بسم الله الرحمن الرحیم

دعای مطالعه

اَللهُمَ اَخرِجنی مِن ظُلُماتِ الوَهمِ وَاَکرِمنی بِنُورِ الفَهمِ

اَللهُمَ افتِح عَلَینا اَبوابَ رَحمَتِکَ وَ انشُر عَلَینا خَزائِنِ عُلُومِکَ

بِرَحمَتِکَ یا اَرحَمَ الرّاحِمینَ

پروردگارا، خارج کن مرا از تاریکی‌های فکر و گرامی بدار به نور فهم

پروردگارا، بگشای بر ما درهای رحمتت را و بگستران گنج‌های دانشت را به امید رحمت

تو ای مهربان‌ترین مهربانان

مبانی آزمایش‌های سرولوژی
به همراه ایمونوگلوبولین‌ها

(ویژه دانشجویان علوم آزمایشگاهی، ژنتیک، علوم پایه و تخصصی پزشکی)

مؤلفین؛

دکتر محمد مهدی افتخاریان

(دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی همدان)

محمد طاهری

(کارشناس ارشد ژنتیک پزشکی– دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)

دکتر آرزو صیاد

(استادیار گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)

کتاب جامع ▫ ماهر سان ▫ IQB ▫ میانبر ▫

سرشناسنامه	: افتخاریان، محمدمهدی، ۱۳۵۲-
عنوان و نام پدیدآور	: مبانی آزمایش‌های سرولوژی به همراه ایمونوگلوبولین‌ها/ مولفین محمدمهدی افتخاریان، محمد طاهری، آرزو صیاد.
مشخصات نشر	: تهران: گروه تالیفی دکتر خلیلی، ۱۳۹۵.
مشخصات ظاهری	: ۱۲۶ ص. : مصور، جدول، نمودار.
شابک	: 978-600-422-093-4
وضعیت فهرست نویسی	: فیپا
یادداشت	: کتابنامه.
موضوع	: سرم‌شناسی – دستنامه‌های آزمایشگاهی
موضوع	: Serology – Laboratory Manuals
موضوع	: ایمنی‌شناسی آزمایشگاهی
موضوع	: Experimental immunology
موضوع	: تشخیص سرمی
موضوع	: Serodiagnosis
شناسه افزوده	: طاهری، محمد، ۱۳۶۸-
شناسه افزوده	: صیاد، آرزو، ۱۳۶۲-
رده‌بندی کنگره	: ۱۳۹۵ ۲م۷الف/RB۴۶
رده‌بندی دیویی	: ۶۱۵/۳۷
شماره کتابشناسی ملی	: ۴۲۹۷۳۹۰

نام کتاب: مبانی آزمایش‌های سرولوژی به همراه ایمونوگلوبولین‌ها

مؤلفین: دکتر محمد مهدی افتخاریان – محمد طاهری – دکتر آرزو صیاد

ناشر: گروه تألیفی دکتر خلیلی

نوبت و سال چاپ: اول . ۱۳۹۵

شمارگان: ۱۰۰۰

چاپ: کیمیای قلم – صحافی: فردوس

مدیر تولید: اقبال شرقی

ناظر فنی چاپ: فرهاد فراهانی

مدیر فنی و هنری: مریم آرده

طراحی و صفحه آرایی: آذرمهر خواجه‌ای

بهاء: ۱۵۰۰۰ تومان

Website: www.DKG.ir

Telegram.me/drkhaliligroup

آموزشگاه دکتر خلیلی (دفتر مرکزی): ۶۶۵۶۸۶۲۱-۰۲۱

فروشگاه: تهران –خیابان انقلاب–روبه‌روی درب اصلی دانشگاه تهران –پاساژ فروزنده –طبقه همکف –پلاک ۳۳۱

تلفن: ۶۶۴۸۹۳۷۵ – ۰۲۱ – ۶۶۴۸۹۳۴۹ – ۰۲۱

مرکز پخش: ضلع جنوب غربی میدان انقلاب– جنب سینما پارس– مجتمع تجاری پارس – طبقه اول

مرکز فروش: ۶۶۵۶۹۲۱۶ – ۰۲۱

مدیر فروش: ۵۵۰۸۵۸۹ – ۰۹۱۲

طلیعه سخن مؤلف؛

علم ایمونولوژی علی‌رغم بنیان و ریشه چند هزار ساله اش، به‌صورت کاربردی و عملی یکی از جدیدترین شاخه‌های علوم پایه پزشکی محسوب می‌شود و رشد بسیار سریع آن در حوزه‌های مختلف مطالعاتی از قبیل سرولوژی، ایمونوپاتولوژی، ایمنوژنتیک، ایمونوهیستوشیمی، ایمونوشیمی، ایمونوفارماکولوژی و ... دور از انتظار نیست. بنابراین بدیهی است در این میان، شاخه‌های تشخیصی و آزمایشگاهی آن نظیر سرولوژی که یافته‌ها و تولیدات علمی ایمونولوژی را برای ردیابی بیماری‌ها به‌کار می‌گیرند، از اهمیت وافری برخوردار هستند. به همین جهت سعی شد، اثری مکتوب در همین زمینه تهیه نموده و آن را در اختیار علاقمندان قرار دهیم. هم‌چنان‌که خوانندگان محترم خود واقفند در زمینه علم سرولوژی و روش‌های تشخیص آزمایشگاهی ایمونولوژی، آثار ارزشمندی توسط استادان و پژوهشگران این عرصه تألیف شده است که هر کدام جایگاه رفیعی در این حوزه دارند. اما عمده هدف ما ذکر اصول و کلیات آزمایش‌های سرولوژی به‌صورت پایه برای دانشجویان بوده است و به همین لحاظ از درج جزئیات (مگر در مواردی که ضرورت داشته است) و اطاله مطلب پرهیز شده است.

و پایان کلام این‌که از آن‌جایی‌که هیچ کار تألیفی و ترجمه‌ای نمی‌تواند خالی از نقص باشد، از ذکر اشکالات و معایب اثر توسط اساتید و دانشجویان محترم صمیمانه استقبال می‌نماییم.

با تشکر
گروه مؤلفین
تابستان ۹۵

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: ایمونوگلوبولین‌ها ۷

- ساختمان ایمونوگلوبولین‌ها ۸
- نحوه تأثیر برخی آنزیم‌ها بر روی آنتی‌بادی ۱۱
- انواع زنجیره‌ها ۱۳
- انواع کلاس‌ها یا ایزوتیپ‌ها ۱۴
- جزئیات ساختار آنتی‌بادی‌ها ۲۱
- نقش قندها در ساختمان آنتی‌بادی ۲۲
- شاخص‌ها یا نشانه‌های آنتی‌ژنیک ایمونوگلوبولین‌ها ۲۴

فصل دوم: اصول آزمون‌های سرولوژی ۲۹

- تعریف سرولوژی ۲۹
- اصول تست‌های سرولوژی ۳۰
- انواع واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی بادی ۳۳
- انواع آگلوتیناسیون ۳۶
- روش‌های انجام آگلوتیناسیون ۳۸
- فزونی آنتی‌بادی و آنتی‌ژن و منطقه تعادل ۴۴
- چند نکته کلی در تفسیر نتایج تست‌های سرولوژیک ۴۶

فصل سوم: آزمون‌های سرولوژیک ۴۹

- تب مالت (بروسلوز) ۴۹
- آزمون رایت (Wright) ۵۱
- آزمون کومبس رایت (Coombs Wright) ۵۶
- آزمایش ۲- مرکاپتواتانول (ZME) ۵۹
- تیفوئید و پاراتیفوئید (حصبه و شبه حصبه) ۶۱
- آزمایش ویدال ۶۳
- آزمایش ویل فلیکس (Weil-Felix) ۶۵
- پروتئین‌های فاز حاد (Acute Phase Proteins) ۶۶
- CRP (C-Reactive Protein) ۷۰
- آرتریت روماتوئید (Rheumatoid Arthritis) ۷۴
- عفونت‌های استرپتوکوکی ۷۸
- آزمایش آنتی استرپتولیزین O (ASO) ۸۰
- تشخیص بارداری (Pregnancy test) ۸۵
- آزمون گراویندکس (Gravindex test) ۸۷
- سیفلیس (Syphilis) ۹۱
- آزمون VDRL ۹۵
- آزمون RPR ۱۰۰
- آزمون TPI ۱۰۳
- آزمون کولمر ۱۰۳
- آزمون ثبوت مکمل ۱۰۴
- آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون ۱۰۵
- پرسی پیتاسیون (Precipitation) ۱۰۶
- انواع پرسی پیتاسیون ۱۰۷
- تست آسکولی ۱۰۸
- تست اوختر لونی یا آزمون ایمونو دیفیوژن دوجانبه ۱۰۹
- تست ایمونودیفیوژن شعاعی تک‌جانبه ۱۱۷
- آزمون ایمونوالکتروفورز ۱۲۱
- کاربردهای ایمونوالکتروفورز در ایمونولوژی ۱۲۳

منابع ۱۲۵

فصل دوم

اصول آزمون‌های سرم‌شناسی (سرولوژی)

تعریف سرولوژی

از لحاظ لغوی سرولوژی معادل سرم‌شناسی است یعنی علمی که به مطالعه سرم می‌پردازد. اما از دیدگاه عملی باید دانست آن‌چه که در سرم وجود دارد و در علم سرولوژی به مطالعه آن پرداخته می‌شود، آنتی‌بادی‌ها هستند. در واقع سرم که مایع حیاتی درون رگ‌ها است حاوی ترکیبات بسیار گسترده و پیچیده‌ای است که در بین تمام آن‌ها آنچه که بیش‌تر مدنظر علم سرولوژی قرار می‌گیرد ایمونوگلوبولین‌ها هستند. این علم نیز همانند سایر علوم در حوزه‌های مختلف دارای کاربرد است که از همه مهم‌تر در زمینه‌های تشخیصی است. اعم از تشخیص بیماری‌ها (عفونی و غیرعفونی) و یا حالات فیزیولوژیک نظیر بارداری و . . . و آن‌چه که در ادامه این کتاب به آن پرداخته می‌شود جنبه‌های تشخیصی علم سرولوژی است.

پلاسما و سرم: چنان‌چه خوانندگان عزیز واقف‌اند، بخش مایع خون را پلاسما می‌نامند که برای تهیه آن لازم است خون با ضد انعقاد (معمولاً EDTA) مجاور گردد تا از لخته شدن آن جلوگیری شود. سپس آن را سانتریفوژ کرده که بخش مایع رویی همان پلاسما است. اما برای تهیه سرم، خون باید بدون حضور ضد انعقاد تهیه شود تا در زمانی بین ۱۵ تا ۲۰ دقیقه لخته شود. پس از سانتریفوژ، مایع رویی سرم خواهد بود. بدیهی است در این صورت سرم فاقد عوامل انعقادی خواهد شد. پس سرم را می‌توان پلاسمای بدون عوامل انعقادی تعریف کرد.

نکته: معمولاً در آزمایش‌های سرولوژی عوامل انعقادی نظیر فیبرینوژن تداخل می‌کنند به همین جهت سعی می‌گردد تا از سرم به‌جای پلاسما استفاده شود.

اصول تست‌های سرولوژی

اصول آزمون‌های سرولوژی بر مبنای تولید آنتی‌بادی پس از ورود آنتی‌ژن به بدن است. به‌عنوان مثال پس از ورود باکتری بروسلا آبورتوس به بدن انسان ظرف ۱۰ تا ۱۴ روز آنتی‌بادی اختصاصی ضد آن در بدن تولید شده و مقدارش در سرم افزایش می‌یابد. اگر بتوان با روش‌های آزمایشگاهی حضور این آنتی‌بادی اختصاصی ضد بروسلا را در بدن فرد مشکوک به تب مالت تأیید کرد می‌توان بر سابقه برخورد وی با این میکروب رأی قطعی داد. به عبارت ساده‌تر چون آنتی‌بادی‌ها به‌طور اختصاصی علیه آنتی‌ژن خاص تولید و ترشح می‌شوند وجود

آن‌ها در بدن دلیلی برای حضور آنتی‌ژن مورد نظر خواهد بود و از این طریق می‌توان برای تشخیص بسیاری از بیماری‌ها به ویژه بیماری‌های عفونی کمک گرفت.

انواع تست‌های سرولوژی

الف- تست‌های کیفی: در این نوع آزمون‌ها صرفاً وجود یا عدم وجود یک آنتی‌بادی (یا آنتی‌ژن) خاص در سرم بررسی می‌شود. در واقع هیچ‌گونه گزارشی از مقدار داده نخواهد شد. می‌توان این آزمون‌ها را با توجه به شدت مثبت شدن واکنش به‌صورت Negative، Pos (1+)، Pos (2+)، Pos(3+) یا Pos (4+) و یا به شکل Negative، Weakly Pos یا Strongly Pos گزارش کرد.

ب- تست‌های نیمه کمی: در گزارش این آزمون‌ها، تیتر واکنش ذکر می‌گردد. منظور از تیتر یعنی آخرین حدی از رقت سرم که قادر است باعث مثبت شدن واکنش گردد. پس این نوع آزمایش‌ها دقت کاری بیش‌تر از آزمون‌های کیفی دارند ولی باز هم به مقدار کمی آنتی‌بادی در سرم اشاره نشده است.

ج- تست‌های کمی: چنان‌که مشخص شده است نتایج این آزمایش‌ها به‌صورت کمی و مقدار عددی بیان می‌شود. بنابراین لازم است که روش انجام این آزمون‌ها از دقت کافی برخوردار باشد.

صحت، دقت، حساسیت و تفاوت بین آن‌ها

منظور از صحت یعنی میزان نزدیکی جواب به‌دست آمده با جواب حقیقی. به‌عنوان مثال اگر میزان حقیقی قند خون ناشتای فردی ۹۰ mg/dl باشد هر چقدر جواب به‌دست آمده توسط آزمایشگاه به این رقم نزدیک‌تر باشد آن آزمایش صحیح‌تر انجام شده است. منظور از دقت یعنی با انجام چند بار یک آزمایش چقدر جواب‌های به‌دست آمده به یکدیگر نزدیک باشند.

بدیهی است این دو ارتباطی به یکدیگر ندارند. ممکن است دقت بالا و صحت پایین باشد یعنی با انجام چندین بار یک آزمایش همه جواب‌ها نزدیک یکدیگر باشند یا دقیقاً یکسان باشند اما هیچ‌کدام مقدار حقیقی را نشان ندهد و منظور از حساسیت یعنی کم‌ترین مقداری که با روش مورد استفاده قابل ردیابی است. به‌عنوان مثال اگر حساسیت یک کیت اندازه‌گیری CRP سرم ۰/۶ mg/dl باشد مقادیر کم‌تر از آن با این کیت قابل اندازه‌گیری نخواهد بود.

طراحی و اساس یک آزمون سرولوژی

بدین منظور لازم است که سرم فرد مشکوک (به یک بیماری عفونی خاص) را با آنتی‌ژن اختصاصی مربوطه مجاور کرد. در صورتی که در سرم آنتی‌بادی مورد نظر موجود باشد، با آنتی‌ژن اتصال پیدا کرده و کمپلکس آنتی‌ژن- آنتی‌بادی که اصطلاحاً به آن کمپلکس ایمن اطلاق می‌گردد، تشکیل می‌شود. با توجه به این‌که کمپلکس ایمن سنگین وزن و درشت است، قابل تشخیص خواهد بود. در این صورت نتیجه آزمون سرولوژی مربوطه مثبت تلقی

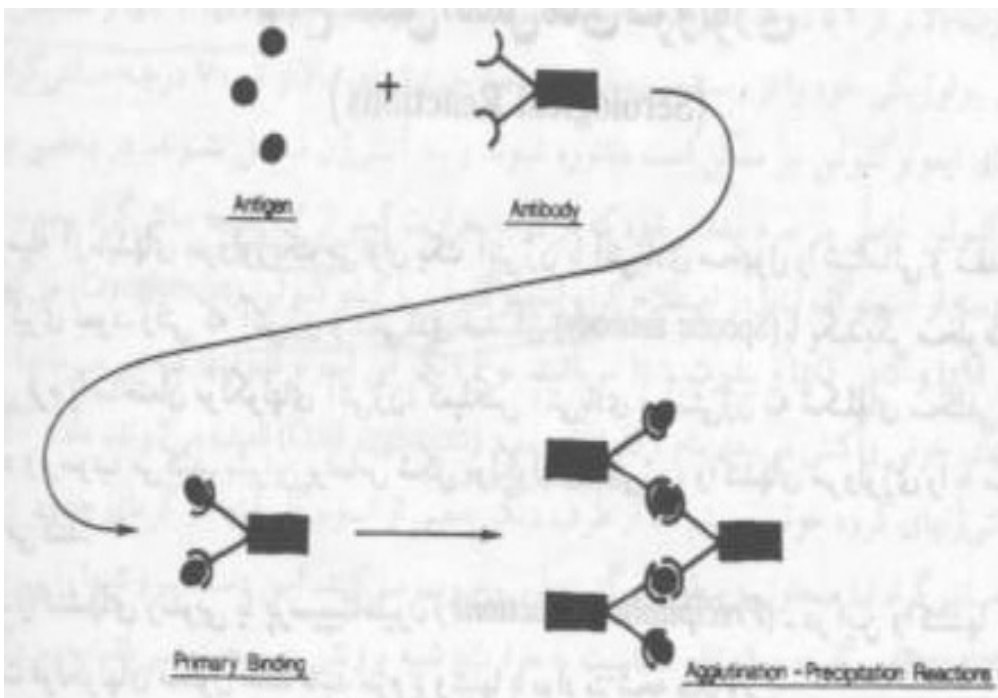
می‌شود و در صورت عدم وجود آنتی‌بادی در سرم فرد، کمپلکس ایمن تشکیل نشده و پاسخ منفی خواهد بود.

انواع واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی

الف- واکنش اولیه (مرحله اول): در این واکنش یک اتصال ساده بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن شکل می‌گیرد. در این واکنش ساده که بین مولکول‌های آنتی‌ژن و آنتی‌بادی صورت می‌گیرد شبکه‌ای تشکیل نخواهد شد و کمپلکس‌های ایمن به‌صورت منفرد و مجزا از هم به‌وجود می‌آیند. بدیهی است که با توجه به ابعاد کوچک کمپلکس‌های ایمن و عدم تشکیل شبکه گسترده، تشخیص واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی مشکل خواهد بود و جز با تکنیک‌های پیشرفته قابل ردیابی نیست. بدین منظور لازم است که مولکول‌های درگیر به‌وسیله مارکرهایی نظیر مواد فلوئورسانس، مواد رادیواکتیو یا آنزیم، نشان‌دار شوند تا از این طریق و با استفاده از تکنیک‌های ایمونوفلوئورسانس (IF)، رادیوایمونواسی (RIA) و الایزا (ELISA) قابل دتکت باشند.

ب- واکنش ثانویه (مرحله دوم): در این نوع واکنش پس از اتصال اولیه بین مولکول‌های آنتی‌بادی و آنتی‌ژن، شبکه گسترده‌ای از کمپلکس‌های ایمن تشکیل خواهد شد. واضح است که تشخیص این حالت به سهولت امکان‌پذیر بوده و حتی با چشم غیرمسلح و بدون استفاده از تکنیک‌های پیچیده نیز قابل انجام است. چنان‌که در شکل ۲-۱ نیز مشهود است لازمه

ایجاد واکنش ثانویه و تشکیل شبکه وجود حداقل دو ظرفیت فعال هم برای آنتی‌ژن و هم برای آنتی‌بادی است و در صورتی که حتی یکی از طرفین تک‌ظرفیتی باشند یا تک‌ظرفیتی عمل کنند، شبکه‌ای به‌وجود نخواهد آمد و این امر موجبات تشخیص نادرست و بروز پدیده منفی کاذب را در پی خواهد داشت. بنابراین هاپتن‌ها که آنتی‌ژن‌های تک‌ظرفیتی و کوچک هستند، توانایی تشکیل شبکه را معمولاً ندارند و یا وجود برخی از آنتی‌بادی‌های تک‌ظرفیتی در سرم همین مسأله را موجب خواهد شد (به آزمایش کومبس رایت مراجعه شود).



شکل ۲-۱. واکنش اولیه و ثانویه بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن (برگرفته از منبع ۳)