـای تفکیـک شـده، بـرای شاخص بندی مناسب، به قدرت تجزیه و تحلیل بالا نیاز دارند.از این رو روش الکتروفورز پروتیین، برای تفکیک مخلوطی از ملکـول هـا، به ایمونوالکتروفورز تعمیم پیدا کرد.

الکتروفورز

در روش مذکور، پروتیین های سرم در بستر انتخابی به شکل ۵ باند به نام های: آلبومین، آلفا یک، آلفا دو، بتـا، و گامـا ،کـه نمـایی از وضعیت حرکتی آن ها است، دیده میشوند(شکل ۵-۱۱) . در میدان الکتریکی ایجاد شده در بستر ، علاوه بر بار الکتریکی سطح ملکول های پروتیینی ، عواملی دیگری نظیراندازه، خصوصیات بستر و بافر(pH) مصرفی و دما بر حرکت ملکول های پروتیینی اثر می گذارند.

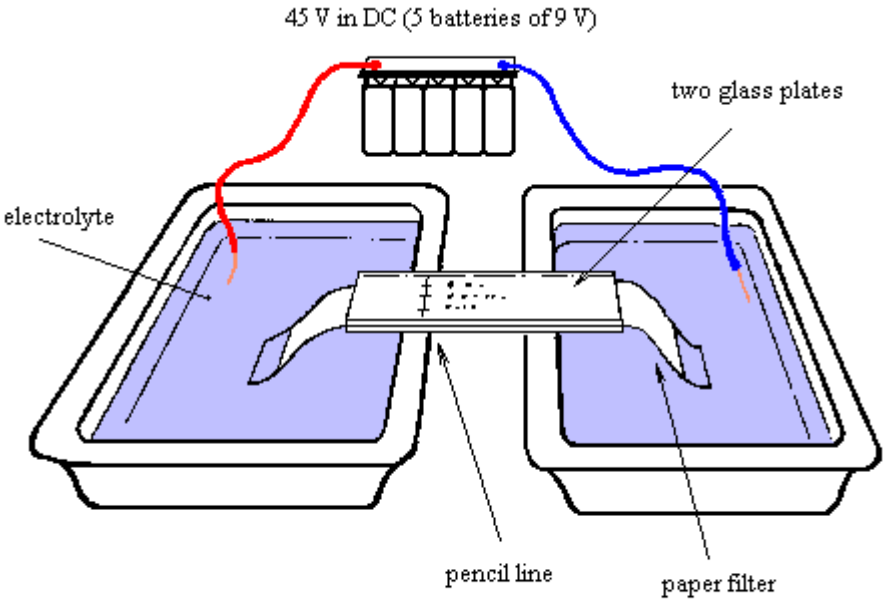


Figure 21 - Apparatus for paper electrophoresis.

پس از رنگ آمیزی باندهای پروتیینی سرم، هر از یک آن ها را می توان با استفاده از دانسیتومتر بـه شـکل منحنـی هـایی دارای قلـه مشخص نشان داد(شکل ۵-۱۱). بدین وسیله می توان مقدار یا درصد هر یک از این بخش ها را مشخص کرد. هر چه شدت رنگ بانـد بیشتر باشد ارتفاع قله بیشتراست که این خود بیانگر غلظت بالای آن باند خواهد بود.

روش کار

معمولا برای شروع کار سرم، ادرار، یا مایع مغزی نخاعی فرد و نیز یک نمونه استاندار مناسب را در یک طرف سطح بستر(استات سلولز یا ژل آگارز) قرار می دهند ، سپس برای تفکیک ملکول های پروتیینی، جریان الکتریکی را برقـرار مـی کننـد. در ایـن روش بـه دلیـل قلیایی بودن pH بافر مصرفی، پروتیین های سرم بار منفی پیدا کرده و در میدان الکتریکی ایجاد شده به طرف قطب مثبت حرکت می کنند و به باندهای مجزایی تبدیل می شوند.. پس از رنگ آمیزی، با مطالعه باند ها ومحل استقرار هر یک، می توان به خصوصـیات یـک یک آن ها پی برد. ضمناً می توان با استفاده از دانسیتومتر، باند های رنگ شده را اسکن و به منحنـی هـای دارای قلـه(یعنی آلبـومین، آلفا-یک گلوبولین، آلفا-دو گلوبولین، بتا-گلوبولین،و گاما-گلوبولین) تبدیل کرد(شکل).

ارزیابی نتایج

برای تفسیر نتایج مربوط به الکتروفورز پروتیین های سرم بیمار، باندهایی را که پس از تفکیک پروتیین تشکیل شده اند ونیز اندازه قلـه مربوط به آن را ، البته پس از اسکن کردن به وسیله دانسیتومتر، مد نظر قرار می دهند.

در واقع بدین وسیله پروتیین های سرم بیمار و سرم کنترل، که به وسیله الکتروفورز در ژل یا کاغذ استات سلولز از هم تفکیـک شـده اند ، اندازه گیری می شوند. البته معیار اندازگیری هر بخش پروتیینی را می توان بر حسب گرم در دسی لیتر (g/dL) یا بر حسـب در صد غلظت تام پروتیین سرم نشان داد.بدین سبب غلظت تام پروتیین سرم و کنترل برای این گونه محاسبات ضروری است.

لازم به یادآوری است، نمونه کنترل، سرمی است که تمام اجـزای آن در طیـف طبیعـی هسـتند.غیر طبیعـی بـودن نتـایج الکتروفـورز پروتیین سرم، ملاک ارزشمندی برای تشخیص مونوکلونال و پلی کلونال گاموپاتی است. در این میان بیشترین حالت های غیـر طبیعـی

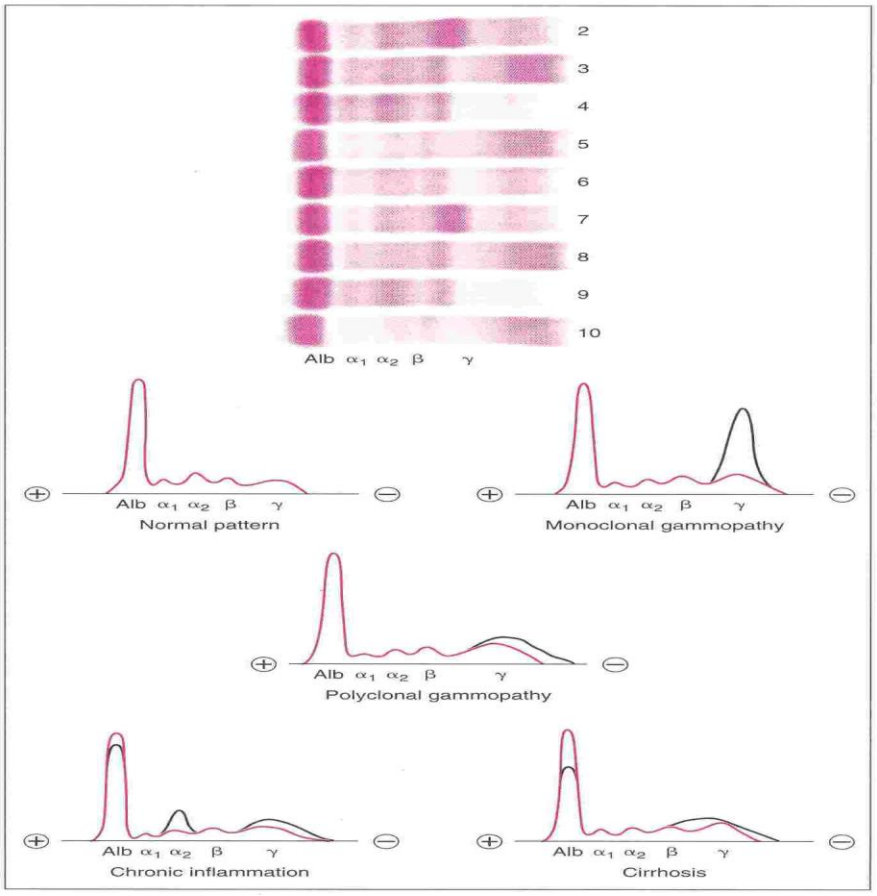
پروتیینی در پلی کلونال گاموپاتی دیده می شود.

مونوکلونال گاموپاتی

اگر درمنحنی مربوط به منطقه گاما یک قله بلند و با عرض کم مشاهده شود، بیانگر حضور پاراپروتیین مونوکلونال(شکل ۵-۱۱)است. البته در مواقعی می توان دید که باند مذکور از منطقه بتا تا منطقه گاما کشیده شده است. همانطور که قبلا اشاره شد،تکثیر غیر قابل کنترل یک کلون از لمفوسیت های B و تبدیل آن به پلاسماسل های تولید کننده آنتی بادی، عامل تولید اجزای مونوکلونال ذکر شده می گردد. گر چه هنوز به طور دقیق معلوم نیست عامل تحریک کننده چه باشد ولی بعید به نظر می رسد عامل آنتی ژنیک در این مسئله دخالت داشته باشد. در ماکروگلوبولینمیای والدنشتروم افزایش قابل توجهی در IgM دیده می شود.

پلی کلونال گاموپاتی ها

پس از اانجام الکتروفورز پروتیین های سرم و رنگ آمیزی ، اگر نمونه مشکوک به پلی کلونال گاموپاتی باشد، در منطقه گاما، باندی وسیع و پررنگ دیده می شود. این باند بیانگر افزایش پلی کلونال ایمونوگلوبولین ها است. ایمونوگلوبولین های سرم پلی کلونال،به وسیله انواع مختلفی از پلاسما سل ها تولید و به صورت افزایش قابل توجه در کلاس های مختلف ایمونوگلوبولین ها مشاهده می شود این حالت بیشتر درپی عفونت و در پاسخ به تحریک آنتی ژنی اتفاق می افتد. بنابر این می توان گفت: انعکاس یک حالت غیر طبیعی عمومی ، یک افزایش پلی کلونال پروتیینی است که شاید با شرایطی نظیر عفونت های مزمن، التهاب، یا بیماری های مزمن کبد، همراه شده باشد.



ایمونوالکتروفورز

اگر در الکتروفورز پروتیین های سرم ، به عنوان نمونه، آنتی بادی مونوکلونال مشاهده شد برای تایید آن بهتر است روش ایمونوالکتروفورز گذاشته شود . به عبارتی دیگر اگر در الکتروفورز پروتیین های سرم پس از رنگ آمیزی در منطقه گاما یا از منطقه بتا تا گاما باندی پررنگ مشاهده شد ، از آنتی بادی های ضد زنجیره سنگین و ضد زنجیره سبک، برای تعیین خصوصیات پروتیین های مونوکلونال استفاده می شود.(شکل۵-۱۱). بدین وسیله معلوم می شود افزایش مشاهده شده مربوط به چه کلاس آنتی بادی است.

روش ایمونوالکتروفورز طی دو مرحله ذیل، به نام های الکتروفورز و ایمونودیفوزیون انجام می شود:

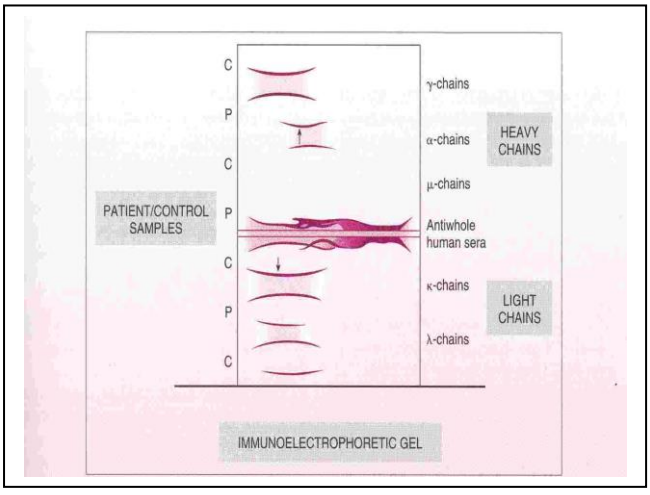
-الکتروفورز برای تفکیک پروتیین های سرم از هم.

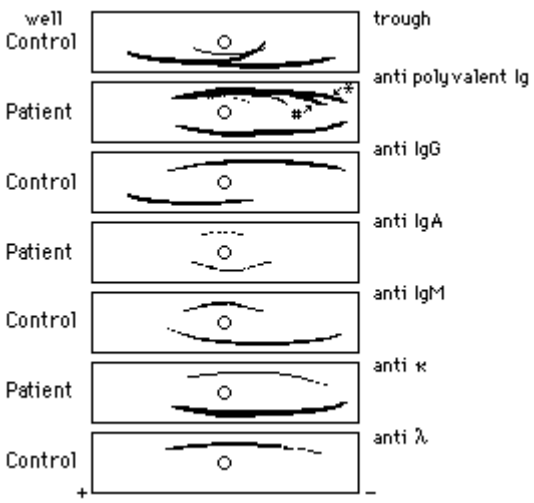
- ایمونودیفوزیون /پرسیپیتاسیون مرحله ای است که در طی آن پروتیین های تفکیک شده و آنتی بادی اختصاصی ضد این پروتیین ها طی انشار در داخل ژل به یکدیگر برخورد کرده و پس از تشکیل کمپلکس آنتی ژن- آنتی بادی به شکل رسوبی سفید رنگ قابل رویت می شوند.به آنتی بادی های ذکر شده آنتی سرم می گویند.

روش کار

در ابتدا نمونه های سرم یا ادرار و نیز یک نمونه استاندارد(طبیعی) را در حفراتی که در ژل تعبیه شده و مربوط به آنتی ژن است می ریزند و پس از آن فرصت می دهند تا آن ها طی الکتروفورز از هم تفکیک شوند. سپس آنتی سرم را در شیار تعبیه شده در داخل ژل می ریزند. آنتی سرم ها همان آنتی بادی های اختصاصی هستند و معمولا ضد زنجیره سنگین و از نوع آنتی آلفا، آنتی گاما، آنتی مو ونیز ضد زنجیره سبک کاپا و لامبدا می باشند.

پس از نفوذ آنتی ژن و آنتی بادی در داخل ژل و برخورد آن ها به هم قوس رسوبی تشکیل می شود.(شکل ۷-۱۱).





در ادامه برای حذف پروتیین های اتصال نیافته، ژل را شستشو می دهند و برای ارزیابی، کمپلکس های رسوبی را رنگ آمیزی می کنند. در مرحله نهایی نیز رسوب مربوط به نمونه را با نمونه طبیعی مقایسه میکنند.

اگر در مقایسه با نمونه طبیعی ، قوس رسوبی مربوط به بیمار افزایش قابل ملاحظه ای نشان دهد می تواند موید تولید غیر طبیعی آنتی ژن باشد. ضمنا عدم حضور رسوب می تواند بیانگر نقص ایمنی باشد.

واکنش های آگلوتیناسیون

اگر آنتی ژن بصورت غیر محلول (Insoluble) و یا ذره ای (Particle) باشد واکنش را آگلوتیناسیون می نامند. آنتی ژن را در این دسته واکنشهای سرولوژی آگلوتینوژن (Agglutinogen) و آنتی بادی را آگلوتینین (Agglutinin) می گویند. برتری واکنشهای آگلوتیناسیون بر سایر روشهای سرولوژی یکی درشت بودن کمپلکس آنتی بادی و آنتی ژن است که با چشم غیر مسلح (Naked eyes) بخوبی قابل رؤیت می باشد و دیگری مدت زمان بسیار کوتاه آزمایش است که به نتیجه می رسد.

واکنشهای آگلوتیناسیون را بر اساس ماهیت شاخص های آنتی ژنی در مولکولهای آنتی ژن ، به سه دسته می توان تقسیم نمود :

الف- آگلوتیناسیون فعال (Active) یا مستقیم (Direct)

ب- آگلوتیناسیون غیر مستقیم (Indirect)

ج- آگلوتیناسیون غیر فعال (Passive)

د- آگلوتیناسیون غیر فعال معکوس (Reversed passive)

الف- آگلوتیناسیون فعال یا مستقیم : در این دسته واکنشهای آگلوتیناسیون ، شاخصهای آنتی ژنی (Antigenic determinants) آنتی ژن ، جزء ساختمانی (Intrinsic) خود آنتی ژن غیر محلول می باشند. مانند آزمایشهای رایت (Wright) و ویدال (Widal) که در این آزمایشها از میکروب کشته شده بروسلا (Brucella) و سالمونلا (Salmonella) به ترتیب برای تشخیص بیماری تب مالت و حصبه استفاده می شود.

ب- آگلوتیناسیون غیر مستقیم : گاهی بعلت وجود آنتی بادی ناقص (Incomplete) یا مسدود کننده (Blocking antibody) ، فقط یک ظرفیت آنتی بادی به آنتی ژن غیر محلول متصل می شود که در نتیجه شبکه بین آنتی ژن و آنتی بادی تشکیل نشده و آگلوتیناسیون دیده نمی شود. در چنین مواردی برای ظهور آگلوتیناسیون از آنتی گاماگلبولین انسانی استفاده می شود مانند آزمایش کومبز – رایت (Coombs – Wright test). به این روش آگلوتیناسیون غیر مستقیم می گویند. آنتی گاماگلبولین انسانی قادر است ایمونوگلبولین های انسانی را که به آنتی ژنهای غیر محلول متصل هستند به یکدیگر وصل کند و ایجاد آگلوتیناسیون نماید.

ج- آگلوتیناسیون غیر فعال : اگر آنتی ژن محلول را بخواهیم به روش آگلوتیناسیون شناسائی نمائیم باید به روش آگلوتیناسیون پاسیو عمل کنیم. برای این منظور آنتی ژن محلول را به ذرات غیر محلول (Particle) متصل می کنند. بدین ترتیب ، شاخص های آنتی ژنی در این دسته واکنشهای آگلوتیناسیون ، خارجی (Extrinsic) و جزء ساختمانی ذرات غیر محلول نمی باشد. بیشترین ذرات غیر محلولی که برای این منظور در آزمایشهای سرولوژی بالینی و تحقیقاتی مورد استفاده قرار می گیرند بترتیب شامل ذرات لاتکس (Polystyrene latex) که از جنس ذرات بسیار ریز پلاستیک است و گلبولهای قرمز گوسفند و سایر حیوانات می باشند. ذرات غیر محلول دیگری که بندرت استفاده می شوند شامل زغال چوب (Charcoal) و خاک چینی یا کائو لین (Kaolin) می باشند.

از نمونه آزمایشهائی که آنتی ژن محلول را بصورت غیر محلول بکار می برند آزمایش RA-Latex برای تشخیص فاکتور روماتوئید در سرم و آزمایش تشخیص حاملگی بر اساس وجود هورمون (Gonadotropin Human Choronic) یا HCG در ادرار است. در این آزمایشها بترتیب ایمونوگلبولینIgG و هورمون hCG انسان را که محلول هستند به ذرات غیر محلول لاتکس متصل کرده اند.

د- آگلوتیناسیون غیر فعال معکوس : روش دیگری که بوسیله آن می توانیم آنتی ژن های محلول را شناسایی نمائیم روش آگلوتیناسیون غیر فعال معکوس است. در این روش بجای آنتی ژن ، آنتی بادی را بر روی ذرات غیر محلول مثل لاتکس قرار می دهیم و سپس آنها را در مجاورت آنتی ژن محلول قرار می دهیم.

آزمایش ممانعت (وقفه) از آگلوتیناسیون

(Agglutination Inhibition test)

این آزمایش بر اساس رقابت یک آنتی ژن به دو صورت محلول و غیر محلول (مثلاً آنتی ژنH) در مقابل یک آنتی بادی اختصاصی معلوم (anti-H) می باشد. در مرحله اول آزمایش ، آنتی ژن محلول مجهول را با مقدار معینی آنتی بادی معلوم (anti-H) مخلوط می کنند و در مرحله دوم آزمایش ، آنتی ژن غیر محلول معلوم (H) را به مخلوط قبلی اضافه می کنند. حال چنانچه آنتی ژن محلول مجهول واقعاً آنتی ژن (H) باشد به آنتی بادی معلوم ضد آن (anti-H) در مرحله اول متصل شده و در مرحله دوم آزمایش که آنتی ژن غیر محلول معلوم(H) را اضافه نمودیم ، دیگر آنتی بادی anti-H موجود نمی باشد و در نتیجه آگلوتیناسیون دیده نمی شود. بنابراین با این روش آنتی ژن محلول مجهول مشخص می شود. برعکس چنانکه آگلوتیناسیون مشاهده شود نشان می دهد که آنتی ژن محلول مجهول آنتی ژن مورد نظر یعنی (H) نیست. این روش آزمایش برای تشخیص بعضی آنتی ژنهای محلول بسیار مناسب است. بطور مثال برای جستجوی هورمون HCG در ادرار برای تشخیص حاملگی از این روش استفاده می شود.

سیستم گروه خونی ABO

سیستم گروه خونی ABO از چهار فنوتیپ اصلی A , B , AB وO تشکیل شده است. افراد گروه خونی A دارای آنتی ژن یا ایزوآگلوتینوژن A ، افراد گروه خونی B دارای ایزوآگلوتینوژن B و افراد گروه خونیAB دارای ایزوآگلوتینوژنهایA و B در سطح سلول هایشان می باشند. افراد گروه خونی O هیچکدام از ایزوآگلوتینوژنهای فوق را در سطح غشای سلول های خود ندارند.

سیستم گروه خونی ABO دارای دو ویژگی منحصر به فرد می باشد:

۱- وجود آنتی بادی طبیعی بر ضد آنتی ژنهای A و B در سرم افرادی است که فاقد هر کدام از این آنتی ژنها می باشند.

۲- وجود آنتی ژنهای ABO در سطح تمام سلول های بدن و همچنین در مایعات بدن.

زیر گروههای خونی سیستم ABO:

گروه خونی A به سه گروه اصلی A1 ، A2 ، A3 و چندین زیر گروه فرعی دیگر تقسیم می شود. حدود ۸۰-۷۵ درصد افراد گروه A از زیر گروه A1 ، حدود ۲۵-۲۰ درصد زیر گروه A2 و از هر یکهزار نفر یک نفر زیر گروه A3 می باشند. زیر گروههای فرعی بسیار نادر شامل Ax و Am نیز گزارش شده اند. زیر گروههای فرعی B بنام B3 ، Bm و Bx و همچنین زیر گروه فرعی O بنام Oh نیز وجود دارند که البته بسیار نادرند. افرادی که دارای گروههای خون فرعی سیستم ABO می باشند بخشی از ساختمان آنتی ژنی آن گروه خونی را ندارند. بنابراین هنگام انتقال خون باید از خون مانند خودشان استفاده کرد. در غیر اینصورت علیه خون تزریق شده حساس شده و در انتقال خون بعدی واکنش خطرناک نشان می دهند.

سیستم ژنتیکی و ساختمان شیمیایی آنتی ژنهای گروه ABO

سیستم گروه خونی ABO حداقل توسط سه دسته ژن کنترل می شوند که عبارتند از:

1- H/h 2- $I^A/I^B/i$ 3- Se/se

هر کدام از این سه دسته ژن بصورت آللیک (Allelic) و مستقل از یکدیگر عمل می کنند و دارای جایگاه ژنی (Locus) معین هستند. جایگاه دسته ژن $I^A/I^B/i$ روی کروموزوم ۹ می باشد در حالیکه ژن H/h و ژن Se/se روی کروموزوم ۱۹ واقع شده اند.

ژن H در برابر ژن h غالب است. تقریباً تمام افراد دارای ژن H می باشند. این ژن سنتز آنزیم فوکوزیل ترانسفراز (Focosyl transferase) را تحت کنترل دارد.

ژنهای I^A/I^B هم غالب (Codomination) و در مقابل ژن i غالب هستند. بعبارت دیگر هر کدام از این ژنها در افراد هتروزیگوت می توانند خود را بروز دهند ($I^A = I^B > i$) درحالیکه ژن i بی شکل (Amorphic) است و در مقابل ژنهای I^B و I^A مغلوب می باشد. افرد گروه خونی O بطور هموزیگوت دارای ژن ii هستند و این افراد فقط ژن "H" را بیان می کنند. در جدول زیر ژنوتیپ ها و فنوتیپ های سیستم گروه خونی ABO را مشاهده می کنید.

ژن A سنتز آنزیم آلفا – ان – استیل – گالاکتوزامینیل ترانسفراز (α- N- acetyl –galactosaminyl transferas) و ژنB سنتز آنزیم آلفا- گالاکتوزیل ترانسفراز (α-galactosyl transferase) را تحت کنترل دارد.

ژنوتیپ و فنوتیپ سیستم گروه خونی

Blood group (Phenotype)	Genotype
A	H I^A I^A or I^A i
B	H I^B I^B or I^B i
AB	H I^A I^B
O	H i i

ژن "Se" یا ژن ترشحی (Sectory gene) در برابر ژن"se" غالب است. ژن ترشحی (Se) و ژن "H" روی کروموزوم شماره ۱۹ قرار دارند. حدود ۸۰ درصد افراد جامعه دارای ژن ترشحی بصورت هموزیگوت (Se/Se) یا هتروزیگوت (Se/se) می باشند. آمار ایران نشان می دهد که درصد افراد ترشحی نسبت به سایر کشورها بیشتر است. این افراد قادرند که آنتی ژنهای گروه خونی A , B و H خود را بصورت مولکولهای محلول هاپتنی در مایعات مختلف بدن از جمله بزاق ، خلط ، عرق ، اشک ، شیر مادر ، پلاسما ، مایع منی ، شیره معده ، صفرا ، مایع آمینوتیک و غیره ترشح کنند. حدود ۲۰ درصد افراد جامعه بصورت هموزیگوت دارای ژن مغلوب ترشحی (se/se) هستند و در نتیجه غیر ترشحی(Non – secretor) محسوب می شوند. یکی از کاربردهای شناسایی مولکولهای محلول A ، B و H در پزشکی قانونی، پیدا کردن گروه خونی مجرمین از روی آثار باقیمانده مثلاً بزاق دهان بر روی کاغذ سیگار مجرم در محل حادثه و یا از مایع منی به جای مانده در موارد تجاوز به عنف می باشد.

در واقع ژنهای گروه خونی بطور غیر مستقیم از طریق تولید آنزیمها، شکل گیری آنتی ژنهای گروه خونی را تحت کنترل دارند .

آنتی ژنهای ABO از یک رشته اولیگوساکارید تشکیل شده است که از طریق اسفینگولیپیدها (Sphingolipids) به پروتئین های غشاء سلول های بدن متصل شده اند. پیش نیاز و یا پایه ساختمانی آنتی ژنهای ABO اولیگوساکاریدی بنام ماده H (H-Substance) می باشد. ماده H از خارج به داخل از یک مولکول قند ال- فوکوز (L-fucose) ، دو مولکو قند دی- گالاکتوز-D (galactose) ، یک مولکول قند ان- استیل – دی - گلوکوز آمین و یک مولکول قند ان – استیل – دی گالاکتوز آمین تشکیل شده است. آنزیم فوکوزیل ترانسفراز (Fucosyltransferase) ، قند ال- فوکوز را به دی – گالاکتوز انتهایی رشته قندی وصل می کند تا ماده H تشکیل شود.

افرادی که فاقد ژنهای I^B و I^A هستند و فقط ژن H را دارند گروه خونی O نامیده می شوند. افراد گروه خونی A علاوه بر ژن H دارای ژنI^A هستند که توسط آنزیم ترانسفراز A ، قند ان – استیل – دی گالاکتوز آمین را به دی گالاکتوز انتهایی ماده H متصل می کند. افراد گروه خونی B علاوه بر ژن H ، دارای ژنI^B هستند که توسط آنزیم ترانسفراز B ، قند دی گالاکتوز را به دی گالاکتوز انتهایی ماده H وصل می کند. افرادی که گروه خونی AB دارند هر دو ژن I^B و I^A و آنتی ژنهای مربوطه را دارند.

افرادی که بطور هموزیگوت دارای ژن hh هستند قادر به ساختن ماده H نمی باشند و فنوتیپ O بمبئی (Bombay blood) یا Oh نامیده می شوند . این افراد بسیار نادرند .افرادی که فنوتیپ Oh دارند ممکن است دارای ژنوتیپI^A و یا I^B باشند. این افراد در صورت ازدواج با فردی که گروه خونی O دارند ، می تواند فرزندی با گروه خونی A و یا B داشته باشند. این فرزند ژن H را بطور مثال از مادر با گروه خونی O و ژنI^A یا I^B را از پدر ، با فنوتیپ Oh دریافت می کند.

آلو آنتی بادیها یا ایزو آگلوتینین های سیستم گروه خونیABO

(ABO Alloantibodies or Isoagglutinins)

ساختمان مولکولی آنتی ژنهای سیستم گروه خونی ABO از جنس اولیگوساکارید است و مشابه این قندها در طبیعت فراوان می باشند. بعنوان نمونه کپسول میکروب استرپتوکوک پنمونیا (S.pneumoniae) ساختمانی شبیه ماده H دارد ولی فاقد قند ال-فوکوز است. بعلاوه بسیاری از گیاهان خصوصاً سبزیجات و گلبول قرمز حیوانات دارای قندهائی شبیه آنتی ژنهای ABO هستند .

تمام افراد نسبت به آنتی زنهای قندی گروه خونی خودشان واکنشی نشان نمی دهند و نسبت به آن تحمل دارند ولی می توانند بر ضد آنتی ژن گروه خونی ای که فاقد آن هستند، بطور طبیعی تولید آنتی بادی نمایند. آلو آنتی بادی (Alloantibody) ضد آنتی ژنهای A , B و H را اصطلاحاً آیزوآگلوتینین نیز می نامند. نوزادان در بدو تولد فاقد این آیزوآگلوتینین ها هستند ولی بتدریج با افزایش سن و با تماس با آنتی ژنهای A و B که در سطح سلول های گیاهی و باکتری ها وجود دارند این آنتی بادیها را از سن حدود ۳ ماهگی شروع به سنتز می کنند و معمولاً این آنتی بادی ها تا سن ۶ ماهگی طول می کشد تا ساخته شوند .

دارندگان گروه خونی AB فاقد آیزوآگلوتینین های A و B هستند.

دارندگان گروه خونی A فاقد آیزوآگلوتینین A (Anti-A) هستند ولی دارای Anti-B می باشند.

دارندگان گروه خونی B فاقد آیزوآگلوتینین های B (Anti- B) هستند ولی دارای Anti-A می باشند.

افراد گروه خونیO دارای Anti-A و Anti - B می باشند .

افراد گروه خون بمبئی دارای تمام آیزوآگلوتینینهای A , B و H می باشند و فقط خون بمبئی را می توان به آنها تزریق کرد .

آلو آنتی بادیهای طبیعی (آیزو آگلوتینیهایA و B) در سرم افراد دارای گروه های خونی B وA بطور طبیعی از کلاس IgM می باشند ولی در سرم دارندگان گروه خون O بیشتر از کلاس IgM و مقداری نیزIgG است. در مایعات بدن نیز ممکن است بطور طبیعی IgA ترشحی (SIgA) ضد آنتی ژنهای A وB دیده شود .

افرادی که دارای گروه خونی A هستند می توانند گلبول های قرمز که دارای گروه خونی A و یا O هستند را دریافت کنند.

افرادی که دارای گروه خونی B هستند می توانند گلبول های قرمز که دارای گروه خونی B و یا O هستند را دریافت کنند.

افرادی که دارای گروه خونی AB هستند می توانند گلبول های قرمز که دارای گروه خونی AB و یا O هستند را دریافت کنند.

افرادی که دارای گروه خونی O هستند می توانند گلبول های قرمز که دارای گروه خونی O هستند را دریافت کنند.

بنابراین گروه خونی O دهنده همگانی است و گروه خونی AB گیرنده همگانی است.

* اگر به فردی که گروه خونی A دارد به عنوان مثال گلبول قرمز B تزریق شود، آنتی بادی های ضد B که در بدن فرد گیرنده وجود دارد به گلبول های قرمز متصل شده، سیستم کمپلمان فعال می شود و گلبول های قرمز لایز می شوند که بسیار خطرناک است.

سیستم گروه خونیRh

بر اساس تئوری فیشر – رایس ، ژنهایی که سیستم Rh را تحت کنترل دارند در سه جایگاه ژنی یا لوکوس کاملاً بهم چسبیده قرار گرفته اند و بصورت یک واحد در توارث عمل می کنند. در هر یک از این سه جایگاه ژنی ، یک جفت الل یا ژن وجود دارد که رویهم پنج فاکتور اصلی خون را در سیستم Rh تحت کنترل دارند. سه جفت اللهای متقابل این مناطق را بترتیب بصورت (D، d) و (c

C،) و (E ، e) نمایش می دهند .ژن"D" در مقابل"d" همیشه غالب است و بصورت آنتی ژن"D" بر روی گلبولهای قرمز بروز می کند ، ولی ژن "d" هیچگونه تظاهرات آنتی ژنی قابل تشخیصی ندارد و بدون شکل می باشد. ژنهای "D","C","c", "E" و "e" هم غالب (Codominant) می باشند .

آنتی ژنهای سیستم Rh در طبیعت فقط بر روی گلبولهای قرمز انسان و بعضی گونه میمونها یافت می شوند بنابراین آنتی بادی ضد این آنتی ژنها بطور طبیعی مانند سیستم گروه خونی ABO وجود ندارد و فقط در سرم خون افرادی می توان این آنتی بادی ها را یافت که Rh منفی هستند و با این آنتی ژنها حساس شده اند. از بین تمام آنتی ژنهای سیستم گروه خونی Rh ، قویترین آنها RH (D) می باشد که می توان براحتی پس از تزریق به افراد Rh منفی که فاقد این آنتی ژن باشند سیستم ایمنی آنها را وادار به سنتزآنتی بادی بر ضد این آنتی ژن کرد. آنتی ژن(D) Rh عامل اصلی بوجود آورنده واکنشهای خطرناک انتقال خون و ناسازگاری بین مادر و جنین است. بطور قراردادی ، افرادی که دارای آنتی ژن D بر روی گلبولهای قرمز خود باشند بنام Rh مثبت نامیده می شوند. بنابراین واضح است که هرگز به افراد دارای گروه خونی Rh منفی نبایست خون Rh مثبت تزریق کرد زیرا ممکن است منجر به حساس شدن آنها گردیده و در تزریقات بعدی واکنش های خطرناک و گاهی کشنده بروز دهند. سایر آنتی ژنهای سیستم , E ,c ,C) Rh (e از نظر قدرت ایمنی زایی ضعیفتر از آنتی ژن D می باشند و به همین علت بطور روزمره در بانک های خون بررسی نمی شوند. یکی از انواع ضعیف آنتی ژن D بنام RhD^u می باشد که دارای اهمیت زیادی می باشد. افرادی که آنتی ژن"D^u" دارند ، بخشی از ساختمان آنتی ژنی"D" را بطور ژنتیکی ندارند بنابراین این افراد می توانند پس از دریافت خون Rh مثبت ، علیه آن تولید آنتی بادی نمایند .

در آزمایشگاه گلبولهای قرمز افرادی که دارای آنتی ژن D^u هستند ، به Anti-D متصل می شوند ولی بعلت تشکیل نشدن شبکه توری ، آگلوتی ناسیون ایجاد نمی گردد. لذا برای تشخیص آنتی ژن D^u ، باید از سرم کومبز (آنتی – گاماگلبولین انسانی) استفاده شود.

افرادی که Rh مثبت هستند می توانند گلبول های قرمز که Rh مثبت و یا Rh منفی هستند را دریافت کنند.

افرادی که Rh منفی هستند می توانند گلبول های قرمز که Rh منفی هستند را دریافت کنند.

افرادی که RhD^u هستند می توانند گلبول های قرمز که Rh منفی هستند را دریافت کنند.

افرادی که RhD^u هستند فقط از افراد Rh منفی می توانند خون بگیرند ولی برعکس فقط به افراد Rh مثبت خون می دهند .

بیماریهای همولیتیک نوزادان

(Hemolytic Diseases of the newborn)

شدیدترین شکل بیماری همولیتیکی نوزادان در نتیجه ناسازگاری سیستم Rh بین مادر و جنین صورت میگیرد. حدود ۵۰ تا ۷۵ درصد مادران Rh منفی و RhD^u پس از تولد نوزاد Rh مثبت یا RhD^u نسبت به آنتی ژن Rh حساس شده و تولید Anti-D می نمایند. این آنتی بادی به مقدار جزئی از کلاس IgM و Ig A و بیشتر از کلاس IgG می باشد که می تواند در حاملگی های بعدی از جفت عبور کرده و جنین Rh مثبت یا RhD^u را بعلت آنمی شدید از بین ببرد.

وخامت این بیماری بستگی به شدت واکنش ایمونولوژیکی مادر علیه آنتی ژن Rh نوزاد و مقدار خونی که در اولین حاملگی هنگام تولد از خون نوزاد وارد خون مادر شده است می باشد.

مادران Rh منفی یا RhD^u اگر قبل از اولین حاملگی خون ناسازگار Rh مثبت یا RhD^u دریافت نمایند ، حساس می شوند و اولین نوزادشان نیز مبتلا به بیماری همولیتیکی نوزادان میگردد.

آلو آنتی بادی Anti-RhD مادر اگر چه به گلبولهای قرمز جنین متصل و آنها را حساس می کند ولی به دلیل ناکافی بودن آن قادر به فعال کردن کمپلمان در جریان خون جنین نمی باشد. بنابراین گلبولهای قرمز حساس شده ، در خارج از سیستم عروقی (Extravascular) ، توسط سیستم رتیکولواندوتلیال و خصوصاً طحال جنین تخریب و همولیز می شوند .

پیشگیری از حساسیت نسبت به آنتی ژن Rho(D)

(Prophylaxis of Rho(D) Sensitization)

با کشف تاثیر ایمونوگلبولین ضد آنتی ژن Rho(D) انسانی (Human anti-Rho(D) immunoglobulin) در جلوگیری از بروز بیماری همولیتیکی نوزادان ، از مرگ و میر این بیماری بسیار کاسته شده است. این آنتی ایمونوگلبولین ها را معمولاً از مادران Rh منفی که نوزاد Rh مثبت به دنیا آورده و حساس شده اند و همچنین مردان و زنان Rh منفی داوطلب ، پس از تزریق گلبولهای قرمز Rh مثبت ، بدست می آورند. به این آنتی بادی ها رگام می گویند. تزریق این آنتی گاماگلبولین ها در صورتی مفید است که قبل از حساس شدن مادر علیه آنتی ژن Rh تزریق شوند، زیرا که اگر مادر حساس شد دیگر تزریق آنها فایده ای ندارد چراکه سلولهای لنفوسیت حافظه ای (خاطره ای) درست شده اند. تزریق رگام باعث می شود سیستم ایمنی فرد لنفوسیت B خاطره ای که قادر به تولید آنتی بادی ضد آنتی ژن D نسازد. بنابراین باید حدود ۲ ساعت تا حداکثر ۷۲ ساعت پس از وارد شدن گلبولهای قرمز Rh مثبت یا D^u به مادر Rh منفی ، گاما گلبولین ضد Rh (Rho(D) immunoglobulin) به مادر تزریق شود. اگر چه تمام افراد Rh منفی علیه آنتی ژن D حساس نمی شوند ولی نمی توان به احتمال حساس نشدن مادر به پیشواز خطر رفت و گاماگلبولین را تزریق نکرد .

اگر پدر و مادری هر دو Rh منفی باشند ، در اینصورت نوزاد آنها نیز Rh منفی خواهد بود و بعلاوه اگر مادر و نوزاد هر دو Rh منفی باشند ، نیازی به تزریق گاماگلبولین ضد Rh در این دو صورت نمی باشد .

کاربرد تزریق گاماگلبولین ضد Rh:

الف- مادر Rh منفی – نوزاد Rh مثبت

ب- مادر Rh منفی – نوزاد D^u

ج- مادر D^u – نوزاد Rh مثبت

د- مادر D^u – نوزاد D^u

تعیین گروههای خونی سیستم ABO

گروههای خونی سیستم ABO را به دو طریق می توان تعیین کرد :

الف- روش مستقیم (Cell type , Direct type) : در این روش بوسیله anti-B و anti-A ، آنتی ژن های گروه خونی فرد تعیین می شود .

ب- روش غیر مستقیم (Indirect) یا معکوس (Back type , Reverse type) : در این روش آنتی بادی موجـود در پلاسـما یـا سرم فرد را با گلبولهای قرمز که آنتی ژن مشخص دارند مواجه می کنند و به این ترتیب گروه خونی تعیین می شود .

از آنجائیکه تعیین گروه خون با مسئله مرگ و حیات در ارتباط است بنابراین برای اطمینان از درستی نتایج آزمایش تعیین گروه خونی یک فرد ، بهتر است از دو روش مستقیم و غیر مستقیم و همچنین توسط دو شخص جداگانه گروه خون یک نمونه خون تعیـین شـود. آزمایش مستقیم و غیر مستقیم تعیین گروه خون از دو روش روی لام و در لوله آزمایش انجام می شود.

آزمایش مستقیم تعیین گروه خون بر روی لام (Direct Slide test)

روش کار :

۱) دو قطره خون که از نوک انگشتان گرفته شده است و یا دو قطره خون که در ضد انعقاد اگزالاته (EDTA) گرفته شـده اسـت را در دوطرف یک لام تمیز قرار دهید .

۲) یک قطره از شیشه محتوی anti-A به رنگ آبی و یک قطره از شیشه محتوی anti-B به رنـگ زرد بـه دو قطـره خـون جداگانـه اضافه کنید.

۳) با یک سر اپلیکاتور ، قطره خون و anti-A و با سر دیگر آن anti-B و قطره خون دیگر را مخلوط و به اندازه دایـره ای بـه قطـر حدود ۲ سانتی متر پهن کنید .

۴) سپس لام را در دست گرفته و بالای یک کاغذ سفید مدت ۲ دقیقه بطور افقی حرکت دورانی دهید .

اگر در عرض دو دقیقه هنوز مخلوط دارای رنگ گلی باشد و گلبولهای قرمز نیز بطور یکنواخت پراکنده باشند ، نتیجه منفی اسـت و در صورت مشاهده آگلوتیناسیون جواب مثبت است.

تبصره ۱: همولیز گلبولهای قرمز دلالت بر واکنش مثبت آگلوتیناسیون نمی باشد (برخلاف روش غیر مستقیم)

تفسیر :

اگر گلبولهای قرمز مورد آزمایش فقط با anti-A آگلوتیناسیون بدهد ولی با anti-B آگلوتیناسیون ندهد ، پس خـون مجهـول ، گـروه A می باشد .

اگر گلبولهای مورد آزمایش فقط با anti-B آگلوتیناسیون داد ولی با anti-A آگلوتیناسیون نداد، پس خون مجهول از گروه B است .

اگر گلبولهای مورد آزمایش با anti-A و anti-B آگلوتیناسیون داد، خون مجهول از گروه AB می باشد .

اگر گلبولهای مورد آزمایش با هیچ یک از anti-A و anti-B آگلوتیناسیون نداد ، خون مجهول از گروه O می باشد .

آزمایش غیر مستقیم تعیین گروه خون به روش لوله :

روش کار :

۱) دو لوله آزمایش سرولوژی را با حروف A و B علامت گذاری نموده و در جا لوله ای قرار دهید .

۲) یک قطره از سرم یا پلاسمای مجهول را در ته لوله ها بریزید .

۳) یک قطره از سوسپانسیون گلبولهای قرمز A را به ته لوله A اضافه کنید .

۴) یک قطره از سوسپانسیون گلبولهای قرمز B را به ته لوله B بریزید .

۵) لوله ها را به آرامی تکان داده و به مدت ۳۰ ثانیه با دور g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ نمائید .

۶) لوله ها را از سانتریفیوژ خارج کرده و نتایج آگلوتیناسیون در لوله ها را بررسی و یادداشت نمائید .

تبصره ۱ : گاهی بعلت وجود کمپلمان در سرم مجهول ممکن است همولیز گلبولهای قرمز در لوله ها دیده شود. همولیز گلبولها نیز بعنوان واکنش مثبت محسوب می گردد. در مواردی که پلاسما حاوی ماده ضد انعقادی EDTA می باشد، همولیز دیده نمی شود زیرا فعال شدن پروتئینهای سیستم کمپلمان ، نیاز به ین کلسیم دارد و ماده EDTA با اتصال به کلسیم ، آنرا از محیط خارج می کند.

تفسیر :

اگر سرم مجهول با گلبولهای قرمز B آگلوتیناسیون دهد ولی با گلبولهای A ندهد ، گروه خون سرم مجهول متعلق به فردی با گروه A می باشد .

اگر سرم مجهول با گلبولهای قرمز A آگلوتیناسیون دهد ولی با گلبولهای قرمز B ندهد ، گروه خون سرم مجهول متعلق به فردی با گروهB است .

اگر سرم مجهول با گلبولهای قرمز A و B آگلوتیناسیون بدهد گروه خون سرم مجهول متعلق به فردی با گروه O می باشد.

اگر سرم مجهول با هیچیک از گلبولهای قرمز A و B آگلوتیناسیون ندهد گروه خون سرم مجهول متعلق به فردی با گروه AB می باشد .

آزمایش تعیین گروه Rh :

آگلوتیناسیون سیستم گروه خونی Rh درمقایسه با ABO به دو دلیل طولانی تر و مشکلتر است :

۱- آنتی بادی ضد آنتی ژنهای سیستم Rh از نوع گرم و کلاس IgG می باشد ولی ایزوآگلوتینینهای سیستم ABO از نوع سرد و کلاس IgM هستند . از آنجائیکه ساختمان مولکولی IgM پنتامر و IgG منومر است ، بنابراین قدرت آگلوتیناسیون IgM نیز حدود پنج برابر IgG می باشد .

۲- شاخصهای آنتی ژنی سیستم Rh در مقایسه با ABO ، در سطح گلبولهای قرمز بسیار کمتر و پراکنده تر می باشند ، بنابراین شبکه آگلوتیناسیون سیستم Rh بسیار مشکلتر از سیستم ABO با آنتی کر اختصاصی تشکیل می گردد.

روش تعیین Rh بر روی لام :

روش کار :

۱) یک لام تمیز را روی جعبه نوری و یا زیر چراغ مطالعه قرار دهید .

۲) یک قطره خون در وسط لام قرار دهید .

۳) یک قطره از Anti-Rho(D) روی قطره خون بریزید .

۴) با اپلیکاتور ، قطره خون و آنتی بادی ضد D را مخلوط کرده و به اندازه دایره ای به قطر حدود ۲ سانتی متر پهن کنید .

۵) لام را در دست گرفته و بر روی کاغذ سفید و در زیر چراغ مطالعه در سطح افقی ، حرکت دورانی آرام دهید یا روی جعبه نوری حرکت داده و نتیجه را بخوانید . نتیجه آگلوتیناسیون در کمتر از دو دقیقه معلوم می شود .

تفسیر :

اگر آگلوتیناسیون دیده شود جواب آزمایش Rh مثبت است و اگر دیده نشود Rh خون منفی و یا RhD^u می باشد .

تبصره ۱ : گاهی ممکن است گلبولهای قرمز بهم چسبیده و تشکیل آگلوتیناسیون کاذب و شکل رولو (Rouleaux Formation) دهند . در این وضعیت برای تشخیص نهائی باید از گلبولهای قرمز شسته شده استفاده کرد .

تبصره ۲ : اگر فردی D^u مثبت باشد ، ممکن است ظاهراً آزمایش منفی و یا واکنش مثبت ضعیف و با تاخیر دیده شود بنابراین اگر واکنش منفی شد ، برای تائید آن باید آزمایش تکمیلی Du را با سرم کومبز (Anti- human globulins) انجام داد .

تبصره ۳: ممکن است بعلت گرمای ۳۷^{oc} ، کناره های قطره خون پخش شده روی لام ، خشک شود و ومنظره ای شبیه به آگلوتیناسیون دیده می شود .

آزمایش تعیین فنوتیپ Du

مواد اصلی مورد نیاز:

۱- نمونه خون را باید با مواد ضد انعقادی *EDTA گرفت تا مانع فعال شدن سیستم کمپلمان و حساس شدن گلبولهای قرمز توسط پروتئینهای کمپلمان گردید .

۲- آنتی گاما گلبولین انسانی (سرم کومبز) یا Anti – human IgG

۳- گلبولهای قرمز حساس شده با IgG بعنوان کنترل مثبت با رقت ۲ تا ۵ درصد . برای این منظور از گلبولهای قرمز Rh مثبت گروه خونی O که با مقدار کمیAnti-RhoD حساس شده اند استفاده می شود. برای این منظور مقدار۰/۲ میلی لیتر از سوسپانسیون ۲ تا ۵ درصد گلبولهای قرمز گروه خون O مثبت را با ۰/۲ میلی لیتر آنتی سرم Anti-RhOD در لوله آزمایش مخلوط کرده و مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه قرار دهید . سپس این گلبولها را ۳ تا ۴ بار با سرم فیزیولوژی بخوبی بشوئید و بعنوان گلبول قرمز حساس شده استفاده نمائید . توجه داشته باشید که مقدار Anti- Rh نباید آنقدر زیاد باشد که گلبولهای قرمز را آگلوتینه نماید .

روش کار :

۱) ابتدا سوسپانسیون ۲ تا ۵ درصد گلبولهای قرمز شسته شده بیمار در سرم فیزیولوژی را تهیه کنید .

۲- مقدار ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون ۲ تا ۵ درصد گلبولهای قرمز بیمار را به انتهای لوله آزمایش بریزید .

۳- مقدار۰/۱ میلی لیتر از Anti-D را به گلبولهای قرمز اضافه کنید.

۴- لوله آزمایش را به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید . این مرحله را مرحله حساس کردن (Sensitization) گلبولهای قرمز می گویند .

۵- گلبولهای قرمز حساس شده را سه تا چهار بار با سرم فیزیولوژی بخوبی بشوئید .

۶- پس از آخرین سانتریفیوژ، لوله آزمایش را برگردانیده تا تمام سرم فیزیولوژی خارج شود ، آخرین قطره را روی دستمال کاغذی خارج کنید .

۷- سپس دو قطره آنتی گلبولین انسانی به گلبولها اضافه کرده و بخوبی لوله آزمایش را تکان داده تا گلبولها در سرم پراکنده شوند .

۸- لوله را به مدت ۳ دقیقه در حرارت اتاق قرار داده و یا یک دقیقه در g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ نمائید .

۸- نتیجه آزمایش را با زدن ضربه ملایمی به ته لوله آزمایش بررسی کرده و آگلوتیناسیون یا عدم آنرا یادداشت نمائید .

* **از** گلبولهای قرمز حساس شده با IgG بعنوان کنترل مثبت استفاده می شود و مانند یک نمونه بر روی آن آزمایش انجام می شود.

تفسیر :

در صورت مثبت شدن آزمایش و مشاهده آگلوتیناسیون، مشخص می شود که فرد دارای آنتی ژن D ناقص و یا به عبارتی آنتی ژن Du می باشد.

آزمایش کومبز مستقیم (Direct Coombs Test)

آزمایش کومبز مستقیم برای تشخیص آنتی بادی های که به گلبولهای قرمز متصل شده اند و آنها را حساس کرده اند انجام می شود. این آنتی بادی ها را آنتی بادی های ناقص (Incomplete) یا مسدود کننده (Blocking) می گویند .

اکثر آنتی بادیهای مسدود کننده از کلاس IgG می باشند ولی گاهی ممکن است از کلاسهای Ig A و یا IgM نیز باشند . در مواردی نیز قطعات شکسته شده C3 و C4 به سطح گلبولهای قرمز متصل شده و آنها را حساس می کنند

گاهی اوقات در بدن فرد در نتیجه نا سازگاری گروه خونی مادر و جنین (Materno- fetal incompatibility) ، یا در اثر انتقال خون ناسازگار و یا در نتیجه بیماریهای اتو ایمیون آنتی بادی هایی در بدن ساخته می شوند که قادرند به آنتی ژن های خودی متصل شوند. در اثر اتصال آنتی بادی ها به گلبول های قرمز، این سلول ها حساس می شوند. تشخیص این سلولهای حساس شده بوسیله آزمایش کومبز مستقیم (DirectCoombs test) انجام می شود . بهترین ماده ضد انعقاد برای انجام این تست EDTA است. اگر نمونه خون مورد آزمایش در مواد ضد انعقادی غیر از EDTA گرفته شود ، کلسیم محیط سبب فعال شدن پروتئینهای سیستم کمپلمان در لوله آزمایش می شود و قطعات شکسته شده کمپلمان به گلبولهای متصل شده و در نتیجه آزمایش کومبز مستقیم بطور کاذب ، مثبت می شود. ماده ضد انعقادی EDTA می تواند به کلسیم متصل شده و آنرا از محیط خارج می کند .بنابر این بهترین ماده ضد انعقاد برای انجام این تست EDTA است. برای انجام آزمایش کومبز مستقیم احتیاج به آنتی گلبولین انسانی (سرم کومبز) است.

آنتی گلبولین انسانی سه نوع می باشد :

۱- آنتی گلبولین با طیف وسیع یا Polyspecific : این آنتی بادی علیه تمام کلاسهای ایمونوگلبولین خصوصاً IgG و پروتئینهای کمپلمان بویژه C3 می باشد . معمولاً از تزریق ایمونوگلبولین ها و کمپلمان انسان به خرگوش تهیه می شود . این آنتی بادی بیشتر بر علیه Fc مولکولهای ایمونوگلبولین و همچنین قطعات C4 ,C3d, C3b کمپلمان می باشد .

۲- گاما گلبولین اختصاصی Monospecific : این آنتی بادی علیه فقط یکی از پروتئینهای سرم انسان می باشد .مثلاً C4b, C3d یا C3b, C4, Cc3, IgA , IgM , IgG C4d.

روش کار آزمایش کومبز مستقیم:

مواد و وسایل لازم

۱- نمونه خون بیمار که همراه با مواد ضد انعقادی EDTA گرفته شده است .

۲- سرم کومبز (آنتی گاماگلبولین انسانی با طیف وسیع)

۳- گلبولهای قرمز حساس شده به عنوان کنترل مثبت . برای تهیه این سلولها می توان از گلبولهای قرمز Rh مثبت گروه O که بوسیله Anti Rh(D) حساس شده اند استفاده نمود.

۱۰- گلبولهای قرمز حساس نشده گروه O منفی به عنوان کنترل منفی

روش کار :

۱) ابتدا از گلبولهای قرمز شسته شده بیمار ، سوسپانسیون ۲ تا ۵ درصد در سرم فیزیولوژی تهیه کنید .

۲- یک قطره از سوسپانسیون ۵ درصد گلبولهای قرمز بیمار را ته لوله سرولوژی بریزید .

۳- دو قطره آنتی گاماگلبولین (سرم کومبز) به آن اضافه کنید .

۴- لوله آزمایش را تکان داده تا بخوبی سوسپانسیون گلبولهای قرمز با آنتی گاماگلبولین مخلوط شوند .

۵- سه دقیقه لوله را در محیط آزمایشگاه قرار دهید .

۶- یک دقیقه در g ۱۰۰۰ لوله آزمایش را سانتریفیوژ نمائید .

۷- نتیجه آزمایش را با ضربه ملایم به ته لوله آزمایش بررسی کرده و آگلوتیناسیون یا عدم آنرا یادداشت نمائید . اگر نتیجه مشکوک باشد ، یک قطره از گلبولهای قرمز را روی لام قرار داده و در زیر میکرسکوپ بررسی نمائید .

۸- همراه با لوله گلبولهای قرمز مورد آزمایش ، یک لوله دیگر با گلبولهای قرمز کنترل منفی آزمایش شود .

تفسیر :

اگر آزمایش مثبت شد و آگلوتیناسیون دیده شد، دلالت بر حساس بودن گلبولهای قرمز بیمار می باشد.

کاربرد آزمایش کومبز مستقیم :

آزمایش کومبز مستقیم برای تشخیص بیماریهای زیر انجام می شود :

۱- بیماریهای همولیتیکی نوزادان مانند اریتروبلاستوز جنینی در جنین

۲- واکنشهای انتقال خون ناجور (Blood transfusion reaction)

۳- تشخیص آنمی همولیتیک اتوایمیون

۴- حساس شدن گلبولهای قرمز در نتیجه مصرف دارو (Drug – Induced red cell sensitization)

۵- حساس شدن گلبولهای قرمز بعلت عفونتهای ویروسی یا علل ناشناخته

آزمایش کومبز غیر مستقیم

این آزمایش جهت بررسی وجود آنتی بادی ناقص در خون فرد علیه یک آنتی ژن خاص صورت می گیرد.

مواد اصلی مورد نیاز :

۱- سرم یا پلاسمای بیمار – پلاسما را می توان از خون همراه با مواد ضد انعقادی سیترات یا EDTA جدا کرد .

۲-آلبومین گاوی ۳۰ درصد

۳- آنتی گلبولین انسانی

۴- سلولهای کنترل مثبت حساس شده (مانند کومبز مستقیم)

۵- سرم کنترل منفی

۶- گلبولهای قرمز معلوم با گروه خونی مورد نظری که سرم بیمار احتمالاً دارای آنتی کر ضد آن می باشد . از این گلبولهای قرمز سوسپانسیون ۲ تا ۵ درصد ، در سرم فیزیولوژی تهیه نمائید .

روش کار :

۱) ابتدا سوسپانسیون ۲ تا ۵ درصد گلبولهای قرمز شسته شده معلوم در سرم فیزیولوژی را تهیه کنید . این گلبولهای قرمز باید دارای آنتی ژن گروه خونی که سرم بیمار احتمالاً آنتی بادی ضد آن را دارد باشد.

۲- مقدار ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون ۲ تا ۵ درصد گلبولهای قرمز معلوم را به انتهای لوله آزمایش سرولوژی بریزید .

۳- مقدار ۰/۱ میلی لیتر از سرم یا پلاسمای بیمار را به گلبولهای قرمز اضافه کنید.

۴- لوله آزمایش را به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید . این مرحله را به نام مرحله حساس کردن (Sensitization) گلبولهای قرمز می گویند .

۵- گلبولهای قرمز حساس شده را سه تا چهار بار با سرم فیزیولوژی بخوبی بشوئید .

۶- پس از آخرین سانتریفیوژ، لوله آزمایش را برگردانیده تا تمام سرم فیزیولوژی خارج شود. آخرین قطره را روی دستمال کاغذی خارج کنید .

۷- سپس دو قطره آنتی گلبولین انسانی به گلبولها اضافه کرده و بخوبی لوله آزمایش را تکان داده تا گلبولها در سرم پراکنده شوند .

۸- لوله را به مدت ۳ دقیقه در حرارت اتاق قرار داده و سپس یک دقیقه در g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ نمائید .

۸- نتیجه آزمایش را با زدن ضربه ملایمی به ته لوله آزمایش بررسی کرده و آگلوتیناسیون یا عدم آنرا یادداشت نمائید .

تفسیر :

اگر نتیجه مثبت باشد و آگلوتیناسیون دیده شود نشان می دهد که در بدن بیمار آنتی بادی علیه آنتی ژن معلوم گلبولهای قرمزی است که برای آزمایش بکار رفته است وجود دارد.

کاربرد آزمایش کومبز غیر مستقیم :

۱- پیش بینی یا تشخیص بیماری همولیتیک نوزادان از سرم مادران Rh منفی یا D^u مثبت که احتمالاً علیه آنتی ژن Rh حساس شده اند .

۲- آزمایش کراس مچ یا سازگاری خون دهنده برای فرد گیرنده خون

۳- تشخیص آنتی ژن RhDu

۴- تشخیص آنتی بادیهای غیر معمول یا ناقص در سرم علیه آنتی ژنهای گروههای خونی سیستم های Kell, Duffy ,Kidd و غیره

آزمایش کراس مچ یا سازگاری گروه خون

(Blood group crossmatch or Compatibility test)

قبل از انتقال خون علاوه بر تعیین گروه خونی ABO گیرنده و دهنده خون به دو روش مستقیم و غیر مستقیم و تعیین Rh ، باید جهت احتمال وجود آنتی بادیهای خارج از انتظار ، آزمایش کراس مچ یا سازگاری گروه خون را انجام داد . آزمایش کراس مچ به دو صورت ماژور (major) و مینور (minor) انجام می شود .

مواد و وسایل لازم :

۱- آلبومین گاوی ۳۰ درصد

۲- سرم کومبز (Coobs serum) یا آنتی گلبولین انسانی با طیف وسیع (Polespesific)

۳- خون منعقد (سرم) و خون همراه با ماده ضد انعقادEDTA گیرنده ی خون. خون گیرنده باید تا حد امکان تازه باشد و بیش از ۷۲ساعت از زمان خونگیری نگذشته باشد. قبل از نمونه گیری از گیرنده خون نباید به بیمار خون تزریق شده باشد.

۴- سوسپانسیون پنج درصد گلبولهای قرمز دهنده (کیسه خون). برای اینکار چند قطره خون منعقد نشده[همراه با ماده ضدانعقادیEDTA] را در لوله ریخته و به آن مقداری سرم فیزیولوژی اضافه کرده و سانتریفیور نمایید. پس از سانتریفیور ، محلول بالایی را دور ریخته و گلبولهای رسوب شده دو مرتبه دیگر با سرم فیزیولوری بخوبی بشویید .آخرین بار پس از خالی کردن سرم فیزیولوژی، گلبولهای رسوب شده را بیست برابر حجمش با سرم فیزیولوژی رقیق کنید و به صورت سوسپانسیون ۵ درصد گلبول قرمز درآورید.

۵- یک کورد (Cord) از کیسه خون

روش آزمایش کراس مچ ماژور

ابتدا گروه خونی گیرنده و گروه خونی کیسه خون را به روش Cell Type مشخص می کنیم. سپس آزمایش مچ را در سه مرحلـه بـه ترتیب زیر انجام می دهیم :

الف- مرحله ی اول یا فاز سرم فیزیولوژی:

۱-به ته یک لوله دو قطره سرم گیرنده خون بریزید.

۲-یک قطره از سوسپانسیون گلبولهای قرمز ۵ درصد خون دهنده (که از کیسه خون تهیه شده است) را به ته لوله اضافه کنید.

۳-لوله را تکان داده و در حرارت اتاق به مد ت ۱۵دقیقه قرار دهید.

۴-لوله را یک دقیقه در g ۱۰۰۰ سانتریفیور نمایید.

۵-محلول بالایی لوله آزمایش را برای همولیز نگاه کرده و سپس به آرامی لوله را تکان داده و در صورت وجـود آگلوتیناسـیون نتـایج را یاداشت وگزارش نمایید.در صورت مشاهده لایـز و یـا آگلوتیناسـیون کیسـه خـون بـرای گیرنـده مناسـب نیسـت ولـی اگرهمـولیز یـا آگلوتیناسیون مشاهده نشد مرحله ی دوم آزمایش را انجام دهید.

ب-مرحله ی دوم یا فاز گرما و آلبومین.

۶-به ته لوله ی آزمایش مقدار دو قطره از محلول آلبومین گاوی ۳۰درصد اضافه نموده و لوله را تکان دهید.

۷-لوله را به مدت ۱۵دقیقه در بن ماری ۳۷درجه سانتی گراد قرار دهید.

۸-لوله را یک دقیقه در g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ کنید .

۹) لوله ها را از سانترفیوژ خارج کرده و تکان داده و نتیجه را در صورت بروز آگلوتیناسیون یادداشت نمایید. آگـر آگلوتیناسـیون دیـده نشد . مرحله سوم آزمایش را ادامه دهید .

ج- مرحله سوم یا فاز سرم کومبز یا آنتی گاما گلبولین

۱۰) لوله را با سرم فیزیولوژی پر کرده و سپس سانتریفیوژ نمائید تا شسته شود این کار را با احتیاط حداقل سه بار انجام دهید .

۱۱) پس ازآخرین شستشو، محلول بالائی گلبولها را با وارونه کردن لوله آزمایش خالی کرده و آخرین قطره سرم فیزیولوژی را با وارونه کردن لوله آزمایش روی یک دستمال کاغذی خارج کنید .

۱۲) ۲ قطره سرم کومبز (آنتی گاماگلبولین انسانی با طیف وسیع) اضافه کنید .

۱۳) لوله را تکان داده تا گلبولها از ته لوله کنده شده و با سرم کومبز مخلوط شوند .

۱۴) لوله را یک دقیقه در g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ کنید .

۱۵) لوله را در بالای یک کاغذ سفید و زیر یک چراغ مطالعه با زدن ضربه آرامی به ته لوله برای وجود یا عـدم آگلوتیناسـیون بررسـی کنید . در صورت مشکوک بودن می توانید محتویات لوله آزمایش را روی لام ریخته و وجـود آگلوتیناسـیون واقعـی یـا آگلوتیناسـیون کاذب (Roulex formation) را در زیر میکرسکوپ بررسی کنید .

تفسیر آزمایش کراس مچ:

۱) اگر نتیجه تمام مراحل آزمایش کراس مچ منفی باشد و هیچ آگلوتیناسیون واقعی دیده نشود ، خون دهنده و گیرنده سازگار می باشند و می توان انتقال خون را انجام داد.

۲) اگر آگلوتیناسیون در مرحله اول آزمایش دیده شود خون دهنده و گیرنده ناسازگار هستند . این ناسازگاری بدلیل ایزوآنتی بادیهای سرد (Isoantibodies cold) مانند ایزو آگلوتینینهای ABO در سرم گیرنده علیه گلبولهای دهنده خون می باشد.

۳) اگر آگلوتیناسیون در مرحله دوم آزمایش دیده شد دلالت بر حساس بودن گیرنده خون علیه آنتی ژنهای سیستم Rh دهنده خون می باشد. در اینصورت خون دهنده برای گیرنده ناسازگار است .

۴) اگر مرحله سوم آزمایش آگلوتینه شود ، احتمال وجود اتو آنتی بادیهای ناقص در سرم گیرنده خون می باشد . در این صورت نیز خون دهنده و گیرنده ناسازگار می باشند .

ب- آزمایش کراس مچ مینور :

در موارد نادری ممکن است دهنده خون دارای آنتی بادی علیه آنتی ژنهای گروه خون گیرنده باشد و تزریق خون کامل موجب بروز مشکلاتی شود . در چنین مواردی تزریق گلبولهای قرمز فشرده(Paked Red cells) معمولاً بی خطر است ولی تزریق خون کامل صحیح نمی باشد . بنابراین برای بررسی وجود آنتی بادی ضد آنتی ژن های گلبول های قرمز گیرنده در خون دهنده، آزمایش کراس مچ مینور انجام می شود. روش این آزمایش تقریبا مانند روش کراس مچ ماژور است با این تفاوت که بجای سرم گیرنده خون، از گلبولهای قرمز آن شخص استفاده می شود و بجای گلبولهای قرمز دهنده خون ، از سرم آن شخص استفاده می شود .

تشخیص سرولوژیک بروسلوز

(Brucellosis)

این بیماری به نام های تب مالت(Malta fever)، بروسلوز(Brucellosis) ، تب مواج(Undulating fever) و تب مدیترانه ای (Meditaranean fever) مشهور می باشد. بروسلوز یک بیماری عفونی مزمن است که می تواند Relapse (بازگشت) داشته باشد. جایگاه اصلی میکروب های بروسلا، حیوانات خصوصاً دام ها می باشند، بنابر این این بیماری جزء Zoonosis Diseases می باشند. این میکروب می توانند باعث سقط جنین در دام ماده نیز شود .

تب مالت توسط گونه های مختلف جنس بروسلا ایجاد می شود. گونه های مهم بیماری زا در انسان عبارتند از :

بروسلا آبورتوس(B.abortus)، بروسلا ملیتنسیس(B.melitensis)، و بروسلا کانیس(B.canis). عامل تب مالت در ایران بیشتر بروسلا ملیتنسیس می باشد. گونه های مختلف میکروب بروسلا بر اساس میزبان مخزن(Reservoirs host) طبقه بندی و نامگذاری شده اند. مخزن بروسلا آبورتوس، گاو ؛ بروسلا ملیتنسیس ، بز؛ بروسلا کانیس، سگ ؛ و بروسلا سوئیس(B.suis)، خوک می باشند .

بیماری از طریق تماس مستقیم پوست آسیب دیده و چشم با بافت های حیوان آلوده یا با خوردن شیر و محصولات لبنی آلوده و یا تنفس باکتری ایجاد می شود. در کشورهایی مانند آمریکا بیشترین عامل بروسلوز، بروسلا آبورتوس و بروسلا سوئیس است. اما در مجموع بیشترین عامل بروسلا در دنیا بروسلا ملیتنسیس است .

باکتری بروسلا به شکل کوکوباسیل، داخل سلولی اختیاری است. زمان نهفته بیماری ۱۰ تا ۱۴ روز است و علایم بیماری بستگی به عواملی مانند گونه بیماری زا و مرحله بیماری دارد .

علائم کلینیکی به سه صورت حاد(Acute)، تحت حاد(sub Acute) و مزمن(Chronic) بروز می یابند. علایم بیماری حاد عبارتند از تب که معمولاً عصرها بروز پیدا می کند و نا منظم(intermittent) می باشد ، عرق شبانه(Night sweat) ، کوفتگی(Fatigue)، کسالت (Malaise) ، ضعف (Weakness)، بی اشتهایی (Anorexia) وکاهش وزن(weight loss) و در مواردی بزرگ شدن طحال(Splenomegaly) و بزرگ شدن کبد (Hepatomegaly). نوع حاد کمتر از ۳ ماه به طول می انجامد که بعداً به مرحله تحت حاد منجر می شود که حدود ۳ تا ۱۲ ماه ادامه خواهد یافت.

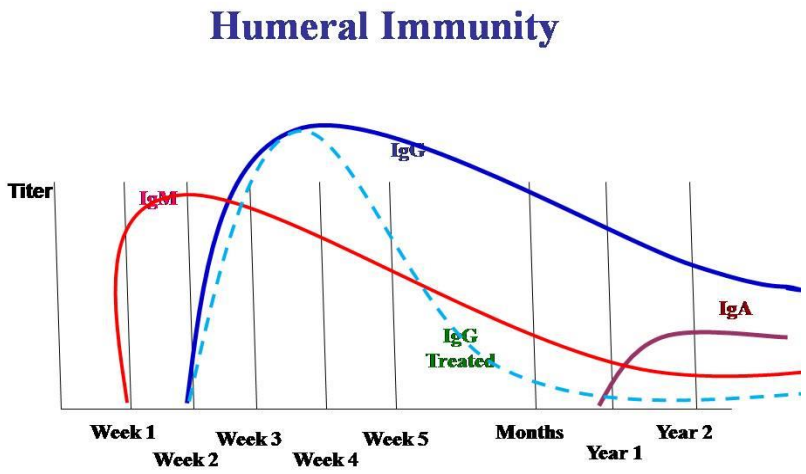
بعد از آن در صورت عدم معالجه، مرحله مزمن بیماری پیش می آید. این مرحله از یک تا چند سال به طول می انجامد.

در بین گونه های بیماری زا شدیدترین علائم توسط بروسلا ملیتنسیس و بروسلا سوئیس ایجاد می شود. علائم بروسلا آبورتوس از همه ملایم تر است.

در این بیماری ایمنی سلولی و هومورال هر دو فعال می شوند. پاسخ Ab علیه بروسلا از نوع IgG,IgA, IgM و مقدار جزئیIgE می باشد. ارزش افزایش IgA در تشخیص بروسلوز مزمن و رجعت آن(replase) و همچنین بعنوان یک Ab مسدود کننده (blocking) مورد بحث و مطرح می باشد .

حدود یک هفته بعد از بیماری، IgM در سرم ظاهر می شود و حدود هفته دوم تا سوم بیماری (۱۳ تا ۱۲ روز بعد) تیتر آن به حداکثر می رسد . مثل اغلب بیماری های عفونی در هفته دوم بیماری سنتز IgG اختصاصی شروع شده و پس از چند هفته تیترش ازIgM نیز بیشتر می شود. قابل ذکر است که ایمنی هومورال بعلت داخل سلولی بودن باکتری چندان موثر نیست. در صورت درمان با آنتی بیوتیک مناسب، تیتر IgG به سرعت کاهش یافته ولی تیترIgM بمدت شش ماه تا دو سال ممکن است دوام داشته باشد. در اینگونه موارد برای آگاهی از تاثیر درمان بایستی تیتر IgG در دوره نقاهت و پس از درمان با مرحله حاد بیماری مقایسه شوند که کاهش تیتر نشانه تاثیر مثبت درمان و فروکش نمودن بیماری است. لذا در بیماری تب مالت تشخیص کلاس آنتی بادی بسیار مهم

است. در صورتیکه تنها IgMدر سرم فرد موجود باشد دلیل بر عدم بیماری است (بروسلوز غیر فعال). افرادی که در تماس مداوم با میکروب بروسلا یا واکسن آن هستند، Ab ضد این میکروب در سرم آنها بیشتر از نوع IgG (با تیتر بیشتر یا مساوی $^{1}/_{320}$ ولی بدون علائم بالینی) می باشند.



تشخیص آزمایشگاهی بیماری به دو صورت انجام می گیرد:

۱- بهترین راه قطعی تشخیص تب مالت جداسازی عامل بیماری است که توسط کشت خون، مغز استخوان ، CSF (مایع مغزی – نخاعی)، مایع مفصلی و دیگر نمونه ها صورت می گیرد. بهترین زمان برای کشت خون زمانی است که تب بالاست. معمولاً بخاطر اینکه باکتری داخل سلولی است، موارد مثبت کشت زیاد نمی باشد (حدود ۳۰-۱۰ درصد). ضمناً کشت در صورت منفی شدن ۴ تا ۵ هفته باید نگهداری شود تا منفی بودن آن قطعی شود که این موضوع نیز از نکات منفی کشت بحساب می آید.

۲- سازمان بهداشت جهانی(WHO) برای تشخیص این بیماری پنج آزمایش سرولوژی استاندارد را بعنوان مناسب ترین راه تشخیص بیماری توصیه نموده است که عبارتند از :

۱- آزمایش رز بنگالRose Bengal test

۲- آزمایش سرواگلوتیناسیون یا آزمایش رایت(Seroagglutination test or Wright test)

۳- آزمایش ۲- مرکاپتواتانول – رایت (2ME – Wright)

۴- آزمایش آنتی گلبولین یا کومبز رایت(Antiglubulin or coombs Wright test)

۵- آزمایش ثبوت مکمل (Complement fixation)

۱- آزمایش رزبنگال(Rose Bengal test) :

این آزمایش جهت بررسی وجود آنتی بادی اختصاصی ضد بروسلا در سرم انجام میشود. در این تست سرم بیمار با آنتی ژن رزبنگال که حاوی باکتری بروسلا است مواجه می شود و چنانچه آنتی بادی اختصاصی ضد بروسلا در سرم بیمار وجود داشته باشد با باکتری

بروسلا آگلوتیناسیون تشکیل می دهد. آزمایش رزبنگال در منابع مختلف به اسامی Rose Bengal plate test یا کارد تست (Card test) و یا آزمون سریع (Rapid test) معروف می باشد. آنتی ژن رزبنگال به رنگ قرمز متمایل به صورت از کلنی های صاف (Smooth) بروسلا آبورتوس سویه ۹۹ یا ۱۹ که آنتی ژنهای مشترکی با دیگر سویه های بروسلا دارند ، تهیه می شود .

در حقیقت سریع ترین تست سرولوژی اولیه یا غربالی (Screen test) برای تشخیص تب مالت تست رزبنگال می باشد(آزمایش اسکرین به آزمایشی گفته میشود که از حساسیت بالایی برخوردار بوده ، ارزان و سریع باشد). توسط این تست می توان موارد مشکوک و مثبت را از منفی جدا نمود. اساس این آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم(Direct agglutination) است

- روش انجام آزمایش :

برای انجام این تست، روی یک اسلاید یک قطره سرم برابر با 0.05^{cc} ریخته و بعد یک قطرهAg رزبنگال در کنار آن قرار داده و مخلوط میکنیم. بعد از ۴ دقیقه تکان دادن اسلاید با دست یا روی روتاتور آگلوتیناسیون را زیر چراغ مطالعه بررسی میکنیم . در صورتیکه جواب منفی شود ، به احتمال زیاد شخص بیمار نیست و اگر جواب تست مثبت شود برای تائید و یافتن تیتر از تست دقیق تر لوله ای یا رایت استفاده میشود .

۲- آزمایش رایت(Wright test)یا(SAT=standard Agglutination test)

آزمایش رایت به دو روش سریع بر روی لام و در لوله انجام میگیرد. این آزمایش جهت بررسی تیتر آنتی بادی ضد بروسلا استفاده می شود. از آنجایی که میکروبهای بروسلا آبورتوس (سویه ۹۹ یا ۱۹) سویس و ملیتنسیس با یکدیگر آنتی ژن های مشترکی دارند، بنابراین برای آزمایش رایت معمولاً از کلنی های صاف بروسلا آبورتوس (سویه ۹۹ یا ۱۹) یا ملیتنسیس بعنوان آنتی ژن استفاده می شود ولی اگر بیماری در نتیجه بروسلا کانیس باشد، باید از همین گونه بروسلا برای تشخیص بیماری بعنوان آنتی ژن استفاده نمود . معمولاً آنتی ژن بروسلا مورد استفاده در تست رایت به روش اسلایدی، آبی رنگ و به روش لوله ای ، شیری رنگ می باشند. اساس این آزمایش نیز آگلوتیناسیون مستقیم است. در ایران چنانچه تیتر آنتی بادی با استفاده از این روش **بیشتر از $^{1}/_{80}$** باشد ، مثبت تلقی می شود .

برای انجام آزمایش رایت به روش اسلایدی مقادیر مختلفی از سرم با حجم های 0.005, 0.01 , 0.02 , 0.04, 0.08 را بر روی اسلاید چند خانه قرار میدهیم و سپس یک قطره Ag بروسلا (آبی رنگ) به هر کدام اضافه می کنیم. بعد از مخلوط کردن و حرکت دادن بمدت ۳ دقیقه ، جواب را براساس آگلوتیناسیون در زیر چراغ مطالعه بررسی میکنیم. آخرین تیتری که حدود ۲+ است تیتر مورد نظر ما می باشد .بر اساس محاسبات انجام شده با در نظر گرفتن حجم های سرم و قطره آنتی ژن اضافه شده رقت های سرم در روش مذکور به ترتیب $^{1}/_{20}$ $^{1}/_{40}$ $^{1}/_{80}$ $^{1}/_{160}$ $^{1}/_{320}$ میباشد .

- روش انجام آزمایش رایت لوله ای:

۱۰ لوله آزمایش انتخاب می نمائیم . در لوله اول ^{cc} 0.9و در لوله های بعدی^{cc} 0.5 نرمال سایلین اضافه می کنیم. سپس به لوله اول میزان cc 0.1 سرم اضافه نموده و پس از مخلوط نمودن ، میزان ^{cc} 0.5 از آن را برداشته و به لوله دوم اضافه کرده و به همین ترتیب این کار را تا لوله نهم ادامه میدهیم و در پایان ^{cc} 0.5 از لوله نهم به بیرون ریخته میشود. سپس ^{cc} 0.5 از آنتی ژن شیری رنگ که به

نسبت ۱/۱۰ رقیق کرده ایم به تمام لوله ها اضافه میکنیم. در نهایت لوله ها را به مدت ۲۸-۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار میدهیم و نتایج را بررسی میکنیم .

در تست SAT میتوان بجای گذاشتن لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه، بلافاصله آنها را با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کرده و جوابها را گزارش نمود. با این روش اکثراً پدیده منطقه ای نیز از بین می رود .

برای بررسی نتایج آگلوتیناسیون در لوله، هم از Supernatant (مایع رویی) و هم از Pellet (رسوب ته لوله) استفاده میکنیم. اگر نتیجه آزمایش تست مثبت باشد، تمام Ag ها توسط Ab آگلوتینه می شود و بصورت رسوب مضرسی در ته لوله جمع می شود و مایع رویی کاملاً شفاف باقی می ماند. ولی اگر نتیجه تست منفی باشد، مایع رویی کدر (turbid) شده و رسوب بصورت یک نقطه و کاملاً منظم می باشد. در صورت مثبت بودن آزمایش، برای تایید موضوع به آهستگی لوله را مخلوط کرده و آگلوتیناسیون را مشاهده می کنیم .

۳- آزمایش تشخیص کلاس آنتی بادی یا تست 2ME-Wright:

این آزمایش پس از مثبت شدن آزمایش رایت جهت تعیین کلاس Ab انجام میشود. با استفاده ازغلظتی حدود 0.1 M از 2-ME ، مولکولهای IgM سرم از بین میروند ولی IgG باقی می ماند. مهمترین کاربرد این تست تشخیص افتراقی بین بروسلوز فعال و غیر فعال (درمان شده) در فردی است که تظاهرات بالینی بیماری را دارد می باشد. بعلاوه با انجام این آزمایش میتوان تاثیر آنتی بیوتیک مناسب را در درمان بیماری تحت بررسی قرار داد. در صورت موثر بودن درمان، تیتر IgG پایین می آید در حالیکه IgM تا مدتها بالا باقی میماند.

روش آزمایش 2ME-Wright:

این روش شبیه تست لوله ای است. هر چند دو تفاوت وجود دارد: اولاً اینکه بجای Sailin از محلول 2ME استفاده میشود. ثانیاً زمانیکه 0.1 cc سرم را در لوله حاوی 2ME ریختیم، لوله را به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری میکنیم (برای تخریب IgM). در نهایت لوله ها را به مدت ۲۸-۲۴ ساعت در ۳۷ قرار می دهیم. آخرین رقتی که ۲+ شد بعنوان تیتر 2ME گزارش میدهیم. در ایران چنانچه تیتر آنتی بادی با استفاده از این روش **بیشتر از 1/40** باشد مثبت تلقی می شود.

۴- آزمایش کومبز – رایت (Antiglobulin test or coombs –Wright test)

در فاز مزمن و یا relapse بروسلوز، در برخی افراد نوعی Ab بر ضد بروسلا ایجاد میشود که توانای آگلوتیناسیون ندارد و به آنها Ab های ناقص (incomplete) یا مسدود کننده (blocking) میگویند. در تست های سرولوژیک، این Ab های ناقص به Ag می چسبند و مانع از اتصال Ab های کامل بروسلا که توانایی آگلوتیناسیون کامل آنتی ژن بروسلا را دارند به آنتی ژن های بروسلا می شود. در این موارد تست رایت بیمار منفی است اما بعلت وجود علائم بالینی و یافته های اپیدمیولوژیک، پزشک هنوز مشکوک به بیماری بروسلا است. بنابراین پزشک برای تشخیص آنتی بادی های ناقص ضد بروسلا تست کومبز رایت را درخواست می کند. اساس تست کومبز رایت، آگلوتیناسیون غیر مستقیم (Indirect agglutination) است. در تست کومبز رایت از آنتی گلبولین انسانی استفاده می کنند تا آنتی بادی های ناقص را که به آنتی ژن برسلا متصل شده اند به هم متصل نمایند و آگلوتیناسیون بوجود آورد.

- روش انجام Coombs –Wright test :

در ابتدا آزمایش رایت را انجام داده و نتیجه را ثبت میکنیم. سپس لوله ها را به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ می کنیم . مایع رویی را دور ریخته، رسوب را سه بار با saline میشوییم. سپس در آخرین مرحله تمام sailine را خارج نموده و آخرین قطره را با گاز خشک می کنیم. سپس یک قطره آنتی گلبولین انسانی گسترده طیف (AHG) را به رسوب هر لوله اضافه و لوله ها را تکان می دهیم. نیم ساعت در بن ماری 37^{oc} میگذاریم. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ کرده و سپس با زدن ضربه آرامی به ته لوله ها نتیجه را بررسی میکنیم. تیتر آخرین لوله ای که آگلوتیناسیون در آن دیده شود، گزارش میشود (این تیتر حداقل بایستی دو تیتر بالاتر از SAT باشد تا آزمایش مثبت تلقی شود .)

نکات آزمایش های مربوط به بروسلوز:

تشخیص بیماری بروسلوز یا تب مالت بر اساس اطلاعات اپیدمیولوژیکی، بالینی و آزمایشگاهی تواماً صورت میگیرد. مرحله بروسلوز حاد ، با آزمایش سریع رز بنگال معلوم میشود. بررسی های انجام شده نشان میدهد که این تست بسیار حساس و نتیجه آن قابل مقایسه با الایزا می باشد. بعلاوه آنتی ژن رزبنگال با عامل بیماریهای تولارمی و ویبریو کلرا در PH اسیدی واکنش متقاطع ندارد و در نتیجه مثبت کاذب در این آزمایش بسیار نادر است .

در تست Wright، تیتر قابل ارزش در ایران حداقل $^1/_{160}$ و بالاتر می باشد امروزه معمولاً از آزمایشگاه درخواست تست رایت می شود و آزمایشگاه معمولا تست رایت و رزبنگال را با هم انجام می دهد. در افرادی که با دام سروکار دارند و یا واکسن بروسلا دریافت نموده اند ، تیتر پایه بالاتر است. در اینحالت بدون وجود بیماری بروسلوز ، تیتر Ab (از نوع IgG) $^1/_{320}$ و بالاتر می باشد .

در اوایل بیماری تیترAb پائین است و معمولاً در اواخر هفته اول یا اوائل هفته دوم بیماری مثبت میشود . آنتی بادی اولیه IgM است و به دنبال آن IgG (IgG_1 و IgG_2) افزایش می یابد و پس از چند هفته تیتری بالاتر از IgM پیدا می کند. بنابراین اگر تیتر Ab در شخص پایین باشد، اما همه شواهد نشان دهنده بیماری بروسلوز باشد، می بایست یک تا دو هفته بعد مجددا آزمایش تکرار شود و در صورتیکه افزایش تیتر ۴ برابر (4 Fold rising) باشد مثبت تلقی گردد .

حداکثر میزان آنتی بادی در هفته های چهارم تا هشتم بیماری است که البته بیشتر مربوط به وجود IgG است. در صورت درمان مناسب، تیتر IgG کاهش یافته ولی تیتر IgM از ۶ ماه تا ۲ سال ممکن است دوام داشته باشد که این موضوع توسط آزمایش2ME مشخص میشود .

در بیماری تب مالت گاهی به علت تیتر بالای آنتی بادی پدیده پروزون (Pro zone) ایجاد می شود، لذا درچنین حالتی باید سرم را رقیق نموده و آزمایش رایت را انجام داد. (در پدیده پروزون به علت وجود مقدار بسیار زیاد آنتی بادی، آگلوتیناسیون تشکیل نمی شود)

رجعت بیماری پس از درمان ، یکی از مشکلات بیماری تب مالت است. در این حالت آزمایش های رایت و یا 2ME ممکن است قادر به تشخیص وجود آنتی بادی از جنس IgA نباشند. اما روش هایی مانند کومبز رایت و یا الایزا قابلیت تشخیص Ab را خواهد داشت . میکروبهای بروسلا با میکروبهای Vibrio cholerae، Francisella tularensis و واکسن آنها و همچنین میکروب Yersinia entrolytica ساختمان آنتی ژنتیک مشترکی دارند. بنابراین عفونت با این میکروبها می تواند سبب افزایش کاذب تیتر آگلوتیناسیون ضد بروسلا شود .

اگر مادری مبتلا به بروسلوز باشد، آزمایش رایت در نوزاد کمتر از ۶ ماه او بعلت عبور Ab (از نوع IgG) از جفت ممکن است مثبت شود. در اینحالت برای تشخیص اینکه نوزاد دچار بروسلوز است یا نه هر دو تست SAT و 2ME را انجام می دهیم و نتایج را مقایسه میکنیم. در صورتیکه تیتر هر دو آزمایش یکسان باشد و تفاوتی بین آنها مشاهده نشود، علت مثبت شدن این دو آزمایش IgG مادری است؛ اما اگر تیتر SAT بالاتر باشد ، نشان دهنده وجود Ab از نوع IgM بر علیه بروسلا می باشد و در حقیقت خود نوزاد مبتلا به تب مالت می باشد. راه دیگر تشخیص بروسلوز در نوزاد انجام آزمایش در فاصله ۴-۳ هفته بعد می باشد که اگر تیتر آنتی بادی کاهش یافت بیماری از مادر است.

برای تشخیص بروسلوز عصبی (نوروبروسلوز) بررسی سرولوژی CSF ارزش زیادی دارد. در این حالت می بایست تیتر Ab بر ضد بروسلا در مایع نخاع و سرم با هم مقایسه شوند . اگر نسبت تیتر مایع نخاع نسبت به سرم بیش از $^1/_{100}$ باشد ، نشان دهنده درگیری CNS است .

تشخیص سرولوژیک حصبه و شبه حصبه

باکتری های جنس سالمونلا از دسته باسیل های گرم منفی می باشند که از راه دستگاه گوارش وارد بدن انسان می شوند و موجب پیدایش بیماری تب تیفوئیدی (حصبه) و تب پاراتیفوئیدی (شبه حصبه) که به نام تب روده ای (Enteric fever) نیز مشهورند، میگردند .

گونه های مهم این باکتری، سالمونلا تیفی (گروه D) و سالمونلا پاراتیفی (گروههای A و B و C) می باشند .

بیماری حصبه از جمله بیماریهای عفونی تب زا محسوب میشودکه عبارتند از :

۱- حصبه (Typhoid fever)

۲- شبه حصبه (Paratyphoid fever)

۳- تب مالت (Brucellosis)

۴- تولارمی(Tularemia)

۵- تب راکی (Rocky mountain spotted fever)

۶- تیفوس (Typhus)

میزبان اصلی بیماری های حصبه و شبه حصبه انسان است. باکتری بصورت مدفوعی – دهانی و یا ادراری – دهانی از طریق دست آلوده به ادرار و یا مدفوع شخص بیمار و یا از طریق آب و غذای آلوده به ادرار و مدفوع شخص بیمار، وارد دستگاه گوارش می شود. بیماری تیفوئید بعد از ۱ تا ۳ هفته انکوباسیون با علائمی مانند تب(Fever) ، سردرد (Headache)، خستگی (Fatigue)، ضعف(Weakness) و بی قراری(Malasia) شروع می شود و می تواند با بزرگ شدن کبد و طحال (Hepatosplenomegaly)و همچنین اسهال (Diarrhea) و یا یبوست (Constipation) همراه شود. باکتری قابلیت ورود به همه ارگان های بدن را دارد. وجه مشخص بیماری وجود تب طولانی است که در افراد درمان شده ۴ تا ۸ هفته طول میکشد. ۳ تا ۵ درصد از افراد مبتلا به این بیماری بعداً به صورت ناقل درآمده و باکتری در مجاری صفراوی و ادراری آنها باقی مانده ، همراه با مدفوع و ادرار دفع می شود و به این ترتیب می توانند سایر افراد را آلوده کنند .

گونه های پاراتیفی نیز بیماری شبیه به تیفوئید ایجاد می کنند اما شدت بیماری کمتر و زمان نهفته بیماری نیز کوتاه تر است .

تشخیص آزمایشگاهی :

روش تشخیص قطعی بیماری جدا کردن ارگانیزم از نمونه های بیمار است. معمولاً کشت خون در هفته اول و دوم مثبت میشود و به دنبال آن تست مدفوع و ادرار نیز مثبت می شود لذا **بعد از هفته دوم** از کشت های این دو نمونه نیز میتوان استفاده کرد. البته امکان استفاده از تست مغز استخوان و ترشحات معده و روده نیز وجود دارد. اما مشکلی که در استفاده از کشت وجود دارد این است که اولاً در بسیاری از موارد با وجود اینکه بیمار به حصبه یا شبه حصبه مبتلا است ولی کشت نمونه های آن منفی می شود و ثانیاً مدت زمان زیادی طول می کشد تا آزمایشگاه جواب کشت را بدهد. یکی دیگر از روش های تشخیص این بیماری، استفاده از تست های سرولوژی است.

تست های سرولوژیک:

تست های سرولوژیک در مراحل اولیه بیماری کمک چندانی نمی کنند چراکه آنتی بادی به میزان کافی ایجاد نشده است و بایستی حداقل ۷ تا ۱۰ روز از شروع عفونت گذشته باشد. به طور کلی در آزمایش های سرولوژیک در صورتیکه افزایش تیتر داشته باشیم دلیل بر وجود بیماری است لذا بهتر است که آزمایش را بر روی ۲ نمونه متوالی به فاصله ۱ تا ۲ هفته انجام دهیم. در صورتی که افزایش ۴ برابر(4 Fold rise) داشته باشیم از نظر تشخیص قابل اهمیت است. بنابراین انجام آزمایش بر روی تنها یک نمونه اهمیت چندانی ندارد مگر اینکه تیتر آنتی بادی خیلی بالا باشد .

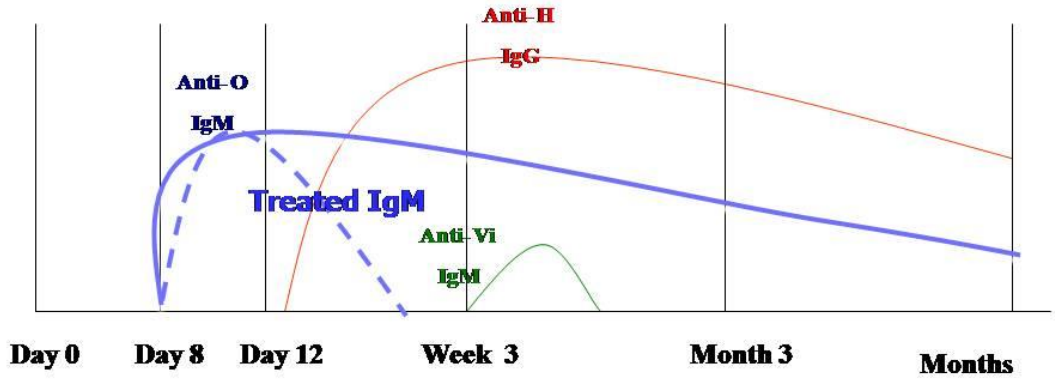
رایج ترین تست سرولوژیک برای تشخیص حصبه و شبه حصبه آزمایش سرولوژی ویدال (Widal) است. سادگی و سهولت آزمایش باعث استفاده فراگیر از آن شده است هر چند ارزش تشخیصی آن به دلایلی مانند اشکال در استاندارد کردن آنتی ژنهای تجارتی، تفاوتهای تکنیکی ، متغیر بودن نسبی جوابها در آزمایشگاههای مختلف ، تحت سئوال است .

به طور کلی در این بیماری سه نوع Ab ایجاد می شود :

۱ آنتی بادی علیه آنتی ژن سوماتیک یا پیکره ای (آنتی بادی علیه آنتی ژن O) که حدود یک هفته پس از ایجاد بیماری در سرم ظاهر می شود. این آنتی ژن از جنس لیپوپلی ساکارید و آنتی بادی مربوط به آن از جنس IgM می باشد .

۲- آنتی بادی علیه فلاژل (آنتی بادی علیه H آنتی ژن) که از حدود هفته دوم در سرم ظاهر می شود. این آنتی ژن از جنس پروتئین است و آنتی بادی مربوط به آن از جنس IgG می باشد. معمولاً تیتر این Ab خیلی بیشتر از آنتی O بوده و ضمناً مدتها در بدن باقی می ماند.

۳- آنتی بادی ضد کپسول (آنتی بادی علیه Vi). جنس این Ag پلی ساکارید می باشد و Ab ضد آن از کلاس IgM می باشد. البته این Ag فقط در گونه های سالمونلا تیفی و سالمونلا پاراتیفی C (S.Paratyhi C) دیده شده است . این Ab دیرتر از دو Ab دیگر و معمولا سه هفته بعد از بیماری ایجاد میشود و به سرعت نیز در سرم کاهش می یابد . البته در افراد ناقل بیماری، Ab ضد Vi تیتر بالاتری از Ab علیه H و O دارد.



آزمایش ویدال:

آزمایش **ویدال** که جزء آزمایش های Febrile می باشد بر اساس آگلوتیناسیون فعال مستقیم و به منظور جستجوی Ab های اختصاصی ضد آنتی ژن های سالمونلایی در سرم انجام می گیرد. برای انجام آزمایش ویدال از آنتی ژنهای سوماتیک« O » و فلاژل « H » چهار گونه سالمونلا تیفی و سالمونلا پاراتیفیA و B و C استفاده می شود . Ag های سوماتیک « O » را با حروف بزرگ A و B و C و D و Ag های فلاژل« H » را با حروف کوچک a وb و c و d نشان می دهند . بنابر این به عنوان مثال Ag های D و d به ترتیب مربوط به Ag های O و H سالمونلا تیفی (گروه D) می باشند. جهت انجام آزمایش ویدال، آنتی ژنهای فوق را با سرم بیمار مواجه می کنند ، در صورت وجود Ab اختصاصی ضد این آنتی ژنها در سرم فرد بیمار ، واکنش آگلوتیناسیون صورت میگیرد که بصورت چشمی قابل مشاهده است .

روش آزمایش :

این آزمایش به سه صورت انجام میگیرد :

الف- آزمایش اسکرین یا غربالی

ب- تیتراسیون به روش اسلاید

ج- تیتراسیون به روش لوله

الف –آزمایش اسکرین یا غربالی :

0.03ml از سرم بیمار را روی یک صفحه شیشه ای که توسط مواد شمعی یا قلم الماس به شش قسمت تقسیم شده است مـی ریـزیم سپس به هر خانه یک قطره از یکی از آنتی ژنهای Hb یا Ha یا Hd یا OB یا OA یا OD اضافه می کنیم و بعد آنها را با اپلیکـاتور مخلوط می نمائیم به طوری که دایره ای به قطر حدود 2.5 سانتی متر ایجاد شود . صفحه شیشه ای را به مدت ۳ دقیقه بـا دسـت یا روی روتاتور حرکت می دهیم و جواب را زیر نور مستقیم چراغ مطالعه بررسی می کنیم . سرم با هر کدام از Ag ها کـه مثبـت شـد باید تیتر شود . برای تیتراسیون از دو روش اسلاید و لوله ای استفاده می کنیم .

ب- تیتراسیون به روش اسلاید :

سرم بیمار را به مقادیر 0.08 ,0.04, 0.02, 0.01 , 0.005 میلی لیتر روی اسلاید ریخته و یک قطرهAg مـورد نظـر را بـه هرکـدام اضافه می کنیم و سپس با اپلیکاتور مخلوط می کنیم . آخرین رقت که در آن حدود +2 آگلوتیتاسـیون ایجـاد شـود را بعنـوان تیتـر گزارش میکنیم . حجم سرم در هر خانه به طور تقریبی معادل تیتر زیر به روش لوله می باشد .

تیتر تقریبی	حجم سرم
1:20	0.08
1:40	0.04
1:80	0.02
1:160	0.01
1:320	0.005

ج- تیتراسیون به روش لوله (Tube test)

ده لوله آزمایش را در جا لوله ای قرار داده و به لوله اول 0.9^{cc} و به بقیه لوله ها 0.5^{cc} سیلین اضافه می کنیم . سپس به لوله اول 0.1cc سرم اضافه می کنیم . بعد از مخلوط کردن این لوله0.5^{cc} از آن را برداشته و به لوله بعد میریزیم و همین کار را تا لولـه آخـر ادامه میدهیم . در پایان 0.5cc از لوله آخر را بیرون میریزیم . بعد به تمام لولـه هـا 0.5^{cc} Ag اضـافه مـی کنـیم . بایسـتی توجـه داشت که در روش لوله ای Ag مورد نظر را طبق دستور موسسه سازنده بایستی با سیلین رقیق نمود (معمولاً آنتی ژن کیت هـا بـه نسبت ۱/۱۰ رقیق می شوند). جا لوله ای محتوی لوله ها را به آرامی تکان می دهیم تا سرم و Ag بخوبی مخلـوط شـوند . سـپس لوله ها را در حرارت $45\text{-}52^{oc}$ در بن ماری(Water bath) قرار می دهیم .لوله هایی که حـاوی آنتـی ژن « O » مـی باشـند بـه مدت 18-24 ساعت و لوله هایی که حاوی آنتی ژن « H » می باشند را به مدت 1-2 ساعت در بن ماری قرار میدهیم.

همچنین می توانیم لوله های حاوی آنتی ژن « O » را در 48^{oc} و لوله های حاوی آنتی ژن « H » را در دمای اتاق(RT) قـرار داده و نتیجه هر دو را بعد از ۲۴ ساعت قرائت کنیم .

نحوه بررسی نتایج در روش لوله ای شبیه روش رایت می باشد . به این معنی که مایع رویی(Supernatant) شـفاف و وجـود رسـوب مضرس دلیل بر آگلوتیناسیون و مثبت بودن آزمایش است . اگر مایع رویی کدر و رسوب بصورت دایره ای شکل باشد و هنگام حرکت دادن لوله رسوب کاملاً حل شود ، دلیل منفی بودن نتیجه است. آگلوتیناسیون آنتی ژن « O » بصورت دانه های ریـز(Granular) و محکم است و هنگام حرکت دادن لوله متلاشی نمی شود و دوباره به وضع اولیه بر می گردد (بدلیل آنکه آگلوتیناسیون آنتـی ژن O

به کندی صورت می گیرد) و آگلوتیناسیون آنتی ژن فلاژل « H » سریع و به صورت دانه هـای درشـت ، فلوکـولار (Floccular) و ظاهراً شبیه گلوله برفی بنظر می رسد که در اثر تکان دادن لوله از هم پاشیده می شود . برای تفسیر نتایج ، لوله ها را تک تک بررسـی کرده ، لوله ای که حدود +2 آگلوتینه شده بعنوان تیتر نهایی گزارش می شود .

تفسیر نتایج :

اگر در هفته اول بیماری سرم بیمار مورد آزمایش ویدال قرار گیرد، احتمالاً نتیجه منفی می شود و در آزمـایش مجـدد چنـد روز بعـد احتمالاً مثبت خواهد شد . زیرا آگلوتینین « O » از حدود روز هشتم و آگلوتینین « H » از حدود روز دهـم تـا دوازدهـم بتـدریج در خون ظاهر میشوند . در ابتدای بیماری تیتر آگلوتینین « O » بیشتر از « H » می باشد ولی پـس از چنـد روز تیتـر آگلـوتینین « H » بسرعت بالا رفته و از آگلوتینین « O » بیشتر میشود .

تیتر قابل قبول برای مثبت قلمداد کردن بیماری در کشورهای مختلف متفاوت است . در ایران اگر تیتر آنتی « O » برابـر بـا $^1/_{80}$ و تیتر آنتی « H » برابر با $^1/_{40}$ باشد مشکوک به بیماری حصبه می شویم و تیتر بالاتر را معمولاً به عنوان بیماری قلمداد می کننـد . البته مثبت شدن آنتی H به تنهایی ارزش تشخیصی ندارد ولی مثبت شدن آنتیO میتواند دلیل بر بیماری باشد زیـرا بعـد از درمـان تیتر آنتی H تا مدت ها بالا باقی می ماند در حلیکه تیتر آنتی O سریعتر پایین می آید.

در صورت مثبت شدن تیتر آنتیO به تنهایی، بهتر است نتیجه را تکرار کرده در صورت وجود بیماری تیتر آنتی O بـالاتر مـی رود و احتمال مثبت شدن تیتر آنتی H نیز وجود دارد . تیتر آنتی O معمولاً از $^1/_{400}$ فراتر نمـی رود ول تیتـر آنتـی H از $^1/_{1000}$ نیـز بالاتر رفته و سالها پس از بهبودی مثبت باقی می ماند .

گاهی ممکن است آگلوتینینهای مادری سبب مثبت شـدن anti -H در سـرم نـوزادان کمتـر از ۶ مـاه شـود . ایـن آنتـی بـادی هـا از کلاسIgG می باشند که از جفت عبور می کنند. ولی به دلیل اینکه anti -O از کلاس IgM است ، وجـود آن دلالـت بـر بیمـاری سالمونلوز در نوزاد است .

نکات مهم در تفسیرنتایج آزمایش ویدال :

برای روشن شدن مطلب ، نتایج مختلفی از آزمایش ویدال که ممکن است توسط آزمایشگاه گزارش شود در جدول شـماره ۲-۶ مـورد مطالعه و تفسیر قرار داده می شوند .

جدول شماره ۲-۶ نمونه های جواب آزمایش ویدال :

آنتی ژن	مثال ۱	مثال ۲	مثال ۳	مثال ۴
D	1:320	-	1:160	-
d	1:640	-	-	1:320
A	-	-	-	-
a	-	-	-	-
B	-	1:160	-	-
b	-	1:320	-	-

مثال یک- جواب آزمایش مثلاً اینست : آزمایش با آنتی ژن "D" به نسبت 1:320 و با آنتی ژن "d" به نسبت 1:640 مثبت و با بقیه منفی شده است (ستون ۱ جدول)

تفسیر این مورد خیلی آسان است و وجود بیماری حصبه در نتیجه باسیل سالمونلا تیفی (S.typhi) را در حالت استقرار نشان میدهد ، زیرا که در این بیمار آنتی بادی در مقابل هر دو آنتی ژنهای "O " و "H " ضد سالمونلا تیفی بمقدار قابل توجهی برای تشخیص بیماری تیفوئید وجود دارد .

مثال ۲ – جواب آزمایشگاه مثلا اینست : آزمایش با آنتی ژنهای "B" به نسبت 1:160 و با"b" به نسبت1:320 مثبت ولی با بقیه منفی می باشد (ستون ۲ جدول)

تفسیر این مورد یک تب شبه حصبه در نتیجه باسیل سالمونلا پاراتیفیB می باشد .

مثال ۳ – جواب آزمایشگاه مثلاً بدین قرار است : آزمایش با آنتی ژن "D" به نسبت 1:160 مثبت و با بقیه منفی گردیده است . (ستون ۳ جدول) این مورد آزمایش را بصورتهای مختلف زیر میتوان تفسیر کرد :

الف- بیمار مبتلا به حصبه در روز هفتم تا دهم بیماری می باشد . در این وضعیت چون آنتی بادی بر علیه آنتی ژن "O" زودتر بوجود می آید ، لذا آزمایش در مقابل آنتی ژن "O" مثبت شده است . در این مورد باید پس از چند روز آزمایش را باید تکرار کرد تا در صورتی که تیتر آنتی بادی بر علیه آنتی ژن"O" افزایش نشان دهد و آنتی بادی ضد "H" نیز در سرم مثبت شده باشد در اینصورت حدس ما صحیح است .

ب- ممکن است شخص مبتلا به عفونت با باسیل Yersinia psudotuberculosis و یا سامونلا انتریتیدیس S.enteritidis باشد که با آنتی ژن تشابه آنتی ژنی دارد .

مثال ۴ - جواب آزمایش ویدال بیماری با آنتی ژن "d" به نسبت 1:320مثبت و با بقیه منفی است (ستون ۴ جدول) در این مورد چنین میتوان تفسیر کرد که بیمار قبلاً مبتلا به تیفوئید شده و اکنون بهبود یافته است .

موارد مثبت کاذب :

۱- احتمال واکنش متقاطع با آنتی ژنهای سایر باکتریها مانند سالمونلا انتریتیدیس و یرسینیا توبرکولوسیس (Yersinia psudotuberculosis) و مثبت شدن آزمایش بصورت کاذب وجود دارد . البته معمولاً در این حالت ها تیتر آنتی بادی چندان بالا نیست .

۲- واکسیناسیون علیه تیفوئید و پارا تیفوئید که بیش از ۳ ماه آن گذشته باشد ممکن است سبب مثبت شدن آزمایش با آنتیH تنها شود.

۳- ممکن است افراد مسن نیز تیتر بالایی از آنتی H را در سرم داشته باشند ، لذا مثبت شدن آنتی H بدون مثبت شدن آگلوتینین هایO بدون ارزش است .

موارد منفی کاذب :

۱- استفاده از آنتی بیوتیک در اوایل بیماری ممکن است سنتز آگلوتینین ها را متوقف کرده و یا آنها را کاهش دهد . بنابر این منفی شدن آزمایش ویدال دلیل بر فقدان صد درصد بیماری نیست .

۲- چنانچه بیمار در هفته اول بیماری است که هنوز در بدنش Ab بر علیه سالمونلا ساخته نشده است تست ویدال منفی می شود .

* به مجموع تست های Widal و Wright در اصطلاح FAT (Febrile Agglutination Test) می گویند.

تشخیص سرولوژیک روماتیســـــم مفصـــلی

(Rheumatoid Arthritis)

روماتیسم مفصلی یک بیماری خود ایمنی(Autoimmune) است که در جوامع مختلف بین ۰/۳ تا ۱/۵ درصد (بطـور متوسـط ۱٪) افراد را مبتلا می کند. بیماری بیشتر در سنین میانسالی یعنی ۴۰ تا ۶۰ سالگی دیده می شود. فعالیـت بیمـاری در افـراد بـالاتر از ۶۰ سال چندان شدید نخواهد بود. در ابتدای بیماری علایم غیر اختصاصی مانند خستگی (Fatigue) ، بـی قـراری(Malaise) ، بـی اشـتهایی(Anorexia) ، کـاهش وزن (Weight loss) و دردهـای مفصـلی(Arthralgia) وجـود دارد کـه بیشـتر بـه صـورت قرینه(Symmetrical) مشاهده می شود و در ابتدا مفاصل کوچک مانند انگشتان را در بر گرفته و سپس به مفاصـلی ماننـد مفاصـل لگن ، دست و پا و شانه و غیره نیز منتقل می شود.

در این بیماری مفاصل مهمترین ارگان درگیر می باشند اما سایر ارگانها مانند قلب ، ریه ، چشم ، و غیره نیز ممکن است درگیر شـوند. از علائم این بیماری خشکی صبحگاهی (Morning stiffness) در مفاصل است که حرکت در هنگام صبح مشکل و دردنـاک اسـت اما با گذشت زمان کم کم حرکت راحت تر انجام میشود.در صورت عدم کنترل بیماری ، التهاب حاصل مـی توانـد در نهایـت بـه تغییـر شکل (Deforming) مفاصل و استخوانهای مربوط ، بخصوص انگشتان دست و پا و هم چنین آتروفی عضلانی به علـت عـدم تحریـک مفاصل منجر شود.

افراد زیر ۱۶ سال دچار یک نوع آرتریت روماتید به نام juvenile Rheumatoid arthritis یا Still`s disease می شوند.

علت بیماری وجود آنتی بادی علیه ناحیهFC ایمونوگلوبین جی(IgG) است. این آنتی بادی اکثراً از جنس IgM پنتامر بوده و بـه آن فاکتور روماتید (RF) می گویند. البته اکثر افراد ، آنتی بادی از جنس IgG و IgA نیز دارند. تعدادی از افراد در آزمایشات معمـول ظاهراً فاقد فاکتورR.F هستند و به آنها افراد Seronegative می گویند و حدود ۲۰٪ افراد مبتلا به R.F را تشکیل می دهنـد. در این افراد فاکتور روماتید از جنس IgM مونومر، IgA ،IgG و گاهی نیز IgE است.

فاکتور R.F از کلاسIgG دال بر پیشرفت بیماری و از کلاس IgA نشان دهنده بروز ضایعات مفصلی است.

پاتوژنز بیماری :

به احتمال زیاد ازدیاد حساسیت نوع سوم (Type III hypersensitivity) در این بیماری نقش دارد. به نظر می رسد اتو آنتی بادی R.F در اثر واکنش با Ab مربوطه سبب فعال شدن سیستم مکمل از راه کلاسیک شده و این موضوع سبب آزاد شـدن کموتاکسـین ها و آنافیلا توکسین ها شده که در مجموع سبب تجمع لوکوسیت ها و ایجاد التهاب می شود. تعداد زیادی نوتروفیل در مـایع مفصـلی در طی فاز حاد بیماری دیده می شود که به نظر می رسد در اثر واکنش های ایجاد شده مقدار زیادی آنزیم لیزوزومی ایجاد می کنند.از بین آنزیم های مختلف، کلاژناز ، ژلاتیناز ، الاستاز ، و کاتپسین در از بین بردن ماتریکس غضروف ها نقش مهمتری دارند.

همه این عوامل در پایان منجر به از بین رفتن غضروف و اصطکاک دو سر استخوان ها بر روی هم شده و این موضـوع حرکـت را بسـیار دشوار می کند.

تا کنون علت ساخته شدن آنتی بادی هایR.F در بدن بیماران شناخته نشده است اما عواملی که به عنـوان زمینـه ایجـاد بیمـاری یـا تشدید کننده آن مطرح اند عبارتند از :

۱- عامل ژنتیک : وجود آنتی ژنهای سازگاری بافتی مانند HLA-DR4 همراهی نزدیکی با این بیماری دارد. هر چند که ایـن ارتبـاط خیلی قوی نیست ولی به هر حال نقش عامل ژنتیک را نمی توان نادیده گرفت.

۲- عامل هورمونی : نسبت زنان مبتلا به این بیماری در مقایسه با مردان ۳ به ۱ است که این خود نقش عوامل هورمونی بخصوص استروژن را مطرح می نماید.

۳- عامل ویروسی : احتمال شرکت(Epstein Barr Virus(EBV در بروز این بیماری وجود دارد.

۴-تولید IgG غیر طبیعی : در افراد سالم حدود ۱۴٪ مولکول های Ig فاقد قند گالاکتوز در ناحیه FC می باشند ولی این نسبت در افراد مبتلا به RA به ۶۰ ٪ می رسد.لذا اشکال گلیکوزیلاسیون IgG را نیز می توان به عنوان عاملی برای غیر طبیعی بودن IgG و ایجاد Ab علیه آن تصور کرد.

۵- عامل روان تنی : بطور کلی افسردگی ، استرس و ناراحتی های روحی در ایجاد بیماری های خود ایمن از جمله RA نقش دارند. در مورد خانم ها ، غیر از عوامل هورمونی شاید روحیه ظریف ، زودرنجی و حساسیت بیش از حد آنها در ایجاد این بیماری نقش داشته باشد. در چند دهه اخیر مطالعاتی در مورد Psychoneuro endocrine Immunology صورت گرفته ، که مبین تاثیر متقابل سیستم های عصبی ، غدد و ایمنی بر روی هم دیگر است.

۶- عامل تغذیه : بررسی های انجام شده نشان داده است که تظاهرات بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید با خوردن روغن ماهی تخفیف می یابد. روغن ماهی احتمالاً تولید پروستاگلاندینها را کاهش می دهد.پروستاگلاندینها و لوکوترینهای مترشحه از سلولهای التهابی ، نقش عمده ای در ایجاد التهاب دارند. اخیراً با تغذیه از کلاژن تیپ دو (TypeII collagen) مرغ برای کاهش ضایعات آرتریت روماتوئید استفاده می شود. کلاژن تیپ دو ، ماده اصلی غضروف را تشکیل می دهد و بعلاوه در سینوویوم(Synovium) نیز وجود دارد. حدود ۵۰ درصد مبتلایان به آرتریت روماتوئید ، در مایع مفصلی دارای پلاسموسیتهای تولید کننده آنتی بادی ضد کلاژن تیپ دو می باشند. بنظر میرسد که در صورتیکه مقدار و دفعات تغذیه با کلاژن تیپ دو درست انجام شود ، سبب افزایش سلولهای مهار کننده CD8 Ts cell شده و از طریق دهان نسبت به کلاژن تیپ دو ایجاد تحمل(Oral tolerance) می شود.حکمای قدیم ایران نیز احتمالاً خوردن سوپ پای مرغ را بر همین اساس برای درمان بیماران مفصلی تجویز می کردند.

آزمایشات مربوط به بیماری روماتیسم مفصلی :

آزمایشاتی که در این بیماری انجام می شود. شامل R.F است که در حدود ۶۰ تا ۹۰٪ بیماران مثبت می شود و آزمایش CRP که با وخامت بیماری افزایش می یابند.

وجود R.F و افزایش CRP دلیل بر وخامت بیماری است.

روش تشخیص فاکتور روماتوئید (R.F)

: RA-Latex

IgG طبیعی انسان با پیوند اشتراکی به ذرات پلی استیرن (Polystyrene) لاتکس متصل می شود و سپس لاتکس پوشیده شده از Ab طبیعی انسانی در مجاورت سرم فرد بیمار قرار داده می شود. در صورت وجود RF در سرم بیمار ، ذرات لاتکس آگلوتینه می شوند بنابراین اساس تست آگلوتیناسیون غیر مستقیم (Passive agglutination) است.

در روش فوق تنها فاکتور روماتید از کلاس IgMپنتامر را تشخیص داده می شود و تشخیص کلاس های IgE، IgA ، 7S IgM ، IgG به علت عدم قابلیت آنها برای آگلوتیناسیون با روش فوق میسر نیست.امروزه روشهای حساس تری مانند ELISA، RIA ، توربیدیمتری و نفلو متری برای تشخیص و اندازه گیری کمی RF ابداع شده است.

روش انجام آزمایش RF :

الف- روش آزمایش کیفی سریع بر روی لام :

ابتدا سرم بیمار را به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۶ درجه قرار داده تا کمپلمان آن غیر فعال شود. سپس با بافر نمکی گلیسین (PH-8.2) سرم را ۱/۲۰ رقیق می کنیم (0.1ml سرم + 1.9 میلی لیتر بافر) و یک قطره از آن روی لام صفحه مشکی میگذاریم و یک قطره آنتی ژن لاتکس به آن اضافه کرده و مخلوط می نمائیم و نتیجه آگلوتیناسیون را در عرض یک تا حداکثر ۳ دقیقه در زیر نور چراغ مطالعه قرائت می کنیم. نتیجه آگلوتیناسیون مثبت را به صورت $^{+}1$، $^{+}2$ ، $^{+}3$ تا حداکثر $^{+}4$ گزارش می کنیم.

ب- روش آزمایش کمی در لوله :

در اینحالت در لوله اول 0.95 میلی لیتر بافر و در بقیه لوله ها 0.5میلی لیتر بافر اضافه میکنیم. به لوله اول میزان0.05 میلی لیتر(50µl) سرم اضافه می کنیم و بترتیب از لوله اول 0.5 میلی لیتر از مخلوط را تا لوله نهم پاساژ می دهیم و از لوله نهم 0.5^{cc} را به بیرون میریزیم. بعد به تمام لوله ها یک قطره لاتکس اضافه میکنیم ، ۱۵ دقیقه در 37^{oc} نگه می داریم و بعد با دور ۱۰۰۰-۹۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ می کنیم.

Tube test RA-Latex

نکات آزمایش RA :

معمولاً تیترRF کمتر از ۱:۲۰ را منفی ، تیتر ۱:۲۰ تا ۱:۴۰ مشکوک و تیتر ۱:۸۰ و بالاتر را مثبت تلقی می کنند.

۲۰ ٪ از بیماران با روشهای معمول منفی می شوند لذا منفی بودن آزمایش وجود بیماری را نفی نمی کند.

سرم ۴-۱ درصد از افراد با روش لاتکس مثبت کاذب می شوند.

در افراد بالاتر از ۶۵ سال در ۲۰ ٪ موارد و در افراد ۷۵ سال به بالا در ۴۰ ٪ موارد تست RF مثبت می شود که این موضوع احتمالاً به علت اختلال در تنظیم Bcell ها و ایجاد آنتی بادی های مختلف و مهار گسیخته در این افراد می باشد.

در مجموع روش RA-Latex اشکالاتی دارد که بعضی از آنها عبارتند از :

۱- معمولاً فاکتورهای روماتوئید از کلاس های غیر IgM با این روش تشخیص داده نمی شود. بنابراین این روش تقریباً ۲۰٪ افرادی که سرم منفی هستند (Seronegative) را مشخص نمی کند. ضمناً در جوانان مبتلا به juvenile R.A فقط در ۲۵ درصد موارد مثبت می شوند.

۲- ممکن است در ماههای اولیه بیماری فاکتورهای روماتوئید درسرم یافت نشود اما در مایع مفصلی وجود داشته باشد.

۳- در صورتیکه میزان چربی سرم بالا شد و یا سیستم مکمل غیر فعال نشده باشد به ویژه در بالا بودن C_1q که باعث آگلوتیناسیون ذرات لاتکس می شود ، نتیجه آزمایش به صورت کاذب مثبت می شود.

۴- این آزمایش در ۴-۱ درصد افراد طبیعی مثبت می شود ضمن اینکه انجام آزمایش در افراد مسن نیز ممکن است نتایج دقیقی ایجاد نکند.

۵- لازم است وقتی خون کاملاً منعقد شد سرم را جدا کنیم. در غیر اینصورت وجود ذرات فیبرین ، ممکن است ایجاد آگلوتیناسیون کاذب کند. این موضوع در مورد استفاده از پلاسما نیز صدق میکند.

۶- تستRF در بیماری های دیگر البته با تیتر معمولاً پایین تر از آرتریت روماتوئید مثبت می شود. تعدادی از این بیماریها عبارتند از : جذام ، کالاآزار ، شیستوزوما ، سیفلیس ، بیماریهای مزمن کبدی ، لوپوس ، سل و مونو نوکلئوز عفونی.

{ موفق باشید }

تشخیص سرولوژیک پروتئین های فاز حاد

CRP(C – Reactive Protein)

بدنبال بیماریهای التهابی از قبیل روماتیسم مفصلی ، عفونت ها ، ضایعات بافتی (مثل سکته قلبی)، سرطانها و اعمال جراحی ، پروتئین هایی در پلاسما پدیدار میشوند و یا مقدارشان افزایش می یابد که به آنها Acute phase proteins میگویند. موادی که از سلولهای T ، نوتروفیل ها و مونوسیت ها آزاد می شوند مثل P_G ، IL6 ، IL1 ها IFN-γ ، TNF ،و غیره در سنتز این پروتئین ها نقش دارند. مهم ترین سلولهای سازنده این پروتئین ها هپاتوسیت ها هستند که تحت تاثیر سیتوکاین ها بخصوص TNF-α ،IL1 و IL6 این پروتئین ها را می سازند.

جدول زیر تعدادی از این پروتئین ها و میزان افزایش آنها را در التهاب نشان میدهد.

Acute phase protein

Plasma protein	**Extent of increase**
CRP	20 – 1000 fold
Serum Amyloid A	20 – 1000 fold
Protease inhibitor (α_1 antitrypsin)	2 - 5 fold
Fibrinogen	2 - 5 fold
Hapto globulin	2 - 5 fold
Cerulo plsmin	30 – 60%
C3	30 – 60%

تعدادی پروتئین نیز در حالات حاد التهابی کاهش می یابند که به آنها Negative Acute Phase Protein (پروتئین های منفی فاز حاد) می گویند. از جمله اینها آلبومین ، پره آلبومین و ترانسفرین را می توان نام برد.

همانطور که ذکر شد پروتئین های فاز حاد در اثر سیتوکاین ها بخصوص IL_1 و IL6 ایجاد می شوند. معمولاً پروتئین های فاز حاد ظرف ۲ تا ۳ روز کاهش می یابند مگر این که تحریک ادامه یابد و یا واکنش مجدداً تکرار شود.

هرچند پروتئین های فاز حاد غیر اختصاصی هستند اما ارتباطات بین آنها و مراحل مختلف بعضی از بیماریها کاملاً تائید شده است. همچنین در پیگیری روند بعضی از بیماریها و کنترل آنها مثل بیماری های روماتیسمی نقش این پروتئین ها کاملاً مشخص شده است.

CRP(C – Reactive Protein)

این پروتئین در سال ۱۹۳۰ طی تحقیقات فرانسیس (Francis) و تایلت (Tillet) کشف شد. این دو مشاهده نمودند که در سرم افراد مبتلا به پنمونی حاد ، پروتئینی وجود دارد که میتواند با پلی ساکارید کپسول باکتری پنوموکک ایجاد واکنش نماید. به همین دلیل نام این پروتئین را C reactive protein گذاشتند.

این پروتئین در سرم و مایعات افراد سالم به مقدار خیلی کم وجود دارد و به همین دلیل با روش های معمولی قابل اندازه گیری نیست. اما در واکنش های التهابی میزان آن ظرف ۶ تا ۸ ساعت افزایش یافته و ظرف ۴۸ تا ۷۲ ساعت به ۱۰۰۰ برابر و در واقع حدود ۲٪

پروتئین های سرم می رسد. البته سایر پروتئین های فاز حاد مثل هاپتوگلوبولین و سرولو پلاسمین و α_1 antitrypsin قبل از ۱۲ تا ۲۴ ساعت قابل تشخیص نیستند.

سنتز CRP توسط سلولهای کبدی صورت میگیرد و میزان سنتز آن تناسب زیادی با شدت التهاب دارد و با رفع تحریک التهابی به سرعت میزان آن کاهش می یابد.

CRP از نظر آنتی ژنی بسیار قوی است و تزریق آن به حیوان آزمایشگاهی منجر به تولید Ab ضد آن می شود. مقدار نرمال CRP 1μg/ml می باشد. تحقیقات نشان داده است کهCRP از تجمع پلاکت ها ، فعال شدن فاکتور های پلاکتی و خارج شدن سروتونین و بتا گلوکورونیداز از پلاکتها ممانعت می کند. CRP سبب فعال شدن سیستم کلاسیک مکمل نیز می شود. معمولاً دو مولکولCRP برای فعال کردن جزء C_1q در سیستم کمپلمان لازم است. CRP به علت داشتن گیرنده روی سلول های التهابی در اپسونیزاسیون نیز نقش دارد.

CRP در موارد متعددی مانند حالات زیر افزایش می یابد :

۱- تب روماتیسمی فعال : در این بیماری CRP بهترین و حساسترین آزمایشی است که در طول بیماری به طور مداوم مثبت است.

۲- ضایعات بافتی مانند سکته قلبی حاد : CRP با CK-MB تناسب دارد و بلافاصله بعد از سکته قلبی افزایش می یابد. لذا CRP روش مناسبی است که می توان نشانه هایی از نکروز و التهاب قلب را بدست آورد. در صورت منفی بودن CRP آسیب ماهیچه ای در قلب منتفی بوده و احتمالاً سایر بیماریهای قلبی مطرح است.

۳- عفونت های باکتریایی : اگر چه در بعضی از عفونت های ویروسی نیز میزان CRP افزایش می یابد ، اما CRP اکثراً در عفونت های باکتریایی بالا می رود به همین دلیل انجام این تست در CSF برای تفریق مننژیت باکتریایی از مننژیت ویروسی مفید است.

۴- تشخیص شروع رد پیوند کلیه : از ۴ روز قبل از شروع علایم رد پیوند ، آزمایش CRP مثبت می شوند.

۵- تشخیص آپاندیست : امروزه در کنار شمارش گلبول سفید ، تست CRP را برای تشخیص آپاندیسیت با اهمیت می دانند.

۶- بیماریهای روماتیسمی : میزان CRP در بیماریهایی مانند RA زیاد می شود اما در بعضی بیماریها مثل لوپوس (SLE) منفی است.

۸- سرطانهای بدخیم

۹- سل

بعد از اعمال جراحی ، انتقال مقدار زیادی خون ، واکسیناسیون و استفاده از قرص های حاملگی نیز میزانCRP افزایش می یابد.

مزیت آزمایش CRP نسبت به ESR

۱- ممکن است بدون ، وجود التهاب ، (ESR (Erythrocyte sedimentation rate بالا باشد. مثلاً در آنمی ها به علت کاهش تعداد RBC ، در حاملگی به علت افزایش فیبرینوژن و در سندرمهای میلوما به علت افزایش نسبی گلبولین ها (Hyper globulinemia) میزان ESR بدون وجود التهاب بالاست.

۲- گاهی التهاب وجود دارد اما ESR طبیعی است. مثلاً در نارسایی احتقانی (Congestive heart failure) یا گاهی در مراحل اولیه تب روماتیسمی. اما میزان CRP افزایش می یابد.

۳- میزان CRP بعد از درمان واکنش های التهابی فوراً پائین می آید اما این موضوع در مورد ESR صادق نیست.

روش های سرولوژیکی تشخیص CRP :

در گذشته برای تشخیص CRP از پلی ساکارید C پنوموکک استفاده می شد ولی بعلت مشکلاتی که تهیه این آنتی ژن داشت امروزه روشهای دیگری مورد استفاده قرار می گیرد که از بین این روش ها روش لاتکس آگلوتیناسیون در ایران رایج تر است.

آزمایشLatex-CRP

این آزمایش بر اساس Reversed passive agglutination می باشد. برای انجام این آزمایش ، موسسات سازنده کیت های آزمایشگاهی ، ابتدا با تزریقCRP به حیوانات آزمایشگاهی ، آنتی بادی ضد CRPرا بدست می آورند و سپس آنرا به ذرات پلی استیرن لاتکس متصل می کنند. مجاورت سرم حاویCRP با Ab متصل شده به لاتکس ، باعث آگلوتیناسیون می شود.

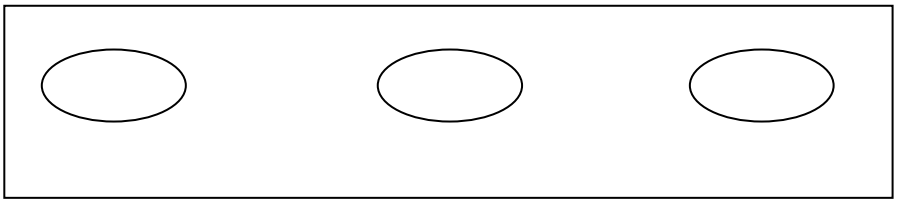
روش کیفی آزمایشLatex- CRP :

قبل از انجام آزمایش ، سرم و جعبه آزمایش را از یخچال بیرون آورده و مدت ۱۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه قرار دهید تا به حرارت محیط برسند. ابتدا سرم را غیر فعال می کنیم (چون مقادیر بالای C_1q می تواند باعث مثبت کاذب شود)

یک اسلاید تیره سه قسمتی برداشته ، روی یک قسمت آن یک قطره کنترل مثبت CRP و روی قسمت دیگر یک قطره کنترل منفی CRPو روی قسمت سوم سرم رقیق شده بیمار را طبق دستور کیت می ریزیم .

سپس شیشه محتوی لاتکس CRP را به آرامی تکان می دهیم تا بصورت محلول یکنواخت در آید. سپس به هر سه خانه یک قطره لاتکس CRP اضافه می کنیم. با اپلیکاتورهای جداگانه هر کدام را مخلوط کرده و به اندازه دایره ای به قطر ۲/۵ سانتی متر بر روی لام پهن می کنیم. سپس به مدت ۳-۲ دقیقه لام را حرکت دورانی می دهیم و نتیجه را از نظر آگلوتیناسیون زیر نور چراغ مطالعه بررسی می کنیم. کنترل مثبت و منفی ، سالم بودن کیت و انجام درست آزمایش را تائید می کنند.

لاتکس CRP + سرم رقیق شده بیمار لاتکسCRP +کنترل منفی لاتکس CRP + یک قطره کنترل مثبت



روش کمی آزمایش :

مثبت شدن نتیجه تست به روش بالا مبین وجود پروتئین CRP است که برای تعیین مقدار آن بایستی روش کمی را انجام دهیم. در کیت های مختلف روشهای مختلفی ذکر شده است. در کیت هایی که در مرحله اول بایستی سرم بیمار ۱/۲۰ رقیق شود ($۰,۱^{cc}$ سرم + $۱,۹^{cc}$ بافریا سیلین) از همین تیوپ بعنوان لوله ۱ در روش کمی استفاده می کنیم. سپس چند لوله دیگر را شماره زده و در هر کدام ^{cc} ۰/۵بافر سیلین می ریزیم. سپس از لوله ۱ ، ^{cc}۰/۵ سرم ۱/۲۰ رقیق شده برداشته و به تیوپ ۲ اضافه می کنیم و خوب مخلوط کرده مقدار ^{cc}۰/۵ به لوله ۳ انتقال داده و تا لوله آخر این عمل را تکرار می کنیم.(لوله آخر بعنوان کنترل منفی است و سرم ندارد) سپس یک اسلاید شش قسمتی برداشته و به ترتیب از لوله ۲ الی آخر (چون آزمایش لوله ۱ قبلاً انجام شده بود) به ترتیب یک قطره برداشته و روی هر خانه میریزیم. سپس به هر کدام یک قطره لاتکسCRP اضافه می کنیم و مخلوط کرده بعد از ۳-۲ دقیقه زیر نور چراغ مطالعه از نظر آگلوتیناسیون بررسی می کنیم. آخرین رقتی که معادل ۲+ آگلوتیناسیون داد تیترCRP بیمار است.

شماره تیوب	1	2	3	4	5	6	7
بافر (سیلین)	1.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
سرم	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
ضریب رقت	$^1/_{20}$	$^1/_{40}$	$^1/_{80}$	$^1/_{160}$	$^1/_{320}$	$^1/_{640}$	-

نکته مهم :

در کیت های مختلف ذکر شده است که هر تیتر معادل چه مقدار CRP بر حسب میکروگرم در میلی لیتر است که این مقدار را باید گزارش کرد. مثلاً در یک نوع کیت ذکر شده است که رقت ۱/۲۰ معادل ۵ µg/ml است پس اگر تیتر بدست آمده برای بیماری ۱/۸۰ بود، برای این بیمار میزان CRPرا بصورت زیر گزارش می کنیم: CRP (µg/ml) = 20

نکاتی درباره آزمایشCRP-Latex :

۱- بهتر است از سرم غیر فعال شده برای آزمایش CRP استفاده شود زیرا بالا بودن میزان فاکتور C_1q در سرم ممکن است ایجاد مثبت کاذب نماید.

۲- بالا بودن چربی سرم (Lipemic serum) و وجود فاکتور روماتوئید زیاد در سرم ، سبب مثبت شدن کاذب آزمایش شود.

۳- اگر از پلاسما برای تستCRP استفاده شود ، فیبرینوژن موجود در آن میتواند روی ذرات لاتکس اثر گذاشته و آگلوتیناسیون غیر اختصاصی بدهد. همین مسئله برای خونی که کاملاً منعقد نشده و سرم آن جدا شده هم صورت میگیرد.

نکات آزمایش CRP:

معمولاً تیتر ۱/۲۰ و پائین تر برای CRP ارزش بالینی ندارد اما تیتر بالاتر برای بیمار مهم هستند. تیتر آزمایش CRP-Latex در روش کمی جهت کنترل درمان اهمیت دارد زیرا مقدار CRP با شدت التهاب نسبت مستقیم دارد. نتیجه مثبت کاذب در آزمایش CRP بر خلاف ESR(Erythrocyte sedimentation rate) که گاهی در حالات فیزیو لوژیک نیز غیر طبیعی است ، بسیار نادر است.

{موفق باشید}

تشخیص سرولوژیک حاملگی

Pregnancy Test

متداولترین ، ارزانترین و سریع ترین راه تشخیص حاملگی پیدا کردن هورمون گونادوتروپین جفتی انسان (hCG: human Chorionic Gonadotropin) در ادرار (Urine) و یا در خون با روشهای سرولوژی می باشد . به دنبال لقاح و تشکیل زیگوت ، هورمون hCG از سلولهای ترفوبلاست ترشح می شود که عمل اصلی این هورمون نگهداری جسم زرد است . با تشکیل سلول تخم و ترشح هورمون hCG ، رحم آماده لانه گزینی سلول تخم میشود . hCG گلیکو پروتئینی است که از دو زنجیره α و β تشکیل شده است که توسط سه پیوند غیر اشتراکی بهم متصل اند . زنجیره آلفا (α- hCG) توسط یک ژن بر روی کروموزوم ۶ کد می شود که در ساختمان سه هورمون هیپوفیزی FSH،LH و نیز TSH مشترک است اما خاصیت بیولوژیکی و عمل اصلی این هورمون بخاطر زنجیره β(β-hCG) آن می باشد . این زنجیره توسط ۷ ژن بر روی کروموزم ۱۹ کد می شود . ۳۰۰اسید آمینه ناحیه کربوسیل انتهایی (C-terminal) زنجیره β منحصر بفرد و آنتی ژنتیک است . برای اینکه تشخیص حاملگی بطور اختصاصی انجام شود و سایر هورمونها خصوصاً LH بر آن تاثیر نداشته باشد ازAb زنجیرهβاستفاده می شود .

در یک دوره حاملگی بیشتر از ۹۰٪ مولکولهای hCG در سرم بصورت ساختمانی کامل و مقدار بسیار جزئی بصورت زنجیره های آزاد آلفا و بتا و هم چنین قطعات خرد شده است . نسبت زنجیره های آزاد و قطعات شکسته شده hCG به مولکولهای کامل در ادرار بیشتر از سرم است . در سه ماهه اول بارداری نسبت زنجیره بتا و در سه ماهه دوم و سوم بارداری ، نسبت زنجیره های آلفا بیشتر می باشد .

میزان هورمون hCG ۳ تا۵ روز بعد از عقب افتادن عادات ماهانه در ادرار به $^{mIU}/_{ml}$ 300-500 می رسد. مقدار هورمون به سرعت افزایش می یابد . بطوریکه در هفته ۱۰- ۸حاملگی به ماکزیمم مقدار خودش می رسد و در حدود $^{mlU}/_{ml}$ 100000می شود و سپس حدود هفته شانزدهم حاملگی کاهش یافته و تا انتهای حاملگی در یک حد تقریباً ثابت ($^{mIU}/_{ml}$ 10/000 – 20000) باقی می ماند . حدود دو هفته بعد از زایمان مقدار هورمون کاهش یافته و به صفرمی رسد . در صورتیکه سقط عمدی یا خود به خود صورت بگیرد مقدار زمان طولانی تری طول می کشد تا هورمون مقدارش صفر شود . چنانچه از هفته ۱۶ حاملگی مقدار هورمون کاهش پیدا نکرد و یا چنانچه سه ماه پس از وضع حمل و یا سقط جنین میزان hCG در ادرار کاهش پیدا نکند ، احتمالاً بیماریهای ترفوبلاستیک وجود دارد .

روشهای تشخیص هورمون hCG در ادرار(Urine) و خون:

۱- Reversed Passive Latex agglutination test

۲- Passive Latex agglutination inhibition test

۳-ELISA(الیزا)

۴- RIA(Radioimmunoassay)

از بین این روشها، بیشترین درجه حساسیت را روش RIA و بعد از آن ELISA دارد . در روشهای لاتکس که امروزه بنام کیت آزمون خانگی(Home test kit) معروف هستند ، درجه حساسیت بستگی به نوعAb ضد hCG دارد .

اساس آزمایش حاملگی به روش Reversed Passive Latex agglutination:

در این روش Ab ضد hCG به ذرات لاتکس متصل می شود و در مجاورت با ادرار قرار میگیرد . در صورت وجود هورمون β-hCG در ادرار ، آگلوتیناسیون تشکیل می شود . از آنجائیکه در این روش ذرات لاتکس توسط Ab ضدhCG پوشیده شده اند ، به این روش Reversed Passive Latex agglutination گفته می شود .

اساس آزمایش حاملگی به روش Passive Latex agglutination inhibition :

این روش بصورت دو مرحله ای انجام می شود . ابتدا مقدار معینی از ادرار مشکوک را با آنتی بادی اختصاصی ضد هورمون hCG مخلوط می کنند و سپس به آن ذرات لاتکس که از هورمون پوشیده شده است اضافه می کنند . اگر در ادرارhCG وجود داشته باشد ، به Ab اختصاصی متصل می شود . از آنجایی که hCG محلول است و کمپلکس آن با Ab بصورت ذرات بسیار ریز پرسیپیتاسیون می باشد بنابر این با چشم دیده نمی شود و در مرحله دوم که ذرات لاتکس پوشید شده از hCG به این کمپلکس اضافه می شود بعلت نبودن Ab اختصاصی، آگلوتیناسیون ایجاد نمی شود . از طرف دیگر در صورتی که ادرار فاقدhCG باشد، Ab اختصاصی در این مرحله آزاد باقی مانده و در مرحله بعد با ذرات لاتکس پوشیده با hCG آگلوتیناسیون تشکیل می شود . بنابراین چنانکه آگلوتیناسیون مشاده **نشود** ، آزمایش مثبت و زن باردار (Pregnant) است ولی در صورت مشاهده آگلوتیناسیون ، آزمایش منفی تلقی می شود و برای تائید آن باید آزمایش را پس از مدتی تکرار کرد .

روش انجام تست حاملگی به روش Passive Latex agglutination inhibition :

یک قطره ادرار را روی لام زمینه سیاه ریخته ، سپس یک قطره محلول anti -β.hCG به آن اضافه کنید. حدود ۳۰ ثانیه با اپلیکاتور قطرات فوق را مخلوط کنید . سپس یک قطره لاتکس به آن اضافه نموده و بعد از مخلوط نمودن با اپلیکتور به مدت ۲ دقیقه لام را حرکت دورانی داده و نتیجه را از نظر عدم آگلوتیناسیون بررسی نمائید .در صورت مشاهده آگلوتیناسیون جواب آزمایش منفی است و در صورتی که آگلوتیناسیون مشاهده نشود جواب مثبت است .

روش اندازه گیری نیمه کمی هورمون hCG در ادرار ۲۴ ساعته :

۱- حجم ادرار ۲۴ ساعته را محاسبه نمائید .

۲- ادرار جمع آوری شده را بخوبی مخلوط نموده نمونه ای از آن بردارید . حال این نمونه را بطور سری با سیلین در لوله های آزمایش با تیتر $^1/_8$ ، $^1/_4$ ، $^1/$ رقیق کنید (توضیح در جدول زیر آمده است .)

۳- یک قطره از هر لوله آزمایش را برداشته و مطابق روش کیفی عدم یا وجود hCG را بررسی کنید .

۴- آخرین لوله ای که آگلوتیناسیون در آن دیده نشود مثبت گزارش می شود و تیتر هورمونhCG ادرار می باشد .

۵- مقدارhCG در ادرار ۲۴ ساعته از این فرمول محاسبه می شود : $V \times D \times S$ = مقدار hCG در ادرار ۲۴ ساعته

V= حجم ادرار ۲۴ ساعته D = مخرج کسر تیتر هورمون S = حساسیت مواد که در بروشور هر کیت نوشته شده است

موارد مثبت کاذب (False positive)در تست Pregnancy

۱- افراد یائسه بخاطر بالا بودن میزان LH

۲- در خانم های جوان در اواسط دوران قاعدگی (بعلت افزایش LH)

۳- مصرف داروهایی مثل پرومتازین ، فنوتیازین که اینها باعث افزایش LH می شوند .

۴- بالا بودن پروتئین های ادراری (Proteinuria) ، وجود RBC در Urine (Hematuria) و وجود Hb در سرم

۵- مصرف داروهای مسکن مثل ساسیلاتها که که مانع آگلوتیناسیون لاتکس می شوند .

- **موارد منفی کاذب(False Negative) در تست Pregnancy** :

۱- ابتدای حاملگی به علت کم بودن hCG در نمونه

۲- رقیق بودن ادرار بعلت مصرف زیاد مایعات **(موفق باشید)**

تشخیص سرولوژیک بیماریهای استرپتوکوکی

Diagnosis of streptococcal infection (ASO)

باکتری های استرپتوک گروه A که به استرپتوکوکهای چرکزا (Pyogenes)معروفند در انسان ایجاد بیماریهایی از قبیل عفونت گلو(Pharyngitis) و عفونت پوست (Impitigo)و مخملک (Scarlet fever) می کنند . محل زندگی این باکتری فقط در انسان می باشد به همین دلیل این میکروب در نتیجه تماس مستقیم بین افراد منتقل می شود . عفونتهای استرپتوکوکی بیشتر در طبقات پایین جامعه که شرایط بهداشتی خوبی ندارند و در نقاطی که تراکم جمعیت وجود دارد بصورت همه گیری (اپیدمی) دیده می شوند . کودکان بین ۵ تا ۱۵ سال بیشتر در معرض این باکتری می باشند .

بیماریهایی که بعد از عفونت با استرپتوکوک گروه A ایجاد می شوند شامل تب روماتیسمی (Rheumatic fever) و گلومرولونفریت حاد پس از عفونت استرپتوکوکی (Acute post –streptococcal glomerulonephritis) می باشند. به نظر می رسد علت ایجاد این دو عارضه تشابه آنتی ژنی بین آنتی ژنهای باکتری و برخی از آنتی ژنهای بافتهای میزبان می باشد . برای مثال گلیکوپروتئین های دریچه قلب انسان با کربوهیدرات گروه A استرپتوکوک (N-acetyl – glucosamine) تشابه آنتی ژنی (Cross reaction) دارد در نتیجه Ab هایی که علیه این کربوهیدرات باکتری تولید می شود می تواند موجب کاردیت (Carditis) در فرد شود . مکانیسم ایمنولوژیک ضایعه قلبی کاردیت از نوع ازدیاد حساسیت نوع دو (Type II) می باشد. البته در سالهای اخیر نشان داده اند که در ضایعات قلبی مبتلایان به تب روماتیسمی ازدیاد حساسیت تایپ چهار (Type IV)نیز شرکت دراد که بعلت وجود پروتئین M استرپتوکوکی است که دارای خاصیت میتوژنی بسیار قوی برای سلولهای T انسانی می باشد. بنابراین احتمالا این پروتئین نیز نقش بسیار مهمی در ضایعات اتو ایمنی در قلب و یا مفاصل دارد .

در تب روماتیسمی ، التهاب مفاصل (Poly arthritis) نیز ممکن است بعلت واکنش ازدیاد حساسیت نوع سه(Type III) ظاهر شود بطوری که درباره تب روماتیسمی گفته شده است:

تب روماتیسمی مفاصل را میلیسد ولی قلب را گاز می گیرد (Licks the join but bites the heart)..

در کمتر از ده درصد از مبتلایان به تب روماتیسمی مزمن عوارض عصبی بروز میکند که بنام داءالرقص سنت ویتوس (St.vitas dance) و کره سیدنهام(Sydenhan' s chorea) قلمداد شده است و علت آن تشابه آنتی ژنی استرپتوکوک گروه A با سیتوپلاسم سلولهای تحت تالاموس (Subthalamus)و نورونهای قاعده نیمکره های مغز (Caudate nucieasneur) بوده که موجب تظاهرات عصبی کره (حرکات سریع غیر ارادی ، ضعف عضلانی ، اضطراب و پریشانی) می شود .

بنظر میرسد که بروز تب روماتیسمی با ژنهای HLA- DR7, HLA-DR4, HLA-DR2 در ارتباط باشد .

دو تا سه درصد از عفونتهای استرپتوکوکی گلو (Pharyngitis) منجر به تب روماتیسمی می شود (که حدود ۲۰ روز بعد خود را نشان می دهد) . ۵-۲ درصد از بیماران مبتلا به عفونت های استرپتوکوکی گلو (Pharyngitis) وپوست (Impetigo و Scarlet fever) بعد از چند هفته مبتلا به گلومورولونفریت می شوند. بنابراین در سرم اکثر افراد مبتلا به تب روماتیسمی و گلومورولونفریت حاد استرپتوکوکی ، آنتی بادی علیه های Ag های استرپتوکوکی دیده می شود .

اکثر سوش های استرپتوکوک دو نوع سم استرپتولیزین "S" و استرپتولیزین "O" را ترشح می کنند که خاصیت آنزیمی دارند و قادرند گلبولهای قرمز پستانداران را لیز کنند . استرپتو لیزین " O " ایمنولوژیک بوده و در مقابل اکسیژن ناپایدار است . در حالیکه استرپتولیزین" S" غیر ایمنولوژیک بوده و در مقابل اکسیژن پایدار است .

از آنجا که در زمان بروز عوارض تب روماتیسمی و گلومرولونفریت تعداد باکتری در بدن کم می شود، کشت گلو معمولاً منفی است بنابراین برای تشخیص عفونت حاد استرپتوکوکی و ارتباط آن با عوارض فوق بهترین روش تشخیص سرولوژی است . در عفونت با استرپتوکوک ، علیه آنزیم ها و سم های مختلف باکتری Ab تولید می شود که در بین آنها متداولترین Ab یی که بررسی می شود ASO(Anti Streptolysin O) و Anti Dnase B است . بدنبال عفونت استرپتوکوکی بعد از۳-۲ هفته ASO ایجاد می شود . در هفته های ۵-۳ میزان آن به ماکزیمم میرسد و پس از بهبودی فرد (۸-۱۰ هفته بعد) مقدارش در سرم کاهش می یابد . در صورتیکه فرد به عوارض بعد از عفونت مبتلا شود ، تیتر ASO ممکن است برای چند ماه بالا باقی بماند .

تشخیص آزمایشگاهی :

۱- تشخیص آزمایشگاهی تب روماتیسمی شامل دو دسته آزمایش می باشد .

الف) آزمایشهای که برای تشخیص التهاب بکار میروند مانند CRP و ESR (سرعت رسوب گلبولهای قرمز)

ب) آزمایشات مشخص کننده Ab علیه Ag های استرپتوکوک در سرم مانند اندازه گیری تیتر آنتی – استرپتولیزینO(ASO)

۲- تشخیص آزمایشگاهی گلومرولونفریت حاد را میتوان به سه دسته تقسیم نمود :

الف) جستجوی پروتئین های فاز حاد مانند CRP در سرم و ESR در خون .

ب)آزمایشهای مشخص دهنده Ab بر ضد Agهای استرپتوکوک در سرم مانندASO و اندازه گیری تیتر آنتی – دزوکسی ریبونوکلئاز " بی "(anti –Dnase –B)

ج) کشت و آزمایش کامل ادرار که معمولاً حدود ۷۰ درصد موارد پروتئین (Protenurea) و خون قابل رویت با چشم غیر مسلح (Gross hematuria) در ادرار دیده می شود .

از بین آزمایشهایی که برای اندازه گیری Ab ضد Agهای استرپتوکوک صورت میگیرد دو آزمایش ASO و anti-Dnase از بقیه متداول تر هستند .

انواع روش های آزمایش ASO:

الف) روش آگلوتیناسیون روی لام:

اساس واکنش در این تست Passive Agglutination می باشد . در این روش Ag های SLO بـر روی ذرات لاتکـس چسـبانده می شوند و سپس در مجاورت سرم قرار میگیرند . در صورت وجود آنتی بادی اختصاصـی ضـد SLO در خـون بیمـار ، ذرات لاتکـس آگلوتینه می شوند .

ب) روش میکرو (در ظرف مخصوص میکروتیتراسیون)

ج) روش ماکرو (در لوله آزمایش)

این دو نوع آزمایش(ب و ج) بر اساس آزمایشهای خنثی سازی آنزیم (Enzyme neutralization) می باشند . درمرحلـه اول آنتـی ژن SLO (که در کیت موجود اسـت) بـا سـرم ترکیـب مـی شـود . درصـورت وجـود آنتـی اسـترپتولیزین " O " در سـرم بیمـار ، استرپتولیزین " O" خنثی می شود . در مرحله دوم گلبولهای قرمز خون به ترکیب فوق افزوده می شـود . در صـورتیکهSLO توسـط Ab خنثی شده باشد قادر به لیز گلبولهای قرمز نیست . در نتیجه عدم همولیز مبنی بر وجود ASO در سرم اسـت . آخـرین رقـت از سرم که همولیز مشاهده **نمی شود** به عنوان تیتر ASO در نظر گرفته می شود .

روش اندازه گیری آنتی استرپتولیزین " O " به روش ماکرو :

وسایل و مواد لازم :

لوله آزمایش با دو اندازه مختلف (۱- لوله هایی به قطر و طول ۱۱۰×۱۶ میلی لیتر ، سه عدد برای هر بیمار ۲- لوله هـایی بـه قطـر ۱۰۰×۱۳ میلی لیتر ، ۱۴ عدد برای هر بیمار)، بن ماری، سانتریفیوژ، پی پت در اندازه های مختلـف، بـافر ASO ، گلبولهـای قرمـز خرگوش یا گلبولهای قرمز انسان با گروه خونی O ، استرپتولیزین O، کنترل مثبت و سرم بیمار

بافر ASO را میتوانیم مطابق دستور زیر تهیه کنیم و یا از شرکت های تجاری خریداری کنیم :

۱- فسفات منوپتاسیم ۲ - فسفات دی سدیم ۳- نمک طعام

نمک های فوق را در آب مقطر حل نموده حجم را به یک لیتر می رسانیم سپس PH بافر را توسط سود (NaOH) در محـدوده-6.5 6.7 تنظیم می نماییم . این بافر تا زمانی که آلوده نشده است قابل مصرف است .

استرپتولیزین"O" توسط موسسات مختلف از کشت استرپتوکوک گروه A تهیه میشود که بصورت پودر لیوفیلیزه بوده و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد بایستی نگهداری شود . بعلاوه نباید تا قبل از مصرف ، این پودر را بصـورت مـایع در آورد زیـرا در اینصـورت اکسـید شده و خاصیت آنزیمی خود را از دست می دهد . برای حل کردن این پودر در آب مقطر شیشه را چند بار به آرامی حرکت داده تا پودر حل شود محلول SLO حداکثر باید در مدت زمان بیست دقیقه مصرف شود .

وجود ذرات چربی در سرم بیمار باعث خنثی شدن SLO می شوند . همچنین سرم بیمار نبایستی لیز شده باشد زیـرا بـه علـت رنـگ قرمزی که ایجاد می کند در خواندن آزمایش ممکن است اشتباه شود . بهتر است که سرم تازه باشد و کمپلمان آن نیزغیر فعال گردد .

روش انجام آزمایش ASO به روش ماکرو :

برای تهیه رقت ها مختلف سرم میتوان بطریق زیر عمل کرد :

از سرم بیمار رقت های ۱/۱۰ ، ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ را ایجاد می کنیم :

بافر 4.5cc + سرم بیمار 0.5cc ۱/۱۰

بافر 9cc + سرم۱/۱۰ رقیق شده بیمار 1cc ۱/۱۰۰

بافر 0.8cc + سرم۱/۱۰۰ رقیق شده بیمار 0.2cc ۱/۵۰۰

در روش دیگری از سرم رقت های ۱/۵۰ و ۱/۱۵۰ را ایجاد می کنند (که روش انجام آزمایش ما همین است)

بافر 4.9cc + سرم بیمار 0.1cc ۱/۵۰

بافر 2cc + سرم ۱/۵۰ رقیق شده 1cc ۱/۱۵۰

سپس بطریق زیر عمل می کنیم :

- برای هر بیمار ۱۴ لوله در جا لوله ای قرار می دهیم.
- مطابق جدول به لوله های ۱ تا ۱۲ مقادیر مختلفی از رقت های ۱:۱۰ ، ۱:۱۰۰ و ۱:۵۰۰ از سرم بیمار اضافه می کنیم و حجم محلول های هر لوله را با بافر SLO به حجم 1CC. می رسانیم. دو لوله آخر را به عنوان کنترل های مثبت و منفی در نظر می گیریم.
- به هر لوله مقدار 0.5 cc از محلول Slo اضافه می کنیم.
- پس از تکان دادن لوله ها، آنها را به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه قرار می دهیم.
- به هر لوله 0.5cc از سوسپانسیون گلبول های قرمز ۵ درصد اضافه می کنیم.
- لوله ها را تکان می دهیم و مدت ۴۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه قرار می دهیم. هر ۱۵ دقیقه یکبار لوله ها را تکان می دهیم.
- لوله ها را به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۵۰۰ سانترفیوژ می کنیم.
- رقیق ترین لوله ای که کاملاً فاقد همولیز است تیتر ASO بیمار می باشد که آن را با واحد تاد یا IU نشان می دهند .

نکات آزمایش ASO :

تیتر ASO با واحد تاد (Todds unit) یا واحد بین المللی (IU) بیان می شود .

واحد تاد عبارتست از عکس بالاترین رقت سرم که مانع از عمل همولیز کامل گلبولهای قرمز توسط استرپتولیزین(SLO) می شود . اگر مقدارSLO بر حسب استاندارد تاد تنظیم شده باشد واحد تاد و اگر بر حسب استانداردسازمان بهداشت جهانی تنظیم شده باشد واحد IU بکار برده می شود .

میزان نرمال ASO در جوامع مختلف متفاوت است و هر چه سطح بهداشت در جامعه بالاتر باشد تیتر پایه ASO پایین تر است . از نظر سن در افرادی که سیستم ایمنی قوی تری دارد مانند جوانان ، تیتر بالاتر است و در افراد مسن با تیتر پائین تر ASO مواجه می

شویم . در سنین دبستان بخاطر اینکه بچه ها تماس زیادی با هم دارند تیتر زمینه بالاتر است اما بطور کلی تیتر نرمال ASO در بزرگسالان Todds ۲۰۰ و در کودکان Todds ۳۳۳ است ..

تیتر بالای ASO به تنهایی دلیل بر تب روماتیسمی (Rheumatoid fever)و یا گلومرولونفریت حاد پس از عفونت استرپتوکوکی نیست و فقط نشان دهنده عفونت اخیر استرپتوکوکی است . برای تشخیص تب روماتیسمی علاوه بر بالا بودن تیتر ASO که نشان دهنده ابتلا اخیر بیمار به باکتری استرپتوکوک است. بایستی آن را با معیارهای اصلاح شده جونز(Modified Jones Criteria) نیز مقایسه کرد .

دو معیار Major (اصلی) یا یک معیار اصلی به همراه دو معیار فرعی (Minor) به علاوه مدارکی که نشان دهنده عفونت اخیر استرپتوکوکی باشد(مثل ASO مثبت) می تواند نشان دهنده RF (تب روماتیسمی) باشد .

Major Criteria :	**Minor Criteria**
Carditis	fever
Polyarthritis migratory	Arthralgia
Chorea	ESR or positive CRP
Erythmea marginatum	Prolonged PR interval

برای تشخیص گلومرولونفریت حاد استرپتوکوکی نیز علاوه بر بالا بودن تیتر ASO که نشان دهنده ابتلا اخیر به باکتری استرپتوکوک است می بایست علایم دیگر گلومرولونفریت مانند : کم ادراری (Oliguria) افزایش ناگهانی فشارخون (sudden hyper tension) و ادم (Edema) نیز وجود داشته باشد .

در ۲۰-۱۰ درصد مواردی که شخص به تب روماتیسمی مبتلا می شود ASO مثبت نیست و همچنین در افرادی که دچار گلومرولونفریت حاد پس از عفونت استرپتوکوکی می شوند درصد بالاتری از موارد منفی دیده می شود که در این حالت بهتر است آزمایش Anti- DNASe B انجام شود { موفق باشید }

تشخیص سرولوژیک سیفلیس

عامل بیماری سیفلیس میکرب اسپیروکت ترپونما پالیدیوم (Treponema pallidum) می باشد . انسان تنها میزبان طبیعی این میکروب است .این میکروب قابل کشت در محیطهای مصنوعی نیست و بنابراین تریپونما پالیدیوم را با تزریق در بیضه خرگوش تکثیر داده و نگهداری می کنند . سرایت این بیماری در نود درصد موارد از راه تماس جنسی است ولی میکروب می تواند از راه تماس پوست و یا مخاط در صورتی که لایه اپیتلیال صدمه دیده باشد با یک زخم سیفیلیسی نیز وارد بدن شود و ایجاد بیماری نماید . علاوه بر موارد ذکر شده ، ترپونما پس از ماه چهارم حاملگی قادر است از جفت عبور نموده و به جنین سرایت کند که در نتیجه باعث سقط جنین می شود . در صورتی که اواخر حاملگی و یا هنگام زایمان جنین مبتلا شود ، بیماری سیر خود را در نوزاد طی خواهد نمود .

ترپونماهای غیر بیماریزا در طبیعت فراوان دیده می شوند . این دسته ترپونماها قسمتی از فلور طبیعی میکروبهای دهان ، دستگاه گوارش ، برونشها و مجرای ادراری را تشکیل می دهند . این دسته اسپیروکتهای غیر بیماریزا از لحاظ ساختمان آنتی ژنی با سوشهای بیماریزا تشابه آنتی ژنی دارند.

بیماری سیفلیس را به سه مرحله تقسیم نموده اند .

مرحله اولیه (Primary) سیفیلیس :

دوره نهفتگی بیماری سیفیلیس بطور متوسط ۲۱ روز می باشد . پس از این دوره در محل ورود میکروب به بدن یک زخم ایجاد می شود که معمولاً منفرد است و به آن شانکر سفت (Hard chancer) می گویند . زخم شانکر در ۹۵ درصد موارد در نواحی تناسلی ظاهر می شود . پس از ورود میکروب ترپونما پالیدوم به بدن ، در عرض چند ساعت از طریق خون و لنف در سرتاسر بدن منتشر می شود و از روز سوم بیماری سیفیلیس از راه خون سرایت می کند . در این بیماران غدد لنفاوی نزدیک به شانکر بعلت مهاجرت اسپروکتهای ترپونما به آنها متورم ، بزرگ و سفت می شوند ولی فاقد درد هستند و در اصطلاح به آنها خیارک (Bubo) می گویند . زخمهای سیفیلیسی پس از یک تا پنج هفته خودبخود خوب می شوند . احتمال ابتلا به بیماری در نتیجه ارتباط مستقیم و یا مقاربت با شخص مبتلا به سیفیلیس در مرحله اول بیماری ، ۳۰ تا ۵۰ درصد است . زنان باردار مبتلا به سیفیلیس نیز در این مرحله قادرند بیماری را به جنین منتقل نمایند .

مرحله ثانویه (Secondary) سیفیلیس :

مرحله دوم بیماری سیفیلیس معمولاً در عرض شش هفته تا شش ماه پس از ورود میکروب ترپونما پالیدوم به بدن آغاز می شود و حدود چند روز تا یکسال و حتی چند سال ممکن است ادامه یابد . در طول دو سال اول بیماری ، مرحله دوم سیفیلیس ممکن است چند بار رجعت (Relapse) نماید . از مشخصات این مرحله بیماری بثورات جلدی و مخاطی ، کسالت و بی اشتهایی ، تب ، آلوپسی (ریزش مو در قسمتهایی از سر و ابرو) و لکه هائی در مخاط دهان می باشد . در این مرحله میکروب ترپونما ممکن است در ضایعات جلدی و مخاطی وجود داشته باشد و در نتیجه تماس مستقیم ، امکان سرایت بیماری به دیگران وجود دارد .

پس از کاهش علائم سیفیلیس ثانویه ، مدت زمانی طول می کشد تا مرحله سوم بیماری سیفیلیس ظاهر شود . این مرحله را بنام سیفیلیس نهفته (Latent) می نامند . در این مرحله هیچگونه علائم بالینی دیده نمی شود و ممکن است یک تا چهل سال طول بکشد . اگر چه در این مرحله ، بیماری از طریق تماس مستقیم سرایت نمی کند ولی بیماری از طریق مقاربت ممکن است سرایت نماید . بعلاوه در طول این دوره ، عفونت از مادر به جنین نیز منتقل می شود .

مرحله سوم (Tertiary or late latent) سیفیلیس :

مرحله سوم سیفیلیس حدود دو تا سی سال بعد از ورود میکروب به بدن ظهور و فقط در یک سوم بیماران مبتلا به سیفیلیس دیده می شود . از بین بیمارانی که وارد مرحلهٔ سوم می شوند ، حدود بیست درصد مبتلا به ضایعات عصبی سیفیلیس (Neurosyphilis) سی درصد مبتلا به ضایعات قلبی عروقی (Cardiovascular syphilis) و پنجاه درصد مبتلا به تومور که به آن گوما (Gumma) می گویند ، می شوند . در بعضی از بیماران نیز ممکن است چند نوع ضایعه با هم دیده شود . ضایعات " گوما " احتمالاً در نتیجه واکنشهای ایمنی سلولی(Cell mediated reaction) نسبت به میکروب است و در نقاط مختلف بدن از قبیل مغز ،کبد ، استخوان و پوست ممکن است ظهور کند . در این مرحله ، بیماری مسری نیست ولی از مادر به جنین منتقل می شود .

لازم به ذکر است که در سیفیلیس مادرزادی ، مرحله اول سیفیلیس دیده نمی شود ولی سایر مراحل بیماری در نوزاد سیر خود را طی می کند . در بیماری سیفیلیس با اینکه آنتی بادی بر ضد ترپونماپالیدم ایجاد می شود ولی هیچگونه مصونیت سرمی یا هومورال (Humoral) و یا مصونیت سلولی (Cellular) دیده نمی شود و شخص ممکن است چندین بار به این بیماری مبتلا شود .

آزمایش های سرولوژی برای تشخیص بیماری سیفیلیس

واکنش ایمنی هومورال (Humoral immunity)در سیفلیس منجر به ظهور سه نوع آنتی بادی در سرم بیمار می شود :

۱- آنتی بادی غیر اختصاصی سیفیلیسی بنام راژین (Syphilitic reaginic antibody)

۲- آنتی بادی غیر اختصاصی ضد میکروبهای گروه ترپونما (Group treponemal antibody)

۳- آنتی بادی اختصاصی ضد ترپونما پالیدم (Specific treponemal antibody)

۱- آنتی بادی غیر اختصاصی راژین سیفیلیسی(Syphilitic reaginic antibody)

در بیماران مبتلا به سیفیلیس ، تولید نوعی آنتی بادی می شود که قادر است بطور غیر اختصاصی به فسفو لیپیدهای بسیاری از بافتها مانند کاردیولیپین(Cardiolipin) قلب گاو متصل شود . این آنتی بادی را در اصطلاح آنتی بادی راژین سیفیلیسی ، آنتی لیپوئیدال (Antilipoidal) و آنتی بادی واسرمن(Wasserman) می گویند و از کلاسهایIgM و گاهی IgG می باشد . بعضی عقیده دارند که راژین در حقیقت یک نوع اتو آنتی بادی بر علیه لیپیدهائی است که در نتیجه ضایعات بافتی ، در بیماریهای مختلف سیستمیک تولید می شود . آنتی بادی راژین در سیفیلیس هیچ تشابه و ربطی با آنتی بادی راژین در بیماریهای آلرژی فوری و آنافیلاکسی ندارد . بنظر می رسد که این آنتی بادی بر ضد غشاء میتوکندری سلولها می باشد و در نتیجه صدمات میکروبی به بافتها ، سیستم ایمنی بدن آنرا سنتز می کند . بنابراین جای تعجب نیست که آنتی بادی راژین در بیماریهای دیگر غیر ترپونمائی نیز ممکن است در سرم ظهور کند . آزمایشهای سرولوژی برای تشخیص راژین متعدد می باشند و به آنها آزمایشهای گروه بیماریهای غیر ترپونمائی می گویند . مانند آزمایشهای Venereal Disease Research Laboratory , Rapid Plasma Reagin(RPR) (VDRL). مزیت آزمایش RPR نسبت به VDRL اینست که اولاً سرم بیمار نیاز به حرارت جهت غیر فعال کردن کمپلمان ندارد و ثانیاً برای بررسی نتیجه آزمایش نیاز به میکروسکوپ نوری نمی باشد و نتایج را می توان با چشم غیر مسلح مشاهده کرد . بطور کلی آزمایشهای سرولوژی برای جستجوی راژین نه تنها در بیماری سیفیلیس مثبت می شوند بلکه در بیماریهای دیگر غیر ترپونمائی نیز ممکن است بطور کاذب مثبت شود که در اصطلاح به آنها مثبت کاذب بیولوژیکی Biological False Positive (BFP) می

گویند . بطور مثال در بیماران مبتلا بـه لوپـوس اریتمـاتوز سیسـتمیک (Systemic lupus erythematosus) آنمـی همولیتیـک (Haemolytic anaemia) ، تیروئیـدیت (Thyroiditis) ، تـب روماتیسـمی (Rheumatic fever) و آرتریـت روماتوئیـد (Rheumatoid arthritis) آزمایشهای تشخیص آنتی بادی رآژین سیفیلیسی ممکن است مثبت شوند .

یادآوری می شود که بندرت افراد سالم ، آزمایشهای تشخیص رآژین سیفیلیسی سرم آنها مثبت می شود .

آزمایشهای سرولوژی برای تشخیص رآژین سیفیلیسی بعنوان آزمایش مقدماتی ، جهت یافتن موارد مشکوک بیماری سـیفیلیس بسـیار مفید می باشند . اگر در فردی این دسته آزمایشها منفی شود فرد مبتلا به بیماری سیفیلیس نمی باشد . این آزمـایش بـرای تشـخیص بیماری سیفلیس اختصاصی نیست و در صورت مثبت شدن ، نمی تواند بطور قاطع دلیل بر مبتلا بودن فـرد بـه سـیفیلیس باشـد ولـی منفی شدن آزمایش ارزش زیادی دارد و در صورت منفی شدن آزمایش به احتمال بسیار زیاد فرد مبتلا به سفلیس نیست .

۲- آنتی بادی گروه ترپونما (Group treponemal antibody)علاوه بر ظهور آنتی بادی رآژین در سـرم بیمـاران مبـتلا بـه سیفیلیس ، آنتی بادی دیگری معمولاً از کلاس IgG در سرم این بیماران بوجود می آید که آنتی بادی گروه ترپونما نامیده مـی شـود . این آنتی بادی در حقیقت بر ضد آنتی ژنهای اشتراکی بین میکروب ترپونما پالیدم و ترپونما هـای غیـر بیمـاریزا مـی باشـد . از جملـه ترپونماهای ساپروفیت و غیر بیماریزا ، سوش رایتر (Reiter) می باشد .آزمایشی که برای تشخیص آنتی بادی هـای گـروه ترپونمـا در آزمایشگاه انجام می گیرد بنام آزمایش کلمر (Kolmer) یـا ثبـوت مکمـل پـروتئین رایتـر (– Reiter Protein Complement fixation test) یا RPCFT نامیده می شود . در این آزمایش از سوش رایتر بعنوان آنتی ژن استفاده می شـود . ایـن آزمـایش نیـز برای تشخیص بیماری سیفلیس اختصاصی نیست و در صورت مثبت شدن ، نمی تواند بطور قاطع دلیل بر مبتلا بودن فرد به سیفیلیس باشد ولی منفی بودن آن ارزش زیادی دارد و در صورت منفی شدن آزمایش به احتمال بسـیار زیـاد فـرد مبـتلا بـه سـفلیس نیسـت . آزمایش ثبوت مکمل کلمر ، در یک درصد افراد طبیعی مثبت می شود .

۳- آنتی بادی اختصاصی ترپونما (Specific treponemal antibody) :

این آنتی بادی فقط علیه میکروب ترپونما پالیدم ساخته شده است و در سرم بیماران مبتلا بـه سـیفیلیس دیـده مـی شـود . از جملـه آزمایشهایی که برای جستجوی آنتی بادی اختصاصی ترپونما انجام می گیرد می توان تست نلسـن و مـایر (Nelson -Mayer) و یـا آزمایش را Treponema pallidum –immobilization test (TPI) را نام برد که فقط در مراکزی انجام می شـود کـه قادرنـد میکروب ترپونما پالیدم را در بیضه خرگوش نگهداری نمایند . در این آزمایش میکروب زنده ترپونما پالیدم را در مجاورت سـرم بیمـار و کمپلمان قرار می دهند . در صورتی که سرم بیمار حاوی آنتی بادی اختصاصی ضد ترپونما باشد در مجاورت کمپلمان باعـث بیحرکـت شدن میکروب می شود که در زیر میکروسکوپ صفحه تاریک بررسی می شود .

امروزه آزمایش TPI به دلیل مشکلات نگهداری باکتری متداول نمی باشد .آزمایشهای دیگری که برای تشخیص آنتی بادی اختصاصـی ترپونما انجام می گیرند شامل : Fluorescent treponemal antibody –absorption (FTA-ABS) و ELISA می باشند .

چه آزمایشی را برای تشخیص بیماری سیفیلیس در مراحل مختلف بیماری انتخاب کنیم ؟

تشخیص سیفیلیس اولیه:

بهترین ، سریعترین ، مطمئن ترین ، ارزانترین و آسان ترین راه تشخیص بیماری سیفیلیس در مرحله اول بیماری ، نمونه برداری مستقیم از ترشحات شانکر و پیدا کردن اسپیروکتهای ترپونما پالیدم در ترشحات می باشد .

اگر امکان آزمایش مستقیم از ترشحات شانکر وجود ندارد ، قبل از مثبت شدن آزمایش سرولوژی VDRL سیفیلیس ، نباید درمان بیمار مشکوک را آغاز کرد . چنانچه آزمایش سرولوژی VDRL در این مرحله منفی باشند ، باید آزمایش را چند هفته و یا بعد از یکماه تکرار کرد تا تشخیص قطعی حاصل گردد .

در سی درصد از موارد، یک هفته بعد از ظهور شانکر و در نود درصد از موارد، سه هفته بعد از ظهور شانکر آزمایشهای سرولوژی سیفیلیس مثبت می شوند و تا درمان کامل بیماری و گاهی حتی تا مدتی پس از آن نیز مثبت باقی خواهند ماند .

تشخیص سیفیلیس ثانویه :

در این مرحله بیماری ، تستهای سرولوژی VDRL حدود ۹۹ درصد موارد مثبت می باشند . بنابراین چنانکه بیماری دارای علائم کلینیکی سیفیلیس باشد و آزمایش VDRL آن فرد مثبت شود تشخیص بیماری داده شده و فقط در موارد نادری که احتمال مثبت کاذب در کار باشد آزمایش FTA-ABS احتیاج می باشد . بهتر است از مایع نخاع در مرحله ثانویه و مرحله سوم سیفیلیس آزمایش کمی VDRL بعمل آید تا هر گونه احتمال عفونت سیفیلیس عصبی (Neurosyphilis) رد شود . گاهی ممکن است در آزمایشهای سرولوژی سیفیلیس ثانویه بعلت بالا بودن مقدار آنتی بادی سرم ، پدیده منطقه ای پروزون (Prozone)صورت بگیرد و آزمایش بطور کاذب منفی شود .

تشخیص مرحله سوم سیفیلیس :

در این مرحله بیماری ، مطمئنترین آزمایش سرولوژی ، آزمایش FTA-ABS می باشد . که تشخیص قطعی بیماری سیفیلیس بوسیله این آزمایش داده می شود . بعلاوه همانطوری که اشاره شد بهتر است از مایع نخاعی نیز آزمایش کمّی VDRLدر این مرحله صورت بگیرد . متاسفانه آزمایشهای تشخیص آنتی بادی رآژین سیفیلیسی در این مرحله اکثراً بطور کاذب منفی می شوند .

بطور کلی برای تشخیص بیماری سیفیلیس در مرحله اولیه و ثانویه ، ابتدا بهتر است موارد مشکوک بیماری را بوسیله آزمایش غربالی VDRL شناسائی نمود . علت انتخاب این آزمایش ، ساده بودن روش انجام و حساس بودن آزمایش است که مورد قبول اکثر پژوهشگران می باشد . در صورتی که آزمایش سرم فرد مشکوک چند بار به فاصله دو هفته منفی باشد ، شخص به احتمال زیاد مبتلا به بیماری سیفیلیس نمی باشد . در صورت مثبت و یا مثبت ضعیف بودن آزمایش VDRL ، باید آزمایش ثبوت مکمل کلمر را انجام داد . این آزمایش بسیار حساس است و تقریباً اختصاصی می باشد .

از طریف دیگر در مرحله سوم بیماری سیفیلیس ، آزمایشهای VDRL و کلمر ممکن است منفی شوند ولی آزمایش های اختصاصی آنتی بادی ترپونما مانند TPI و FTA-ABS مثبت می باشند . بنابراین با توجه به دوره بیماری سیفیلیس ، تشخیص قدم به قدم این بیماری با روشهای سرولوژی پیشنهاد می شود .

ارزیابی درمان سیفیلیس بوسیله آزمایش های سرولوژی

بوسیله آزمایش کمّی VDRL، می توان سیر درمان بیماری سیفیلیس را تحت نظر داشت. توصیه می شود از بیماران سیفیلیسی پس از درمان بمدت ۲ سال در فواصل متعدد آزمایش VDRL بطور متناوب انجام پذیرد . بطور کلی هرچه درمان بیماری سیفیلیس دیرتر آغاز شود ، زمان منفی شدن آزمایشهای سرولوژی پس از درمان کامل بیمار طولانی تر خواهد بود . بعضی عقیده دارند پس از درمان

مؤثر سیفیلیس درمرحله اول بیماری در عرض شش ماه و در مرحله ثانویه سیفیلیس در عرض دو سال آنتی بادی رآژین در سرم ، منفی خواهد شد . چنانچه در مرحله سیفیلیس پنهانی و یا دیرتر درمان سیفیلیس آغاز شود ، تیتر آنتی بادی رآژین در مدت طولانی تری منفی خواهد شد . پس از ظهور آنتی بادی ترپونما در سرم بیماران سیفیلیسی ، در اکثر موارد (حدود ۸۶ درصد بیماران) حتی پس از درمان مناسب نیز این آنتی بادی تا آخر عمر در سرم دیده می شود . بنابراین وجود این آنتی بادی در سرم فقط دلالت بر وجود یک عفونت فعال نیست بلکه نشان دهنده تاریخچه ای از عفونت سیفیلیسی نیز در شخص می باشد .

سیفیلیس مادرزادی در نتیجه عبور اسپیروکتهای ترپونما پالیدم از طریق جفت (Placenta) و عروق بند ناف به جنین بوجود می آید. برای تشخیص سیفیلیس مادرزادی در نوزادانی که مادران مبتلا به سیفیلیس متولد می شوند در صورتی که ضایعه ای در نوزاد باشد ، آزمایش VDRL در ماههای نخستین توصیه می شود .چنانکه بیماری سیفیلیس در نوزادی فعال باشد ، حدود ۹۰ درصد موارد آزمایشهای سرولوژی مثبت می شوند . چنانچه تیتر آنتی بادی رآژین نوزاد برابر یا بیشتر از مادر باشد ، برای تائید آن باید آزمایش کمی FTA-ABS(IgM) را با کونژوکه آنتی-IgM انجام داد .

آزمایش VDRL :

اساس این تست Flicolation است. سوسپانسیون بافر نمکی کاردیولیپین ، لستین و کلسترول را بعنوان آنتی ژن رآژین با سرم بیمار مخلوط کرده و روی آژیتاتور حرکت می دهند . در صورت مشاهده واکنش فلوکولاسیون در زیر میکروسکوپ ، دلالت بر وجود آنتی بادی رآژین در سرم بیمار می باشد .

در صورتیکه تست مثبت باشد توده های بزرگ و متوسط فلوکولاسیون در زیر میکروسکوپ مشاهده می شود و جواب به صورت Reactive گزارش می شود .

در صورتیکه تست مثبت ضعیف باشد توده های کوچک فلوکولاسیون تشکیل می شود و جواب به صورت Weakly Reactive گزارش می شود .

در صورتیکه تست منفی باشد ذرات ریز سوزنی شکل به صورت یکنواخت پراکنده دیده می شود و هیچگونه فلوکولاسیونی دیده نمی شود و جواب منفی به صورت Non-Reactive (NR) گزارش می شود .

آزمایش RPR :

اساس این تست Passive agglutination است . ابتدا ذرات کاردیولیپین را بر روی ذرات زغال (Charcoal) متصل میکنند. سپس سرم را با آن مواجه می کنند . در صورت وجود آنتی بادی ضد کاردیولیپین در سرم ، این آنتی بادی ها ذرات زغال را آگلوتینه می کنند .