

به نام آنکه فکرت آموخت



درسنامه عملی ایمنی شناسی

PRACTICAL IMMUNOLOGY HANDOUT

گروه ایمنی شناسی

دانشکده پزشکی

۱۳۹۴

فهرست

۴.....	جداسازی سرم و پلاسما و سلولهای تک هسته ای از خون محیطی و تهیه رقت های پایایی
۷.....	رقیق سازی سرم.....
۷	جداسازی سلولهای تک هسته ای خون محیطی.....
۱۰.....	آگلوتیناسیون.....
۱۲.....	تست تشخیص (Rheumatoid Factor) RF.....
۱۳.....	تست تشخیص (Reactive Protein) CRP.....
۱۵.....	تست تشخیص بارداری " Pregnancy Test ".....
۱۷.....	واکنش های رسوبی (Precipitation).....
۱۷.....	انتشار دوگانه.....
۱۸.....	انتشار شعاعی ساده.....
۲۰.....	Immunoassays.....
۲۱.....	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay.....
۲۴.....	Immunofluorescent Assay (IFA).....
۲۸.....	۲۸ تعیین گروه های خونی و آزمایش RBC Cross-match.....
۳۰	آزمایش کراس مچ گلبولهای قرمز خون (Blood group cross match).....

مقدمه

اساس بسیاری از تست های ایمونولوژیک، واکنش آنتی ژن - آنتی بادی است. اتصال آنتی بادی به آنتی ژن یک واکنش اختصاصی، دوطرفه و برگشت پذیر می باشد. در این واکنش انواع پیوندهای ضعیف غیر کووالانس شامل پیوندهای هیدروفوبیک، پیوندهای هیدروژنی، یونی و واندروالس شرکت دارند. عوامل متعددی بر روی این واکنش ها مؤثرند که مهم ترین آنها عبارتند از:

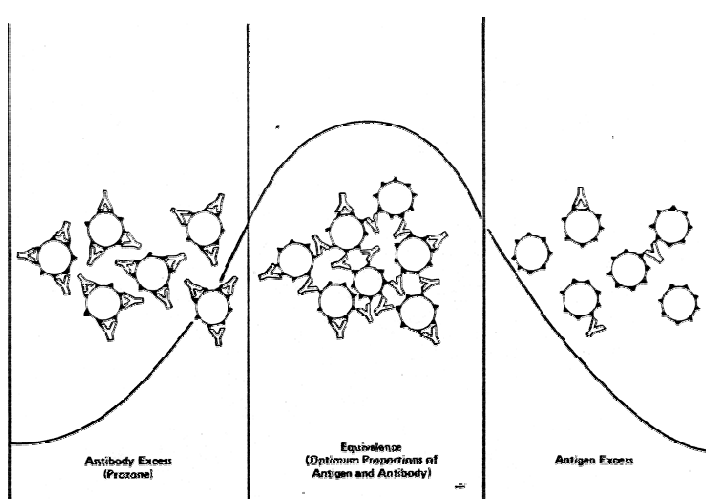
Affinity یا میل پیوندی که به قدرت برهم کنش (interaction) های غیر کووالانس میان یک جایگاه اتصال آنتی ژن از یک مولکول آنتی بادی و تنها یک اپی توپ از یک مولکول آنتی ژن اطلاق می شود.

Avidity یا میل پیوندی تام که شامل مجموعه میل پیوندی چندین جایگاه اتصال می باشد.

PH محیط ، بدین معنی که اتصال آنتی ژن به آنتی بادی در **PH** بالا (محیط بازی) یا پائین (محیط اسیدی) ضعیف می باشد.

قدرت یونی محیط واکنش و اینکه در محیط های فاقد یون مانند آب مقطر، واکنش آنتی ژن - آنتی بادی صورت نمی گیرد.

دمای محیط واکنش، مدت زمان واکنش، و نسبت غلظت آنتی ژن و آنتی بادی از دیگر عوامل مؤثر بر واکنش آنتی ژن - آنتی بادی می باشند. در توجیه اهمیت این نسبت به منحنی هایدلبرگ (که به آن منحنی رسوبی هم گفته می شود) اشاره می کنیم که با اندازه گیری مقدار رسوب ایجاد شده، پس از مجاور کردن مقادیر متفاوت و فزاینده ای از یک آنتی ژن با مقدار ثابتی از آنتی بادی اختصاصی آن در لوله های آزمایش ، بدست آمده است.



با توجه به این منحنی مشاهده می شود که در لوله های آزمایش ابتدائی از سمت چپ که مقدار آنتی ژن نسبت به آنتی بادی کمتر است (Antibody excess یا Prozone) و در لوله های انتهائی که مقدار آنتی ژن نسبت به آنتی بادی بیشتر است (Antigen excess یا Postzone)، مقدار رسوب کمتر بوده و بالعکس در لوله های میانی بیشترین مقدار رسوب بدست آمده است (ناحیه Equivalence که تقریباً تمام آنتی بادی موجود در لوله آزمایش به آنتی ژن متصل شده است).

کاربرد عملی این منحنی در تمام آزمایش های تشخیص آنتی ژن یا آنتی بادی می باشد و بنا براین در هر آزمایشی برای جلوگیری از پدیده منطقه ای (Zone phenomenon) بایستی غلظت های متناسب آنتی ژن و آنتی بادی مشخص شده و بر اساس آن تست تشخیصی انجام گردد.

ویژگی (Specificity) اتصال بین آنتی ژن و آنتی بادی باعث شده تا از آنتی بادیها بعنوان ابزار مناسبی برای تشخیص آنتی ژن یا آنتی بادی استفاده شود. زمانی که یک آنتی ژن با آنتی بادی اختصاصی خودش مخلوط شود کمپلکس های آنتی ژن - آنتی بادی تشکیل می شود که انواع روش های تشخیصی آزمایشگاهی برای تشخیص این کمپلکس ها طراحی و راه اندازی شده است. این روش های آزمایشگاهی به دو دسته تقسیم می شوند:

الف- آزمایش هایی که در آنها واکنش آنتی ژن - آنتی بادی، شبکه بزرگ قابل رؤیتی را تشکیل می دهد. از مثال های این دسته، انواع آزمایش های Agglutination و Precipitation می باشد.

ب- آزمایش هایی که بواسطه میزان اندک آنتی ژن و آنتی بادی، شبکه قابل رؤیتی تشکیل نشده و بنا براین نیاز به نشاندار کردن آنتی ژن یا آنتی بادی جهت نشاندار شدن کمپلکس آنتی ژن - آنتی بادی و تشخیص آن می باشد. از این گروه می توان به آزمایش های RIA, ELISA و IFA اشاره نمود.

در آزمایشگاه ایمنی شناسی که برای دانشجویان پزشکی و سایر گروهها برگزار می شود از هر کدام از دو گروه فوق، آزمایش هایی انتخاب و انجام خواهد شد. ضمناً به لحاظ اهمیت آزمایش های مربوط به ایمنوهماتولوژی و انتقال خون، یک جلسه نیز به این آزمایش ها اختصاص داده شده است.

لازم به ذکر است که ترتیب و تقدم انجام آزمایش ها در نیمسال های مختلف ممکن است متفاوت باشد. بنا بر این دانشجویان ضمن مراجعه به برنامه درس عملی همان ترم، در تاریخ های مشخص شده، مطالب مربوطه را مطالعه نمایند.

جداسازی سرم و پلاسما و سلولهای تک هسته ای از خون محیطی

و تهیه رقت های پیاپی

یکی از قابل دسترس ترین نمونه هایی که در آزمایشگاه ایمنی شناسی مورد استفاده قرار می گیرد خون است. بسیاری از آزمایشات ایمنی شناسی بر روی پلاسما یا سرم قابل انجام است و بعضی دیگر از آزمایشات بر روی رده های خاصی از سلولهای خونی انجام می گیرند. پزشک درخواست کننده آزمایش باید اطلاعاتی در مورد نوع و مقدار زمان نمونه گیری داشته باشد. بعضی از آزمایشها نیاز به خون تازه دارند در حالیکه در بعضی از آزمایشها نگهداری خون به مدت چند ساعت نیز اختلالی در نتیجه آزمایش ایجاد نمی کند. بعضی از آزمایشها نیاز به خون استریل دارند و در بعضی از آنها خون باید با ماده ضد انعقاد ویژه ای مخلوط شود.

الف - سرم: اکثر آزمایشهای سرولوژی بر روی سرم انجام می شود مانند اندازه گیری ایمونوگلوبولین ها و اجزا کمپلمان، بررسی فعالیت کمپلمان، اندازه گیری شاخصهای توموری مانند* (PSA, AFP, CEA) و اندازه گیری آنتی بادی بر علیه عوامل عفونی.

سرم، بخش مایع خون پس از لخته شدن است. برای جداسازی سرم باید خون را پس از لخته شدن سانتریفیوژ کرد. سرم جدا شده یا فوراً باید مورد آزمایش قرار گیرد و یا پس از جداسازی در یک لوله تمیز ریخته شود. مشخصات بیمار بر روی آن نوشته شود و تا زمان انجام آزمایش در برودت ۲۰- درجه سانتیگراد تا ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شود.

ب - پلاسما: بسیاری از آزمایشهای سرولوژی بر روی پلاسما نیز قابل انجام است. برای جداسازی پلاسما، خون بلافاصله پس از خروج از رگ باید با یک ماده ضد انعقاد (هپارین_ اگزالات یا EDTA) مخلوط شود. این مواد از انعقاد خون جلوگیری می کنند. اگر چنین نمونه ای سانتریفیوژ شود سلولهای خون از پلاسما جدا می شوند. پس از سانتریفیوژ، گلبولهای قرمز در ته لوله قرار می گیرند و گلبولهای سفید بصورت یک لایه بر روی آنها قرار می گیرند. به این لایه Buffy coat می گویند. پلاسما بر روی سلولها قرار می گیرد که می توان آن را جدا کرد و در فریزر نگهداری نمود. از Buffy coat نیز می توان در بعضی از آزمایشها از جمله Nitro Blue Tetrazolium (NBT) test که به منظور بررسی فعالیت نوتروفیلها انجام می شود استفاده کرد. بدون استفاده از ماده ضد انعقاد، فیبرینوژن تبدیل به فیبرین می گردد و رشته های فیبرین، گلبولهای قرمز و سایر سلولها را دربر می گیرند.

پلاسما بر خلاف سرم حاوی فیبرینوژن می باشد. سایر پروتئین ها، آنتی ژن ها، آنتی بادی ها، آنزیم ها و الکترولیت های خون در هر دوی این نمونه ها وجود دارند.

سرم یا پلاسما باید در کوتاه ترین زمان به دنبال نمونه گیری از سلولهای خونی جدا گردد. حداکثر زمان مجاز جهت جداسازی سرم یا پلاسما ۲ ساعت پس از نمونه گیری پیشنهاد می گردد. قابل ذکر است که درخصوص اندازه گیری ترکیباتی نظیر پتاسیم، هورمون های کورتیکواستروئیدی، کورتیزول، کاتکولامین ها، اسید لاکتیک و هموسیستین این زمان باید کمتر از ۲ ساعت باشد. نکته دیگر اینکه درجه حرارت محیط نیز بر پایداری برخی مواد تاثیر می گذارد. نمونه خون جهت اندازه گیری ترکیباتی نظیر کاتکول آمین ها، آمونیاک، اسید لاکتیک، پیروات، گاسترین، هورمون پاراتیروئید، فعالیت رنین پلاسما و اسید فسفاتاز، باید پس از جمع آوری در سرما نگهداری شود.

ج - جداسازی سلولهای تک هسته ای خون:

برای انجام آزمایشاتی مانند:

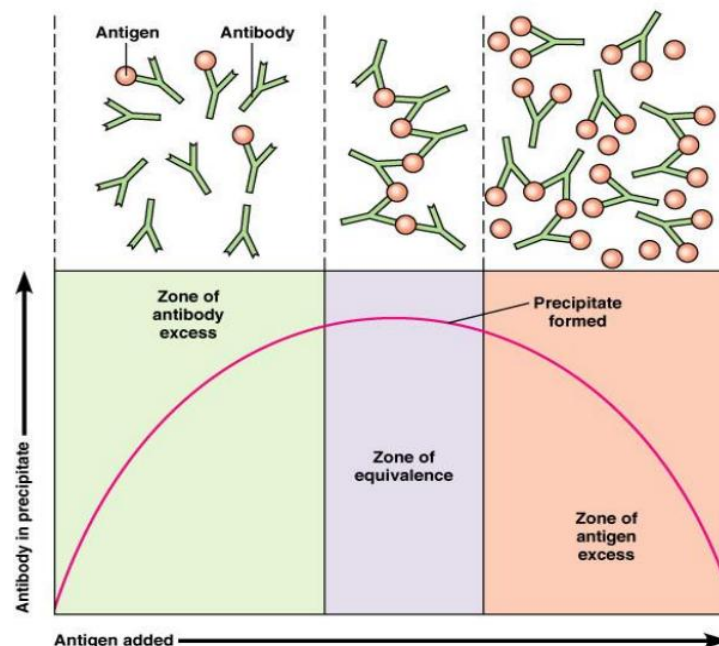
Mixed lymphocyte culture (MLC) , Lymphocyte transformation test (LTT) , HLA-typing و

WBC Cross match از لنفوسیت های خون محیطی استفاده می شود. برای جدا کردن لنفوسیتها از خون محیطی (و نیز مغز استخوان و خون بند ناف) از ماده ای به نام Ficoll-Hypaque با دانسیته ۱/۰۷۷-۱/۰۷۸ استفاده می شود. دانسیته سلولهای تک هسته ای بر خلاف گلبولهای قرمز و گرانولوسیتها کمتر از فایکول می باشد. بنابراین با انجام سانتریفیوژ بر روی فایکول می توان آنها را براحتی جدا نمود. به این صورت که گلبولهای قرمز و گرانولوسیتها در زیر لایه فایکول و سلولهای تک هسته ای بر روی فایکول قرار می گیرند.

د - رقیق سازی سرم و اهمیت آن در آزمایشهای سرولوژی: در اکثر آزمایشهای سرولوژی وجود و یا عدم وجود آنتی بادی اختصاصی بر علیه آنتی ژن خاصی مورد نظر است. اما در بعضی از این آزمایش ها مقدار یا کمیت آنتی بادی نیز اهمیت دارد. بطور مثال پس از برخورد با یک عامل عفونی مانند سرخجه تیترا بالا رونده آنتی بادی بر علیه ویروس نشان دهنده آلودگی اخیر بیمار با

عامل عفونی می باشد. یا زمانیکه هدف پزشک بررسی اثر بخشی یک دارو در درمان یک بیماری خود ایمنی است تیتراژ پائین رونده آنتی بادی اهمیت دارد.

اساس اغلب آزمایشهای سرولوژی واکنش Ag-Ab است. واکنش آنتی ژن - آنتی بادی یک واکنش دو طرفه است و نسبت غلظت آنتی ژن به آنتی بادی از مهمترین عواملی است که بر این واکنش اثر دارد (منحنی واکنش Ag-Ab هایدلبرگ را بخاطر بیاورید). چنانکه در قسمت مقدمه گفته شد در ناحیه prozone و post-zone تشکیل کمپلکس بسیار کم است اما در لوله هایی که نسبت غلظت آنتی ژن و آنتی بادی در حد مناسب است (Equivalence zone) بیشترین مقدار کمپلکس ایجاد می گردد. یکی از موارد منفی کاذب تست هایی که بر اساس فعل و انفعالات آنتی ژن - آنتی بادی انجام میشود واکنش های منطقه ای (Zonal Reaction) است. به این ترتیب که در اینگونه آزمونها بایستی مقادیر متناسبی از آنتی ژن و آنتی بادی، وجود داشته باشد تا واکنش کاملی صورت گیرد و لذا در صورت وجود مقادیر زیادی آنتی ژن و یا آنتی بادی، نتایج حاصله میتواند به صورت واکنش ضعیف یا منفی، جلوه گر شده و در واقع پاسخ کاذبی به بار آورد. بر این اساس، در صورتی که طی انجام چنین آزمایشاتی نمونه مورد بررسی به اندازه کافی رقیق نشود مقادیر زیادی آنتی بادی در آن وجود خواهد داشت و با آنتی ژن مربوطه واکنش قابل رؤیتی ایجاد نخواهد کرد و تنها در صورت رقیق کردن نمونه سرمی مورد بحث، این نقیصه برطرف و جواب واقعی، دریافت خواهد شد. این حالت را واکنش یا پدیده Prozone می نامند. از طرفی در صورت زیاد بودن مقدار آنتی ژن نیز این حالت ایجاد میگردد و با رقیق نمودن آنتی ژن، برطرف می شود که به واکنش Postzone معروف میباشد.



به همین دلیل در آزمایش های تشخیص آنتی ژن و آنتی بادی، رقیق سازی سرم از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در آزمایش هایی که هدف، تیتراسیون آنتی بادی در سرم بیمار است (تعیین کمترین رقت سرم که نتیجه آزمایش را بصورت مثبت نشان می دهد) مهمترین گام رقیق سازی سرم است.

رقیق سازی سرم: با روش ساده و پیاپی انجام می پذیرد.

روش ساده (Simple dilution)

حجم مشخصی از سرم با حجم مشخصی از بافر مخلوط می گردد و رقت سرم بصورت زیر قابل محاسبه است.

رقت = حجم کل / حجم سرم (حجم کل = حجم سرم + حجم بافر)

رقت سازی پیاپی (Serial dilution)

در روش سریال که در آزمایشات تیتراسیون بکار می رود سرم بصورت تصاعدی و با یک ضریب ثابت رقیق می شود.

متداول ترین روش تهیه رقت های پیاپی، Serial two fold dilution است. در این روش سرم با ضریب ۲ رقیق می شود. یعنی غلظت سرم در هر لوله نصف لوله ما قبل خود و دو برابر لوله بعدی می باشد.

* مواد و وسایل لازم:

سرنگ - پنبه - الکل - هپارین یا EDTA - لوله شیشه ای - راک - پی پت پاستور - پی پت مدرج - فایکول - محلول رقیق کننده (saline یا Hank's) - سانتریفیوژ

* روش کار:

۶- سی سی خون بگیرید. ۲ سی سی از آن را در لوله A بریزید. لوله را بدون حرکت بر روی میز آزمایشگاه قرار دهید و اجازه دهید خون کاملاً لخته شود.

۴- سی سی خون را در لوله B بریزید و با ماده ضد انعقاد مخلوط کنید تا لخته نشود. سپس ۲ سی سی از خون این لوله را به لوله C منتقل کنید.

* جداسازی سلولهای تک هسته ای خون محیطی:

۲- سی سی محلول رقیق کننده را به خون موجود در لوله C اضافه کنید. محتوای لوله را کاملاً مخلوط کنید.

- خون رقیق شده موجود در لوله C را به آرامی (با پی پت پاستور) از کنار دیواره لوله بر روی فایکول بریزید بطوریکه خون با فایکول مخلوط نشود.

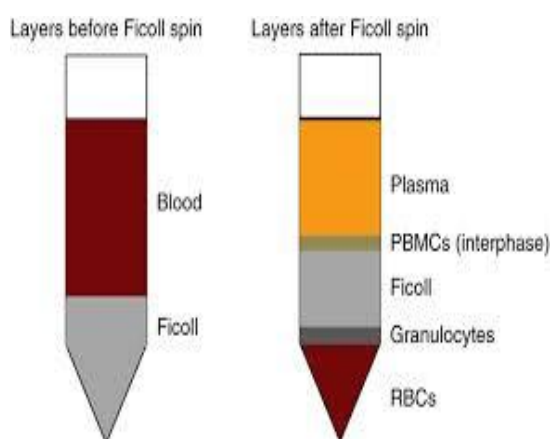
- لوله را به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۲۸۰۰ دور سانتریفیوژ کنید.

- لوله را به آرامی از سانتریفیوژ خارج کنید و به نحوه قرار گرفتن لایه ها دقت کنید.

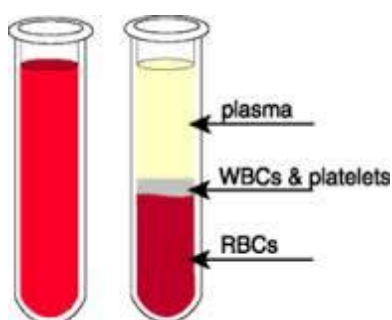
- سلولهای تک هسته ای را که بصورت یک لایه سفید رنگ بر روی فایکول دیده می شود با پیپت پاستور پی پت جمع آوری کنید و به یک لوله تمیز انتقال دهید.

- ۲ سی سی محلول رقیق کننده به سلولهای جدا شده اضافه کنید و مجدداً برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

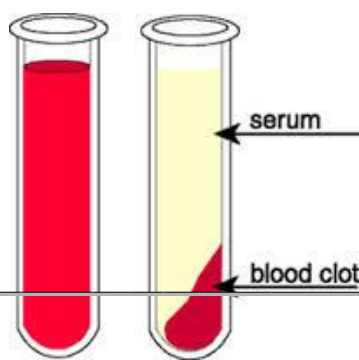
- لوله را از سانتریفیوژ خارج کنید. به رسوب سلولی ته لوله دقت کنید. محلول بالایی را دور بریزید. رسوب سلولی در این حالت کاملاً قابل مشاهده است. می توان از این سلولها، سوسپانسیونی با تعداد مشخص سلولی تهیه کرد و در آزمایشات مختلف از آن استفاده نمود.



*** جداسازی پلاسما:** لوله B را به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ کنید. به آرامی لوله را از سانتریفیوژ خارج کنید به نحوه قرار گرفتن لایه های سلولی توجه کنید.

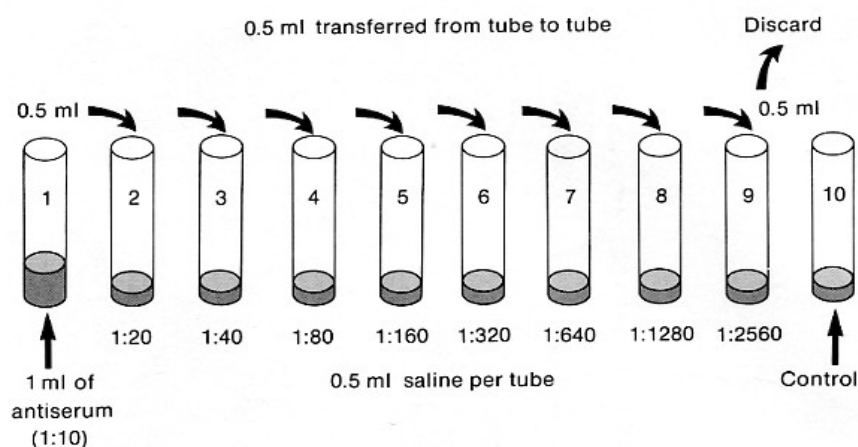


*** جداسازی سرم:** پس از لخته شدن خون لوله A، لخته را توسط اپلیکاتور پلاستیکی یا چوبی از جدار لوله جدا کنید. لوله A را به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ کنید. پس از جداسازی سرم به تفاوت سرم و پلاسما دقت کنید.



* تهیه رقت‌های پیاپی دو برابر از سرم:

- ۵ لوله را شماره گذاری کنید و با استفاده از پی پت مدرج در داخل هر یک از لوله ها ۱ سی سی محلول رقیق کننده بریزید.
- ۱ سی سی از نمونه ای که در اختیار شما قرار داده شده است را به لوله شماره ۱ اضافه کنید. محتوای لوله را کاملاً مخلوط کنید.
- ۱ سی سی از نمونه رقیق شده موجود در لوله شماره ۱ را به لوله شماره ۲ انتقال دهید و خوب مخلوط کنید.
- ۱ سی سی از نمونه رقیق شده موجود در لوله شماره ۲ را به لوله شماره ۳ انتقال دهید و خوب مخلوط کنید.
- این کار را برای لوله های ۳ و ۴ و ۵ هم ادامه دهید. رقت نمونه را در هر لوله محاسبه کنید .



-
- PSA = Prostatic Specific Antigen •
 - AFP = Alpha-Feto Protein •
 - CEA= Carcino Embryonic Antigen •

آگلوتیناسیون

Agglutination

واکنش آنتی ژنهای نامحلول یا ذره ای (non-soluble, particulate) مثل باکتریها با آنتی بادی اختصاصی شان منجر به ایجاد تجمعات قابل مشاهدهای می شوند که به این نوع واکنش، آگلوتیناسیون گفته می شود. به آنتی ژن عامل این واکنش، Agglutinin و به آنتی بادی علیه آن، Agglutinin می گویند. لازمه ایجاد این واکنش، آنتی بادی با حداقل دو ظرفیت و آنتی ژنهای چند ظرفیتی می باشد.

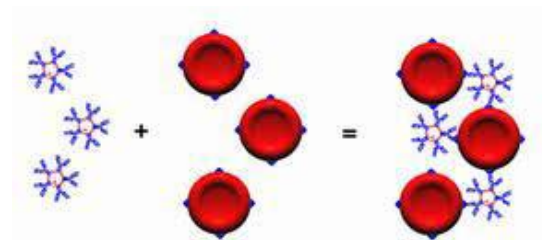
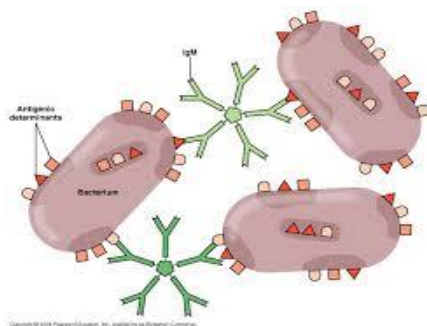
بطور کلی واکنشهای آگلوتیناسیون را به سه دسته تقسیم می کنند:

۱- فعال یا مستقیم (Active , Direct)

۲- غیر فعال (Passive)

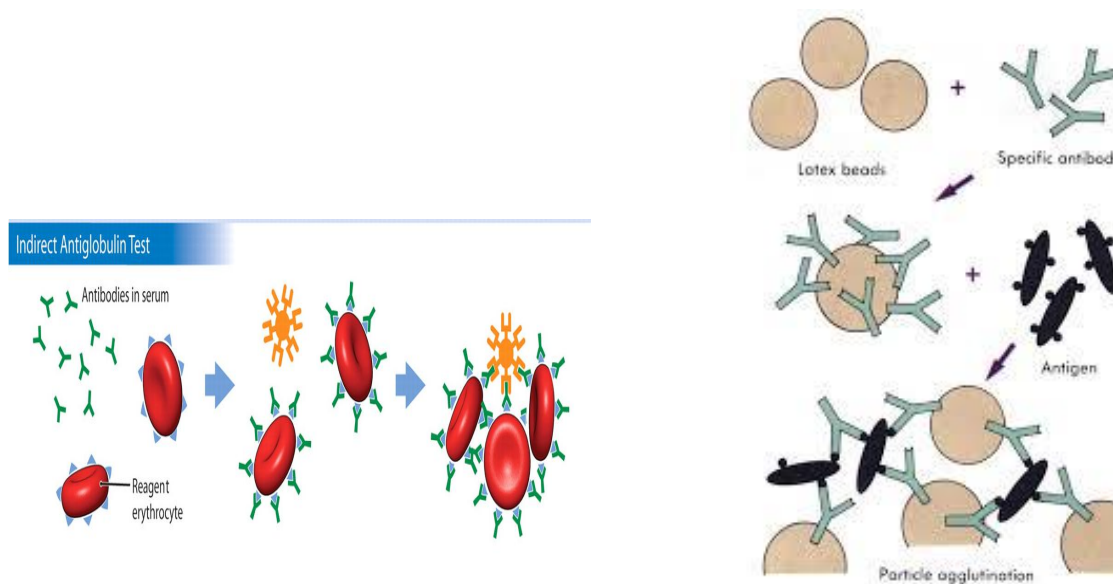
۳- غیر مستقیم (Indirect)

۱- آگلوتیناسیون فعال (Active): در این نوع آگلوتیناسیون، شاخص های آنتی ژنی بطور طبیعی و ذاتی بر روی آنتی ژن نامحلول وجود دارند و بعبارت دیگر جزء ساختمانی آنتی ژن نامحلول می باشد (یا آنتی ژن بطور طبیعی بر سطح سلول قرار دارد). مانند آزمایش Wright که جهت تعیین تیتراژ آنتی بادیهای ضد بروسلا و تشخیص تب مالت انجام می شود و آزمایش Widal که به منظور تعیین تیتراژ آنتی بادیهای ضد سالمونلا و تشخیص تب حصبه انجام می گردد. همآگلوتیناسیون (Hemagglutination) نوعی آگلوتیناسیون فعال است که سلول حاوی آنتی ژن مورد نظر ما گلبول قرمز می باشد.

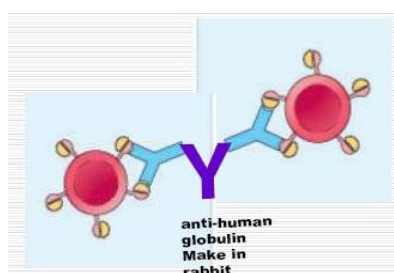


۲- آگلوتیناسیون غیر فعال (Passive): در این نوع آگلوتیناسیون، آنتی ژن محلول را به ذرات نامحلول متصل می کنند. بعبارت دیگر آنتی ژن محلول با روش آگلوتیناسیون شناسائی می گردد (شناسائی آنتی ژنهای محلول با روش رسوبی (precipitation) صورت می

گیرد). می توان گفت این روش، تبدیل واکنش رسوبی به آگلوتیناسیون است. از آنجا که شاخص های آنتی ژنی جزء ساختمانی آنتی ژن نامحلول نمی باشند و از مواد حدواسطی جهت ایجاد آگلوتیناسیون استفاده می شود به این نوع آگلوتیناسیون، غیر فعال گفته می شود. از جمله موادی که برای اینکار استفاده می شود می توان از ذرات ریز لاتکس (از جنس polystyrene) و گلبولهای قرمز نام برد. این ذرات، خود وارد واکنش با آنتی بادی نمی شوند و فقط به عنوان سطح اتصال آنتی ژن عمل می کنند. مثال هایی از این نوع آگلوتیناسیون شامل آزمایش های تشخیص فاکتور روماتوئید RF و CRP می باشد.



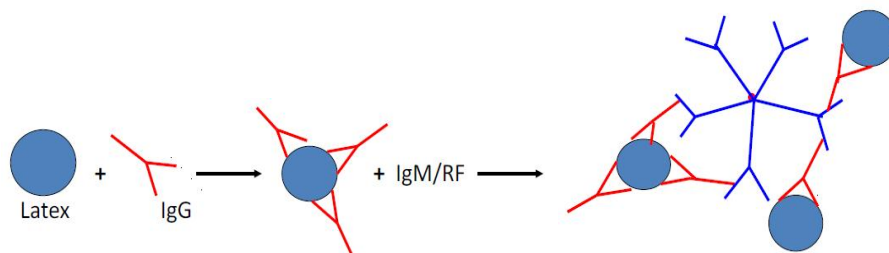
۳- آگلوتیناسیون غیر مستقیم (Indirect): زمانی که به دلیل وجود آنتی بادی های ناقص (Incomplement) یا آنتی بادی های مسدود کننده (Blocking) که غالباً از کلاس IgG می باشند آگلوتیناسیون اتفاق نیفتد و آنتی بادی به تنهایی قادر به ایجاد آگلوتیناسیون نباشد، از آنتی بادی دومی به نام Antiglobulin استفاده می شود که قادر است از قسمت Fab به قسمت Fc آنتی بادی اول متصل شده و آگلوتیناسیون را تسهیل کند. به این روش چون از آنتی گلوبولین (که به آن معرف کومبز نیز گفته می شود) استفاده می شود Antiglobulin test یا تست کومبز Coomb's test می گویند.



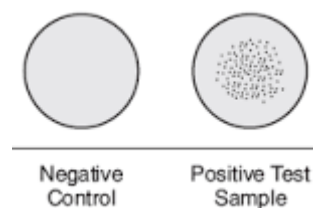
تست تشخیص RF (Rheumatoid Factor)

در سرم اغلب افراد مبتلا به روماتیسم مفصلی (Rheumatoid Arthritis) ، آتوانتی بادیهای بنام RF یا روماتوئید فاکتور وجود دارد که این آنتی بادی بر علیه قسمت FC مولکول IgG بوجود آمده و در سرم فرد مبتلا قابل تشخیص می باشد. anti-IgG های ایجاد شده، غالباً از نوع IgM بوده اما ممکن است از انواع IgA و IgG نیز باشد. RF نه تنها در سرم و مایع مفصلی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید یافت می شود بلکه ممکن است در دیگر بیماریهای اتوایمیون و موارد دیگری مانند: بیماریهای مزمن عفونی ، بیماریهای کبدی ، نیز در سرم ظاهر شود. با این وجود برای بررسی وضعیت بیمار مبتلا به روماتیسم مفصلی ، غالباً میزان آن در سرم اندازه گیری میشود . با استفاده از IgG می توان به جستجوی این فاکتور در سرم پرداخت. اما از آنجا که واکنش IgG با anti-IgG (RF) ، کمپلکس قابل مشاهده ای را ایجاد نمی کند برای قابل رویت کردن این کمپلکس بایستی IgG را به ذرات نامحلولی مثل لاتکس متصل کرد.

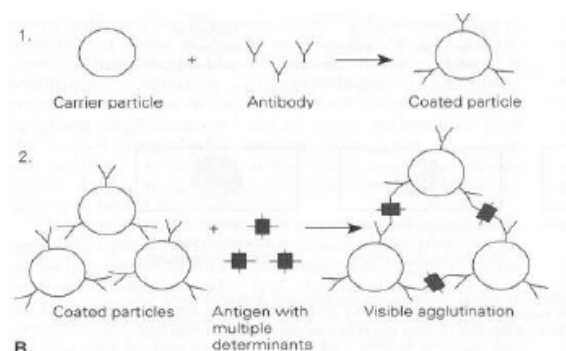
از بین روشهای مختلف تشخیص RF در سرم ، متداول ترین آنها روش آگلوتیناسیون پاسیو یا غیر فعال است . برای انجام این آزمایش می توان از کیت هائی که توسط شرکت های مختلف تهیه می شود استفاده کرد. در این کیت ها سوسپانسیون لاتکس حاوی IgG (که در اینجا بعنوان آنتی ژن عمل میکند)، کنترل مثبت و کنترل منفی به همراه اپلیکاتور و اسلاید وجود دارد. روش انجام آزمایش به این صورت است که که بر روی اسلاید، حجم مشخصی (مثلاً یک قطره) از سوسپانسیون لاتکس را در مجاورت حجم مساوی از سرم بیمار قرار میدهند و با اپلیکاتور بخوبی مخلوط می نمایند . بعد از ۲-۱ دقیقه حرکت ملایم اسلاید ، آنرا از نظر وجود آگلوتیناسیون بررسی می کنند .



ایجاد آگلوتیناسیون، یا توده ها و تجمعات ریز و درشت که حاصل واکنش آنتی ژن و آنتی بادی است ، به معنی وجود RF یا anti-IgG در سرم و واکنش با IgG موجود بر سطح لاتکس می باشد . عدم ایجاد آگلوتیناسیون که به صورت یک سوسپانسیون یکنواخت شیری رنگ مشخص می شود نشانگر عدم وجود RF در سرم است .



- همزمان با نمونه های سرم یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی نیز مورد آزمایش قرار می گیرد. کنترل مثبت به معنی وجود RF و کنترل منفی به معنی عدم وجود RF می باشد و نمونه سرم با این دو کنترل، مقایسه می گردد.



تست تشخیصی CRP (C-Reactive Protein)

CRP یکی از پروتئین های فاز حاد (Acute Phase Protein) است که بواسطه التهاب، ضایعات بافتی، برخی عفونت ها، اعمال جراحی، و یا سرطانها در سرم بیماران به میزان قابل توجهی افزایش می یابد. این پروتئین که در سرم افراد سالم نیز به مقدار بسیار جزئی وجود دارد توسط سلولهای کبدی ساخته شده و قادر است با پلی ساکاریدکپسول باکتری نوموکوک، ترکیب و رسوب نماید. CRP یک اوپسونین غیر اختصاصی است که قادر است با اتصال به میکروارگانیزمها، و نیز فعال کردن مسیر کلاسیک سیستم کمپلمان، در نهایت، موجب اوپسونیزاسیون آنها گردد و به نظر می رسد در دفاع بر علیه عفونت های نوموکوکی بخصوص قبل از بوجود آمدن آنتی بادی اختصاصی اهمیت داشته باشد. بعلاوه گفته می شود در ترمیم و بهبود ضایعات بافتی نیز دارای نقش مهمی می باشد.

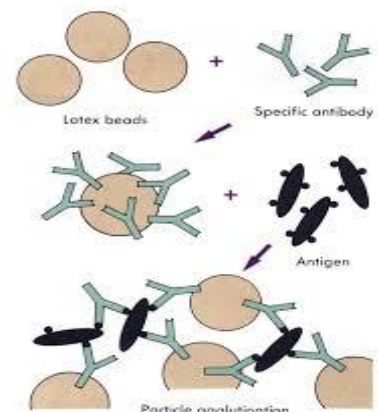
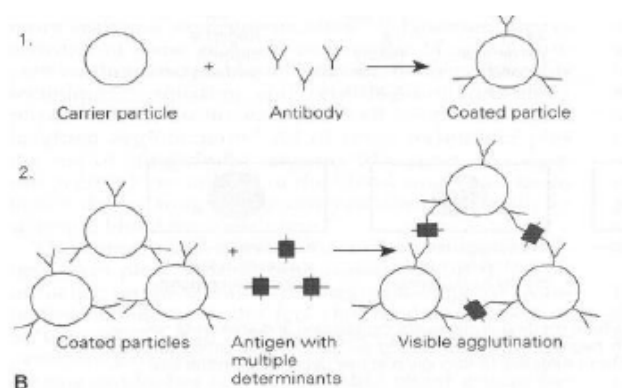
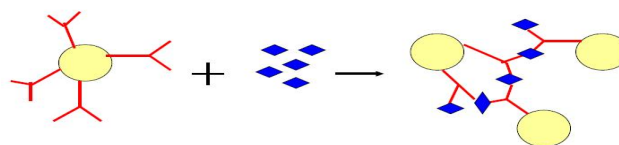
مثال هایی از افزایش CRP در سرم شامل: تب روماتیسمی حاد، روماتیسم مفصلی فعال، سکته قلبی حاد، برخی عفونت های ویروسی و باکتریایی، بعد از انجام عمل جراحی و می باشد. در سکته قلبی حاد، CRP مهمترین و حساسترین آزمایشی است که می توان با آن نشانه هائی از نکروز یا التهاب بافت عضلانی قلب را بدست آورد. اندازه گیری CRP در سرم نه تنها در تشخیص، مهم است بلکه در پیگیری وضعیت بیمار، سیر بیماری و ارزیابی تدابیر درمانی نیز اهمیت دارد. به این معنی که بعد از درمان و بهبودی، میزان این پروتئین در سرم، کاهش قابل توجهی را نشان میدهد.

روش متداول تشخیص CRP در سرم، روش آگلوتیناسیون غیر فعال (Passive Agglutination) است که با استفاده از کیت های تجاری انجام می شود. در این روش، anti-CRP را به ذرات لاتکس متصل کرده و حجمی از آن (یک قطره) را بر روی اسلاید ریخته و

با حجم مساوی از سرم بیمار مخلوط می کنند. بعد از ۲-۱ دقیقه حرکت ملایم اسلاید، نتیجه را مشاهده می نمایند. ایجاد آگلوتیناسیون (وجود توده های آگلوتینه شده در یک زمینه روشن) نشانه وجود CRP در سرم می باشد. عدم آگلوتیناسیون که با سوسپانسیونی کدر، شیری رنگ و یکنواخت مشخص میشود نشانه عدم وجود CRP در سرم است. کنترل مثبت و منفی نیز همزمان با نمونه های مجهول، مورد آزمایش قرار می گیرند.



از آنجا که در این تست، آنتی بادی به ذرات لاتکس، متصل می شود به این روش آگلوتیناسیون غیر فعال معکوس (Reversed Passive Agglutination) گفته می شود.



تست تشخیص بارداری " Pregnancy Test "

یکی از راههای تشخیص بارداری، تشخیص هورمون HCG (Human Chorionic Gonadotropin) در ادرار می باشد. HCG هورمونی از جنس گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۴۰۰۰۰ D است که در زمان بارداری توسط سلولهای Syncytiotrophoblast جفت تولید شده و در سرم و مایعات بدن قابل تشخیص است. این هورمون معمولاً حدود ۴۰ روز بعد از شروع بار داری (که بطور قراردادی ، اولین روز آخرین پریود در نظر گرفته می شود) در ادرار و قبل از آن در سرم ، ظاهر میشود . از نظر ساختمانی ، هورمون HCG از دو زیر واحد α و β که به وسیله سه پیوند غیر کووالانسی بهم مربوط شده اند ساخته شده است. اگر چه خاصیت بیولوژیک این هورمون مربوط به زنجیره β است اما این زنجیره به تنهایی فعال نیست. زنجیره α در ساختمان سه هورمون دیگر یعنی LH ، FSH و TSH نیز وجود دارد. زنجیره β در HCG اگر چه شباهت های زیادی (حدود ۸۰ درصد) با زنجیره β هورمون LH دارد اما در ناحیه کربو کسیلی انتهائی (C-terminal) خودش کاملاً اختصاصی است. بنابراین برای طراحی تست های تشخیصی، استفاده از آنتی بادی منوکلونال بر علیه این قسمت اختصاصی زنجیره β ، مناسب تر بوده و از ایجاد نتایج مثبت کاذب بواسطه Cross-reaction با LH جلوگیری خواهد نمود.

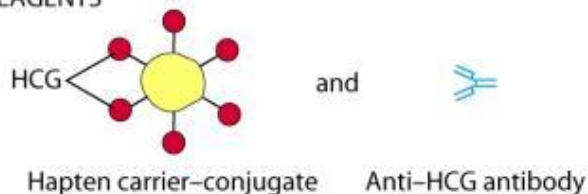
در یک حاملگی طبیعی بیش از ۹۰٪ از مولکولهای HCG در سرم بصورت کامل و مقدار کمی نیز بصورت قطعات زنجیره های آزاد α و β و نیز قطعات خرد شده وجود دارند. در ادرار ، نسبت زنجیره های آزاد α و β و شکسته ، به مولکول کامل، بیشتر از سرم است . در سه ماهه اول بارداری نسبت زنجیره β و در سه ماهه دوم و سوم آن، α بیشتر از دیگری است.

روش های سرولوژیک مختلف برای اندازه گیری HCG در سرم و ادرار وجود دارد که متداول ترین این روش ها روش ممانعت از آگلوتیناسیون یا " Passive Latex agglutination inhibition Test " می باشد که کیت های تشخیصی آن قابل تهیه است. این نوع کیت، حاوی سوسپانسیون لاتکس متصل به HCG ، کنترل مثبت، کنترل منفی و anti-HCG به همراه اسلاید و اپلیکاتور می باشد.

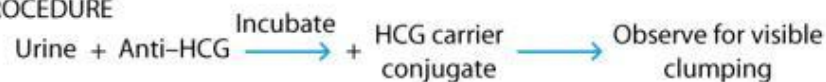
بطور خلاصه این تست در دو مرحله انجام می گیرد:

۱- مقدار کمی (یک قطره) از ادرار مشکوک را روی اسلاید ریخته و بعد آنتی بادی اختصاصی ضد HCG (anti-HCG) را به آن افزوده و با اپلیکاتور مخلوط می کنند و به مدت یک دقیقه اسلاید را به آرامی حرکت می دهند. سپس : ۲- ذرات لاتکس را که از هورمون HCG پوشیده شده است اضافه می کنند و مجدداً با اپلیکاتور مخلوط می کنند. پس از حدود دو دقیقه حرکت ملایم اسلاید، نتیجه را از لحاظ آگلوتیناسیون بررسی می نمایند. اگر HCG در ادرار موجود باشد به آنتی بادی اختصاصی خود متصل میشود . هورمون HCG محلول بوده و کمپلکس آن با آنتی بادی بصورت ذرات بسیار ریز رسوبی بوده که با چشم دیده نمی شود . ذرات لاتکس که در مرحله ۲ اضافه می شود بدلیل نبودن آنتی بادی (مصرف شدن آن و اتصال به HCG موجود در ادرار) بصورت آزاد باقی مانده و آگلوتیناسیون ایجاد نمی شود . اما اگر ادرار فاقد HCG باشد ، anti-HCG بطور آزاد باقی مانده و در مرحله بعد که ذرات لاتکس پوشیده از HCG اضافه میشود، با این ذرات ایجاد توده های آگلوتیناسیون می کند. پس در این تست، آگلوتیناسیون نشانه منفی بودن تست و عدم ایجاد آگلوتیناسیون نشانه مثبت بودن تست (وجود HCG در ادرار) می باشد.

KIT REAGENTS

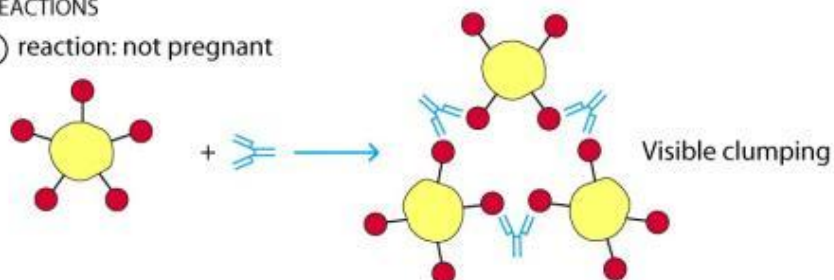


TEST PROCEDURE

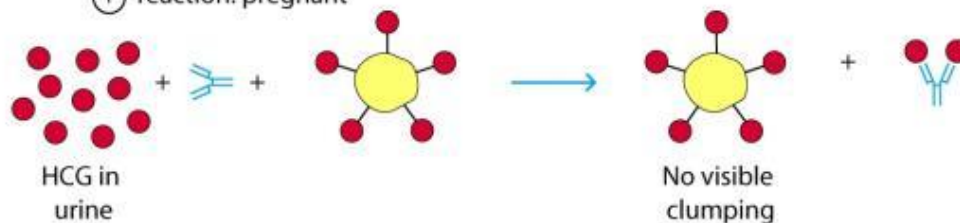


POSSIBLE REACTIONS

⊖ reaction: not pregnant



⊕ reaction: pregnant

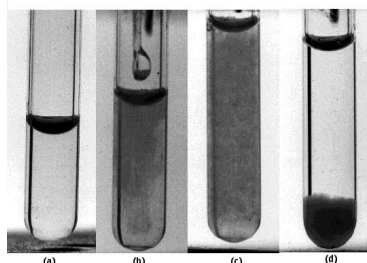


نتایج مثبت کاذب بواسطه افزایش LH بهر دلیل و منفی کاذب بواسطه رقیق بودن ادرار و یا کم بودن مقدار HCG در ادرار در اوایل بار داری (و یا هر علت دیگر) با استفاده از آنتی بادی منوکلونال قوی بر علیه اپی توپهای منحصر بفرد زنجیره بتای HCG و انجام تست در زمان مناسب، به حداقل رسیده است.

لازم به ذکر است که روش انجام برخی کیت های تشخیصی HCG، آگلوتیناسیون پاسیو معکوس می باشد که در این صورت ذرات لاتکس با anti-HCG پوشانده شده اند. اساس و روش انجام آزمایش در این نوع کیت مانند کیت تشخیص CRP می باشد.

واکنش های رسوبی (Precipitation)

واکنش آنتی ژن های محلول با آنتی بادی اختصاصی را واکنش های رسوبی می نامند. لازمه ایجاد این واکنش، آنتی بادی با حداقل دو ظرفیت و آنتی ژنهای چند ظرفیتی می باشد. واکنش های رسوبی را در محیط های مختلفی می توان انجام داد. در لوله آزمایش با مخلوط کردن آنتی ژن های محلول با آنتی بادی، رسوب در انتهای لوله تشکیل می شود.



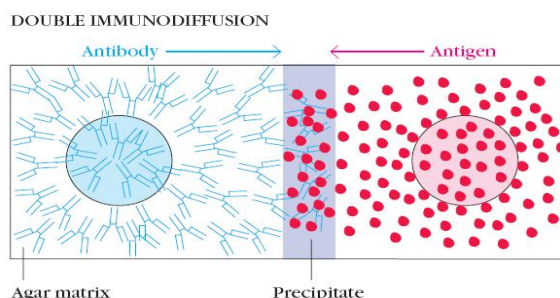
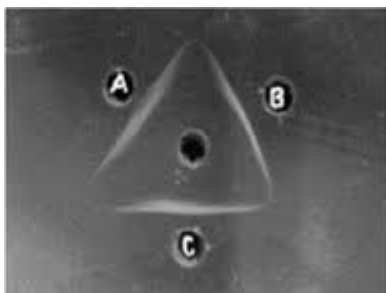
در صورتی که واکنش آنتی ژن محلول با آنتی بادی در محیط نیمه جامد ژل انجام شود به آن، واکنش رسوب در ژل گفته می شود (Gel Diffusion , Immunodiffusion). برای انجام این آزمایش ها ابتدا بایستی با استفاده از پودر آگاروز و بافر مخصوص، محیط ژل را آماده نمود. به این ترتیب که بسته به در صد مورد نظر، آگاروز را وزن کرده به بافر افزوده و تا ذوب کامل، حرارت می دهند. سپس قبل از سرد شدن و انعقاد آگاروز، بسته به آزمایش مورد نظر، آن را در ظرف مربوطه (که می تواند یک اسلاید یا یک پلیت باشد) میریزند و آنتی ژن و آنتی بادی را در محل مخصوص شان اضافه می کنند.

برخی از واکنش های ایمنودیفیوژن به صورت کمتی و برخی به صورت کیفی انجام می شود. در برنامه درس عملی، دانشجویان با یک نمونه از هر کدام از این دو نوع آشنا خواهند شد.

انتشار دوگانه

Double Diffusion

یکی از انواع واکنش های رسوبی در ژل، انتشار دوگانه است که به منظور بررسی روابط بین آنتی ژن و آنتی بادی انجام می شود. در این روش پس از تهیه آگاروز و ریختن آن در ظرف مناسب و انعقاد ژل، دو حفره را در مقابل هم و با فاصله مناسب از یکدیگر ایجاد کرده در یکی آنتی ژن محلول و در دیگری آنتی بادی را با حجم و غلظت مناسب می ریزند. آنتی ژن و آنتی بادی از درون حفره های مربوطه در تمامی جهات به درون ژل منتشر شده و از جهت مقابل یکدیگر در بین دو حفره، در ناحیه ی تعادل (Equivalence zone) که غلظت آنتی ژن و آنتی بادی متناسب یکدیگر است ، خط رسوب نامحلول تشکیل می شود خط رسوبی نمایانگر وجود ارتباط بین این دو می باشد. عدم ایجاد خط رسوبی نشانه عدم ارتباط آنتی ژن و آنتی بادی و یا استفاده از غلظت های نامناسب آنها و شرایط نامناسب دیگر مانند pH محیط می باشد. از آنجا که هر دو جزء واکنش یعنی آنتی ژن و آنتی بادی، هر دو در ژل حرکت کرده و منتشر می شوند به این آزمایش انتشار دوگانه گفته می شود. این آزمایش کیفی (qualitative) بوده و مقدار آنتی ژن یا آنتی بادی در آن سنجیده نمی شود. بلکه حضور آنتی ژن یا آنتی بادی اختصاصی در نمونه مشخص می گردد.



مواد و وسایل لازم:

پودر آگاروز ، بافر PBS ، anti – human gamma globulin (بعنوان آنتی بادی) ، Human gammaglobulin (بعنوان آنتی ژن) ، اسلاید شیشه ای ، پی پت ، فلاسک ، وسیله مخصوص پانچ ، محفظه مرطوب

روش انجام آزمایش:

- یک گرم آگاروز را به ۱۰۰ میلی لیتر بافر PBS افزوده حرارت دهید تا آگاروز کاملاً حل شده و محلول شفافی بدست آید.
- مقدار ۵ - ۴ میلی لیتر از محلول آگاروز را روی سطح اسلاید شیشه ای کاملاً تمیز که بر روی سطح صافی قرار گرفته است بریزید. بعد از سرد شدن آگاروز در دمای اتاق، اسلاید را به مدت یک ساعت در یخچال نگهداری کنید. این کار به منظور مقاوم شدن ژل در برابر شکنندگی انجام می شود.
- با استفاده از وسیله مخصوص پانچ، حفره هائی را روی ژل ایجاد کنید و آگاروز اضافی را با نوک سوزن بردارید.
- در حفره های مربوطه، آنتی ژن و آنتی بادی را اضافه کرده و به مدت ۷۲ - ۴۸ ساعت در یک محفظه مرطوب (wet chamber) و در دمای اتاق نگهداری کنید.
- بعد از مدت زمان فوق، ایجاد یا عدم ایجاد خط رسوبی بین حفره ها را بررسی کنید.

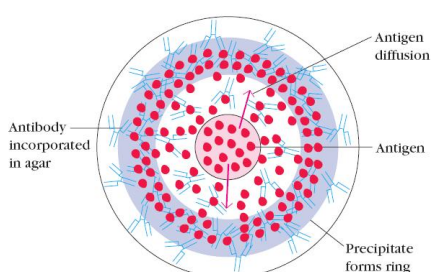
انتشار شعاعی ساده

"Single Radial Immunodiffusion"

یکی از واکنش های رسوبی در ژل روش SRID یا "انتشار شعاعی ساده" است که روشی کمی برای اندازه گیری پروتئین های مختلف سرم مانند انواع ایمونوگلوبولین ها و اجزای کمپلمان می باشد. در این روش آگاروز در مخلوط با آنتی بادی در پلیت های مخصوص ریخته شده و پس از سرد شدن آگاروز درون ظرف با استفاده از وسیله مخصوص پانچ، حفره هایی را دور تا دور آن ایجاد می کنند. بعنوان مثال برای اندازه گیری IgM سرمی، قبل از ریختن آگاروز آن را با anti-IgM مخلوط می کنند و سپس درون پلیت می ریزند. و بعد حجم

مشخصی از سرم های مورد آزمایش برای اندازه گیری IgM را درون حفره ها ریخته و بعد از مدت زمان ۲۴-۷۲ ساعت، دایره های رسوبی ایجاد شده را بررسی و قطر آنها را اندازه گیری می کنند. دایره ایجاد شده به دلیل پخش و انتشار (diffusion) IgM از درون حفره به تمام جهات اطراف می باشد که بر حسب مقدار IgM موجود در سرم، قطر این دایره متفاوت می باشد. به این معنی که هر چه قطر دایره رسوبی بیشتر باشد مقدار IgM سرم بیشتر و هر چه قطر دایره کمتر باشد مقدار IgM سرم کمتر خواهد بود. معمولاً همزمان با ریختن نمونه های مجهول، حداقل سه حفره را برای مقادیر مشخص و استاندارد IgM (یا هر پروتئین مورد نظر دیگر) در نظر گرفته و با اندازه گیری قطر دایره های رسوبی اطراف این سه حفره، منحنی استاندارد را بر اساس غلظت IgM در نمونه های استاندارد و مربع قطر مربوط به هر یک از آنها رسم می کنند. مقدار IgM در نمونه های مجهول با استفاده از منحنی استاندارد بدست می آید.

RADIAL IMMUNODIFFUSION



هم اکنون پلیت اندازه گیری ایمونوگلوبولین های مختلف (IgA, IgM, IgG)، برخی اجزای کمپلمان مثل C4 و C3 و حتی برخی دیگر از پروتئین های سرم مثل α_1 -antitrypsin بصورت آماده و تجارتي موجود است که بر حسب نیاز آزمایشگاهها از شرکت های سازنده تهیه می شود. از آنجا که یکی از اجزاء واکنش یعنی آنتی بادی که با ژل مخلوط شده (که در این مثال anti-IgM است)، ثابت بوده و تنها آنتی ژن (که در این مثال IgM می باشد) در ژل حرکت کرده انتشار می یابد و نحوه انتشار نیز بصورت شعاعی می باشد، به این آزمایش انتشار شعاعی ساده (single) گفته می شود.

مواد و وسایل لازم :

پلیت اندازه گیری ایمونوگلوبولین های مختلف (تجاری)، سرم، میکروپیپت، خط کش مخصوص، کاغذ میلیمتری (برای رسم منحنی استاندارد)

روش :

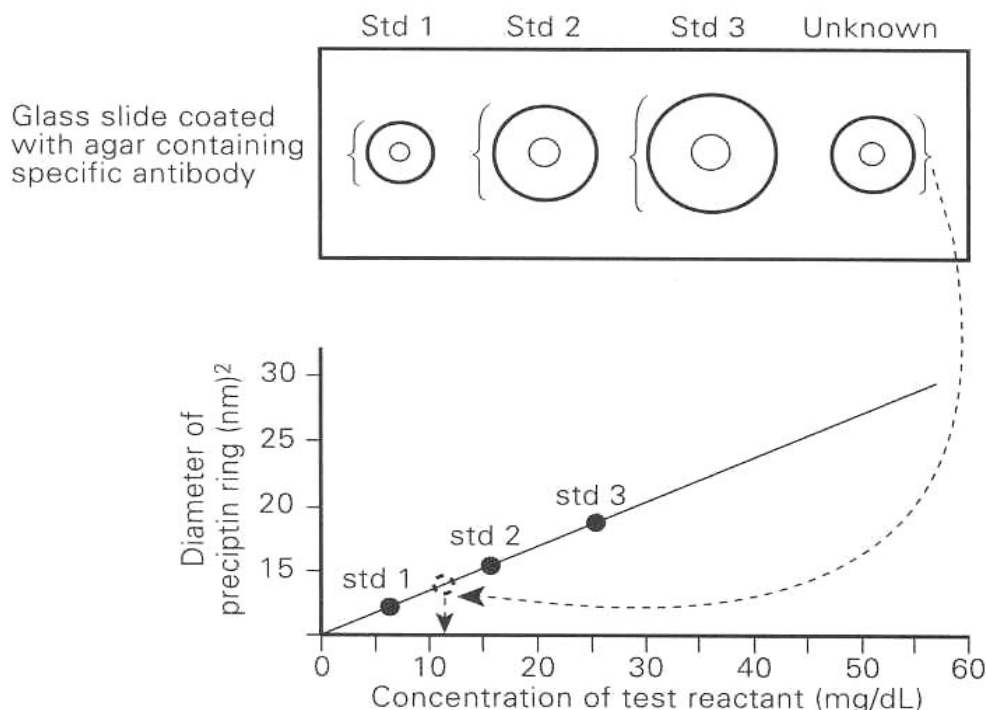
- پلیت اندازه گیری IgM یا را از یخچال بیرون آورده به دمای اتاق برسانید.

- درب پلیت را برداشته و در حفره شماره ۱ و ۳ به ترتیب حجم لازم (طبق دستور بروشور مربوطه) از استاندارد های شماره ۱ و ۳ (که غلظت آنها روی شیشه های مربوطه نوشته شده است)، و در بقیه حفره ها سرم های مورد آزمایش را بریزید.

- در پوش پلیت را محکم بسته و در دمای اتاق به مدت زمان لازم (طبق دستور بروشور مربوطه) قرار دهید.

- بعد از این مدت ، قطر هر یک از دایره های رسوبی ایجاد شده در اطراف حفره ها را اندازه گیری کرده و منحنی استاندارد را رسم کنید.

- سپس غلظت نمونه مجهول را با استفاده از منحنی استاندارد بدست آورید .



Immunoassays

امروزه با تکیه بر اختصاصی بودن واکنش آنتی ژن - آنتی بادی، تشخیص و اندازه گیری غلظت بسیاری از مولکولها میسر گردیده است . از آنجا که واکنش آنتی ژن - آنتی بادی همیشه بصورت ماکروسکوپی قابل رؤیت نیست آزمایش هایی طراحی شده اند که با استفاده از آنها می توان به تشخیص و تعیین غلظت مولکولهای محلول پرداخت و یا نحوه پراکندگی این مولکولها را بر روی بافت یا درون سلول، مورد مطالعه قرار داد. در تعدادی از این آزمایش ها با نشاندار کردن آنتی بادی اختصاصی علیه مولکول مورد نظر (که می تواند آنتی بادی یا آنتی ژن باشد) به بررسی آن می پردازند. این آزمایش ها که بطور کلی بنام Immuno Assays شناخته می شوند، بر اساس نوع ماده نشاندار مورد استفاده، اسامی متفاوتی دارند.

چنانچه برای نشاندار کردن آنتی ژن یا آنتی بادی از آنزیم استفاده شود به این آزمایش Enzyme Immuno Assay (EIA) گفته می شود. در این حالت پس از اتصال آنتی بادی (یا آنتی ژن) نشاندار به آنتی ژن (یا آنتی بادی) مورد نظر، سوبسترای آنزیم همراه با یک ماده کروموفور اضافه می گردد. میزان محصول تولید شده در این واکنش آنزیمی، متناسب با میزان مولکول محلول مورد مطالعه (آنتی ژن یا

آنتی بادی) موجود می باشد. از مهمترین آزمایش هائی که در این گروه قرار می گیرند می توان ELISA و Immunoperoxidase را نام برد.

چنانچه ماده نشاندار کننده، یک ماده فلورسنت باشد به این روش Immunofluorescent Assay (IFA) گفته می شود .

و اگر آنتی ژن یا آنتی بادی توسط یک ماده رادیواکتیو نشاندار شده باشد این روش را Radio Immuno Assay (RIA)

می گویند . از بین این آزمایش ها ELISA و IFA را انجام خواهید داد.

Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

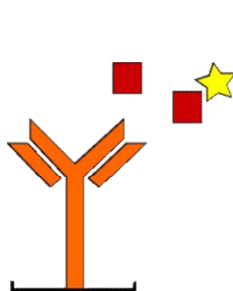
این روش از ادغام روش های ایمنولوژیک و اسپکتروفتو متری ایجاد شده و هدف آن تشخیص یا اندازه گیری غلظت مولکولهای محلول می باشد. روشی است با حساسیت بالا که امکان بررسی تعداد زیادی نمونه را به صورت همزمان فراهم می کند. در این روش معمولاً از یک سطح جامد برای اتصال و بی حرکت کردن مولکولهای مورد نظر استفاده می شود. سپس آنتی بادی (یا آنتی ژن) اختصاصی نشاندار شده توسط آنزیم به آن اضافه و نهایتاً سوبسترای آنزیم افزوده می گردد. سوبسترا غالباً همراه با یک ماده رنگ زا (chromogen) بوده و بدنبال تاثیر آنزیم بر روی سوبسترا ، یک محصول رنگی تولید میشود. با اندازه گیری میزان جذب نوری (OD = Optical Density) در طول موج مربوطه ی یک رنگ نهایتاً ایجاد شده، می توان به وجود مولکول مورد نظری برد. این کار در دستگاه اسپکتروفتو متر مخصوص الیزا بنام ELISA Reader انجام می شود. شدت رنگ ایجاد شده، انعکاسی از حضور یا عدم حضور مولکول مورد جستجو در نمونه مورد آزمایش می باشد. لازم به ذکر است که به منظور پاکسازی محیط از پروتئین ها و آنتی بادی های متصل نشده ای که باعث اختلال در نتایج نهائی خواهند شد، در بین مراحل آزمایش، شستشو با محلول بافر مخصوص، انجام می شود.

ELISA ممکن است بصورت کیفی (qualitative) و یا کمی (quantitative) انجام شود. در روش کیفی ، تنها مثبت یا منفی بودن آزمایش، مورد نظر است. به منظور تعیین مرز میان نمونه های مثبت و منفی، از معیاری بنام Cut-off point استفاده می شود که نماینده میانگین غلظت مولکول مورد نظر (آنتی ژن یا آنتی بادی) در افراد نرمال یک جمعیت است. چنانچه OD یک نمونه، بیشتر از cut-off باشد نمونه مثبت و چنانچه کمتر از آن باشد نمونه منفی گزارش می شود . در روش کمی، مقدار آنتی ژن یا آنتی بادی مورد آزمایش ، اندازه گیری میشود. با رسم منحنی استاندارد می توان الیزا را بصورت یک روش کمی در آورد. برای اینکار بایستی غلظت های مشخص و استاندارد از مولکول مورد مطالعه در دسترس باشد. پس از انجام آزمایش همزمان بر روی نمونه های استاندارد معلوم و نمونه های مربوط به بیماران، منحنی استاندارد بر اساس غلظت نمونه های استاندارد و OD های بدست آمده برای هر یک از آنها، رسم می شود . سپس OD مربوط به بیماران بر روی منحنی برده می شود و غلظت مربوط به هر یک از آنها تعیین می گردد. بطور معمول به منظور افزایش دقت و کنترل کیفی آزمایش، همزمان از یک یا چند نمونه کنترل مثبت و منفی استفاده می شود.

الیزا کاربردهای مختلفی دارد از جمله تشخیص بیماریهای عفونی بوسیله تعیین آنتی بادی بر علیه پاتوژن مورد نظر و یاشناسائی آنتی ژن خاصی از عامل عفونی، تشخیص بیماریهای خود ایمن با تعیین اتو آنتی بادی بر علیه اتو آنتی ژن مربوطه، تشخیص تومور مارکرها جهت بررسی وجود سرطانهای مختلف، تشخیص هورمونها برای بررسی اختلالات متابولیکی و

- الیزا با روش های مختلفی مانند مستقیم (Direct)، غیر مستقیم (Indirect)، ساندویچ (Sandwich)، و..... قابل انجام است. یکی از این روش ها روش رقابتی (Competitive) است که در آزمایشگاه امروز با استفاده از آن مقدار هورمون T4 در سرم تعیین می شود.

- الیزای رقابتی نیز با روش های مختلف انجام میشود که گاه آنتی ژن نشاندار و غیر نشاندار بر سر اتصال به آنتی بادی اختصاصی خود که بر روی سطح جامد فیکس شده، با یکدیگر رقابت می کنند (شکل ۱) و گاه آنتی بادی نشاندار و غیر نشاندار بر سر اتصال به آنتی ژن اختصاصی خود به رقابت می پردازند (شکل ۲).



شکل ۱



شکل ۲

- در آزمایشی که امروز برای تعیین مقدار T4 سرم انجام می دهید آنتی بادی (بر علیه T4) بر سطح جامد، فیکس شده و آنتی ژن غیر نشاندار (T4 موجود در سرم) و نشاندار (T4 نشاندار با آنزیم) بر سر اتصال به آن با یکدیگر رقابت می کنند (شکل ۱).

تشخیص هورمون تیروکسین (T4) در سرم با استفاده از T4 ELISA Kit

اساس این کیت به روش رقابتی (Competitive) می باشد. در این روش حفره ها توسط آنتی بادی منوکلونال بر علیه T4 پوشیده می شود. سپس در تعدادی از حفره ها نمونه های مورد آزمایش (سرم بیماران) و در چند حفره نیز استانداردهایی با غلظت های معلوم و مشخص T4 اضافه میگردد. بلافاصله به تمام حفره های فوق، T4 متصل به آنزیم (Conjugated T4) افزوده شده و برای مدت زمان معینی در دمای اتاق قرار داده می شود. در این مدت، T4 موجود در نمونه سرم (غیر نشاندار) و T4 متصل به آنزیم (نشاندار) در اتصال به آنتی بادیهای چسبیده به کف حفره، با یکدیگر رقابت می کنند. بنابراین هر چه مقدار T4 در نمونه بیشتر باشد مقدار T4 نشاندار کمتری به آنتی بادیهای چسبیده به کف، متصل می گردد و بالعکس. پس از افزودن سوبسترا و کروموژن، رنگی ظاهر می شود که به صورت معکوس با غلظت T4 موجود در نمونه ها متناسب است. برای جلوگیری از فعالیت بیش از اندازه ی آنزیم، محلول متوقف کننده افزوده می گردد و نهایتاً "رنگ زرد ایجاد میشود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. میزان جذب نوری حفره ها توسط ELISA Reader در این طول موج اندازه گیری می شود و به کمک استانداردهایی با غلظت معلوم T4 که همزمان با نمونه های سرم در تعدادی از حفره ها قرار داده شده اند منحنی استاندارد رسم می شود و T4 نمونه های سرم با مراجعه به منحنی، تعیین می گردد.

روش انجام آزمایش:

۱- ۲۵ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر حفره بریزید.

۲- سپس ۵۰ میکرولیتر Assay buffer و به دنبال آن ۵۰ میکرولیتر T4 کونژوگه با آنزیم را داخل حفره ها ریخته و پس از مخلوط کردن کامل محتویات هر حفره، به مدت یک ساعت در دمای اتاق و در تاریکی قرار دهید.

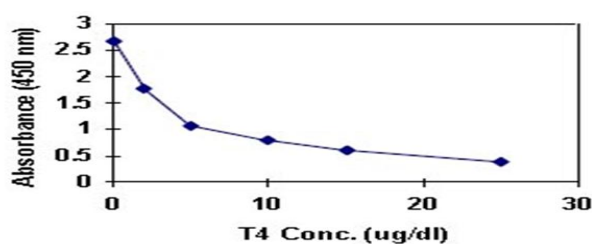
۳- محتویات حفره ها را خالی کرده و حفره ها را ۵ بار با بافر شستشو بشوئید.

۴- ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترای همراه با کروموزن را به هر حفره افزوده و آن را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری نمائید.

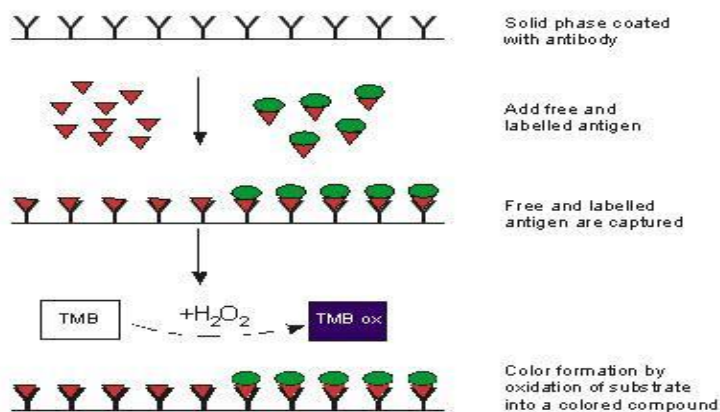
۵- با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر حفره، واکنش را متوقف کنید.

۶- بوسیله دستگاه ELISA Reader ، میزان جذب نوری حفره ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری نمائید. می توان به کمک برنامه ای که به دستگاه داده می شود منحنی استاندارد و مقادیر T4 موجود در نمونه ها را بدست آورد.

***یاد آوری می شود که مقادیر بکار رفته در روش فوق، بسته به کیت مورد استفاده، ممکن است متفاوت باشد که برای هر کیت، بایستی مطابق دستور کار آن عمل نمود.



Competitive Enzyme Immunoassay



Immunofluorescent Assay (IFA)

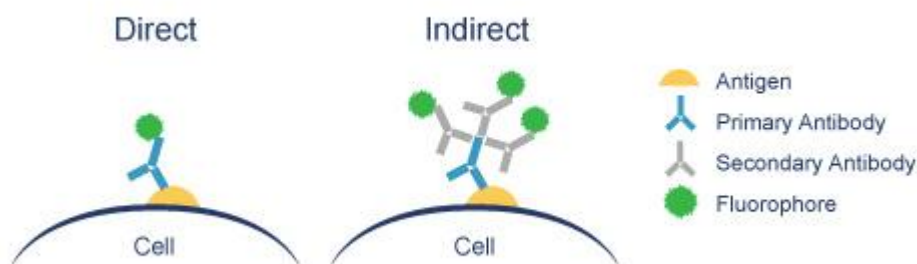
از ویژگی اتصال اختصاصی آنتی ژن و آنتی بادی، می توان برای تشخیص حضور یا عدم حضور آنتی ژن یا آنتی بادی روی سطح سلول یا بافت استفاده نمود. به اینگونه روش ها Immunohistochemistry گفته میشود که شامل روش های آزمایشگاهی جهت تعیین محل آنتی ژن یا آنتی بادی در یک مقطع بافتی یا روی سطح یک سلول با استفاده از آنتی بادیهای نشاندار شده می باشد. در صورتیکه این ماده نشاندار کننده، یک آنزیم باشد تست را بنام Immunoperoxidase می خوانیم و اگر یک ماده فلورسنت باشد نام تست Immunofluorescent می باشد.

مواد فلورسنت موادی هستند که زمانی که در معرض نوری یا یک طول موج مشخص قرار می گیرند تحریک شده (excitation) نوری با طول موج بالاتر را از خود ساطع می کنند (emission). در هر جسم فلورسنت همواره طول موج نور فلورسنت ایجاد شده از طول موج پرتو های تحریک کننده بلند تر است. این نور ساطع شده تا زمانی که تحریک ادامه دارد خاموش نمی شود و به محض تمام شدن تحریک، نور خاموش می شود از متداول ترین مواد فلورسنت : فلورسین ایزوتیاسیانان (FITC) است که حداکثر میزان جذب نور آن در طول موج بین ۴۹۵-۴۹۰ نانومتر بوده و بازتاب شده آن، نور سبز رنگی با طول موج حدود ۵۲۵ nm است. ماده دیگر رودامین (Rheudamine) است که میزان حداکثر جذبش در ۵۴۷-۵۴۰ نانومتر بوده و نور ساطع شده از آن، در حدود ۶۲۰ نانومتر با رنگ نارنجی می باشد. از این مواد فلورسنت برای نشاندار کردن آنتی بادیها در جهت تشخیص محل آنتی ژن در سلول یا بافت استفاده می شود. این آنتی بادی نشاندار بعد از مجاورت با آنتی ژن خاص خودش در سلول یا بافت به آنها متصل شده و یک ایمون کمپلکس پایدار را بوجود می آورد. به کمک شستشو، پروتئین های غیر اختصاصی و آنتی بادیهای متصل نشده به آنتی ژن، شسته شده از محیط خارج می شوند و کمپلکس های باقیمانده، به کمک میکروسکوپ فلورسنت، مورد بررسی قرار می گیرند. در این حالت در یک زمینه تاریک، کمپلکس های آنتی ژن-آنتی بادی فلورسنت، نور روشنی را از خود ساطع می کند و به این ترتیب، موقعیت آنتی ژن (یا اتوآنتی بادی) در بافت یا سلول و نیز نحوه و میزان پراکندگی آن، تشخیص داده می شود. در میکروسکوپ فلورسنت منبع نور، پرتو ماوراء بنفش بوده که توسط ماده فلورسنت جذب شده و نور طول موج بلند تری در طیف مرئی ساطع میگردد.

تست ایمونوفلورسنت به روش های مختلفی انجام می گیرد که از آن جمله روش مستقیم و غیر مستقیم است.

- در روش مستقیم (direct)، آنتی بادی نشاندار، مستقیماً به نمونه بافتی یا سوسپانسیون سلولی، اضافه می شود. مثالی از این روش، تشخیص بیماری پوستی پمفیگوس با استفاده از نمونه پوستی فرد بیمار است که به واسطه رسوب IgG و کمپلمان بین سلولهای اپیدرمال پوست، با افزودن آنتی بادیهای ضد IgG یا کمپلمان، در نواحی بین سلولی (intercellular) در اپیدرمیس، فلورسنس مشاهده می شود.

- در روش غیر مستقیم (indirect)، پس از تهیه مقطع بافتی یا سوسپانسیون سلولی حاوی آنتی ژن، آنتی بادی غیر نشاندار (بعنوان مثال، آنتی بادی موجود در سرم)، بر روی مقطع افزوده می گردد. پس از شستشو و حذف آنتی بادیهای متصل نشده، یک آنتی بادی نشاندار شده با ماده فلورسنت بر علیه آنتی بادی اول به مقطع اضافه می شود. (اصطلاحاً به این آنتی بادی، Conjugated Ab یا Second Ab گفته می شود) و پس از شستشو و حذف آنتی بادیهای نشاندار متصل نشده، نهایتاً با بافت و یا سلول میکروسکوپ فلورسنت مورد مطالعه و بررسی قرار می گیرد.



از جمله کاربرد های روش غیر مستقیم که از حساسیت بیشتری نسبت به روش مستقیم نیز برخوردار است می توان به موارد زیر اشاره نمود:

- تشخیص بیماریهای عفونی (وجود آنتی بادیها در سرم بر علیه برخی عوامل عفونت زا)
- بررسی مارکر های سطح سلولی لنفوسیتها .
- بررسی حضور برخی اتو آنتی بادیها مثل آنتی بادیهای ضد هسته ای (Anti-nuclear Antibody) (ANA) و برای تشخیص بیماری سیستمیک لوپوس اریتماتوز (SLE)

در آزمایشگاه امروز تست تشخیص ANA به روش غیرمستقیم را انجام خواهید داد.

تشخیص ANA به روش IFA غیر مستقیم

آنتی بادیهای ضد اجزای تشکیل دهنده هسته سلول (Anti-nuclear Antibodies)، شامل آنتی بادی بر علیه DNA ، RNA و پروتئین های هسته ای مختلف می باشد که در سرم بیماران مبتلا به برخی بیماریهای اتو ایمنی سیستمیک و از آن جمله بیماران مبتلا به لوپوس سیستمیک (Systemic Lupus Erythematosus ، SLE) به میزان زیادی یافت می شود.

برای تشخیص این آنتی بادیها به روش غیرمستقیم ، ابتدا بر روی اسلاید های میکروسکوپی، سلول هایی با هسته درشت فیکس می شوند. امروزه برای این کار از یک رده ی سلولی (Cell line) خاص بنام HEP-2 استفاده می گردد که دارای هسته ای مشخص و درشت بوده و می تواند به عنوان منبع آنتی ژن در این تست مورد استفاده قرارگیرد. بعد از ثابت کردن سلولها بر روی اسلاید، سرم بیماران احتمالا (آنتی بادی اول) اضافه شده و برای مدت معینی در دمای آزمایشگاه قرار داده می شود. سپس شست و شوی اسلایدها جهت حذف آنتی بادیهای متصل نشده، انجام می شود. در مرحله بعد، آنتی بادی دوم (آنتی بادی ضد آنتی بادی اول که با ماده فلورسنت نشاندار شده)، افزوده شده و پس از مدتی معین، شست و شوی اسلایدها جهت حذف آنتی بادیهای نشاندار متصل نشده انجام می شود. سپس نمونه ها زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد مطالعه قرار می گیرند. نمونه های مثبت در زیرمیکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز درخشان ظاهر میشوند.

اگر چه تست ANA در بسیاری از موارد لوپوس ، مثبت است اما در مواردی نیز بیماران لوپوس با ANA منفی گزارش شده اند. از طرف دیگر این تست در بیماریهای سیستمیک دیگری مانند روماتیسم مفصلی ، اسکلرودرما، سندرم شوگرن (Sjogren's syndrome) نیز غالباً مثبت می باشد. بنابراین تاریخچه ی کامل پزشکی فرد، معاینات بدنی، و نتایج دیگر آزمایش ها در کنار آزمایش ANA به

تشخیص بیماری های خودایمن کمک می کند. برخی افراد سالم نیز ممکن است مقدار افزایش یافته ای از ANA را در خون خود داشته باشند همچنان که افزایش سطح ANA در برخی افراد مسن مشاهده می شود.

الگوهای رنگ پذیری (Staining Patterns)

با مطالعه نمونه ها در زیر میکروسکوپ، الگوهای رنگ پذیری (Staining Patterns) مختلفی قابل مشاهده است. به این معنی که :

- گاهی هسته سلول بصورت یکدست و یکنواخت درخشندگی فلورسنت دارد که ترکیب اتوانتی بادیهای مختلف (بر علیه DNA دورشته ای و DNA تک رشته ای و هیستون ها و.....) می تواند چنین طرحی را ایجاد کند. به این نوع رنگ پذیری Homogenous Pattern (الگوی طرح یکنواخت) گفته می شود.

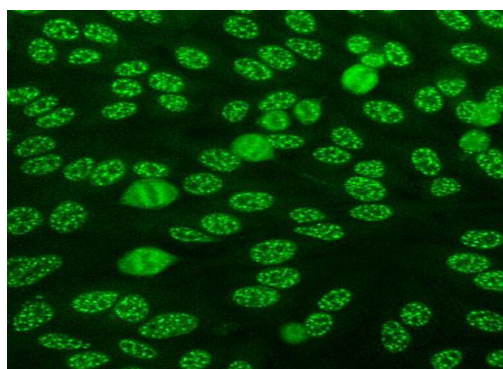
- در برخی نمونه های مثبت، در هسته لکه ها ئی که فلورسنس شدیدتری نسبت به بقیه ی هسته دارند مشاهده می شود که به آن Speckled Pattern (الگوی خالدار یا نقطه ای) گفته می شود.

- گاهی نیز سنترومرها رنگ فلورسنت را به خود گرفته اند که بصورت لکه های درخشان در هسته دیده می شوند (لکه هائی با اندازه بزرگ تر و تعداد محدودتری نسبت به طرح خالدار) (Centromeric Pattern)

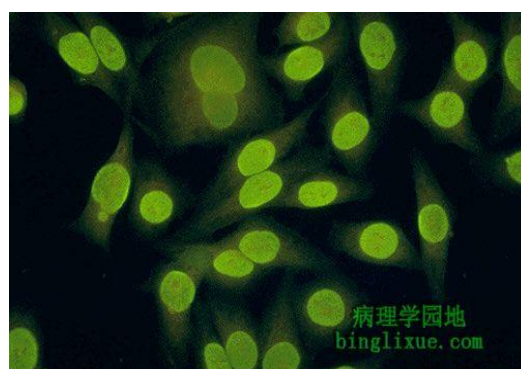
- اگر هستک ها فلورسنس شدیدتری را نشان دهند که نشانه آنتی بادیهای ضد هستکی است به آن الگوی طرح هستکی یا Nucleolar Pattern گویند.

- ممکن است غشای هسته، فلورسنس شدیدتری داشته که این فلورسنس هر چه به مرکز هسته می رسد ضعیف تر می شود. این نوع رنگ پذیری نیز (Rim) Peripheral Pattern نام دارد.

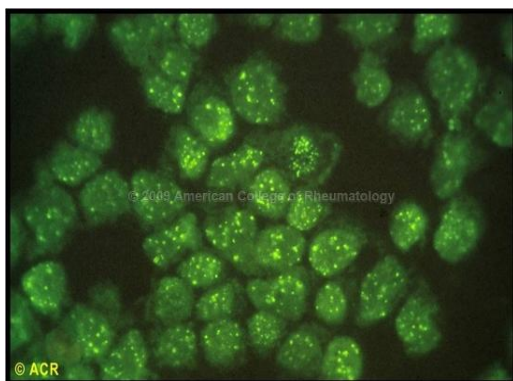
- هر یک از الگوهای رنگ پذیری فوق، در یک یا چند بیماری سیستمیک روماتوئیدی وجود داشته و می تواند در تشخیص افتراقی آنها کمک کند. به عنوان مثال الگوی هوموژنوس با تیترا بالا در SLE و با تیترا پائین در RA و SLE ، الگوی Speckled در روماتیسم مفصلی (RA) و SLE و سندرم شوگرن، الگوی هستکی در اسکلرودرما و شوگرن، و الگوی پریفرال در SLE قابل مشاهده است.



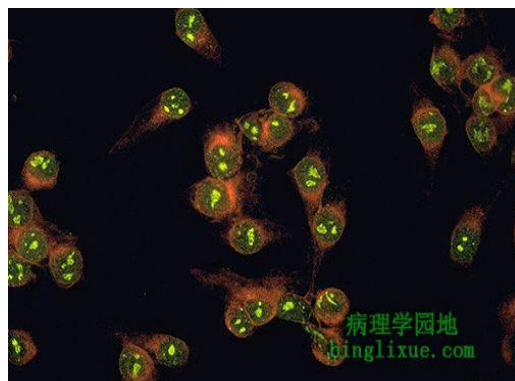
Homogenous Pattern



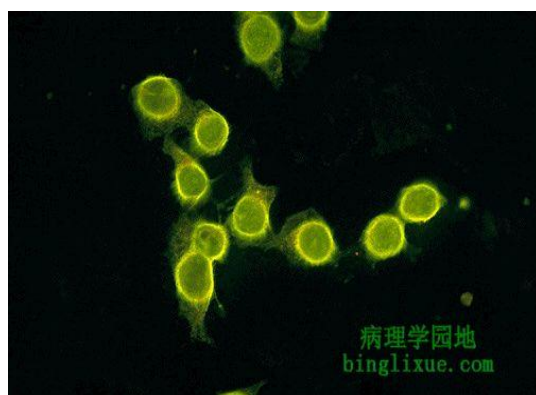
Speckled Pattern



Nucleolar Pattern



Centromeric Pattern



(Rim) Peripheral Pattern

تشخیص ANA به روش IFA غیر مستقیم

مواد و وسایل مورد نیاز

روش کار:

- ۱- بافر PBS را به میزان ۱ / ۲۰ رقیق کنید. (۱ قسمت PBS + ۱۹ قسمت آب مقطر)
- ۲- سرم بیماران را با PBS به میزان ۱ / ۴۰ رقیق کنید (۲۵μl سرم + ۹۷۵μl بافر PBS)
- ۳- اسلایدها را از یخچال بیرون آورده به دمای اتاق برسانید.
- ۴- فویل اطراف اسلایدها را جدا کرده و آنها را در یک محفظه مرطوب قرار دهید. ۲۵ میکرولیتر از کنترل ها (بدون رقیق کردن) و سرم رقیق شده بیماران (آنتی بادی اول) را بر روی حفره های اسلاید اضافه کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
- ۵- اسلاید ها را به مدت ۱۰ دقیقه با PBS شستشو دهید.

۶- اطراف حفره ها را خشک کرده و به محفظه مرطوب برگردانید و سریعاً یک قطره از آنتی بادی دوم (Anti- Human Ig – FITC conjugated) بر روی آنها افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۷- شستشو را مانند مرحله ۶ انجام دهید. بهتر است در این مرحله، یک ماده ی رنگی بنام Evans Blue به بافر شستشو اضافه شود. این عمل برای افزایش درخشندگی اختصاصی انجام می شود.

۸- اطراف حفره ها را خشک کرده به هر حفره، mounting medium افزوده و روی آنها را با لامل بپوشانید.

۹- اسلایدها را زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده نمایید.

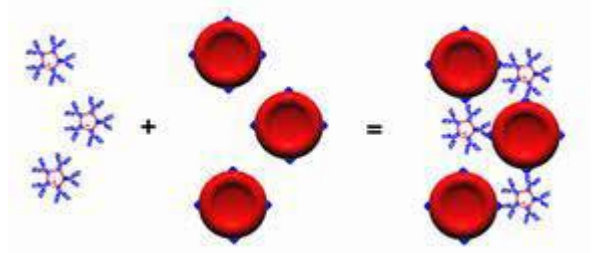
تعیین گروه های خونی و آزمایش RBC Cross-match

اساس تعیین گروههای خونی واکنش آگلوتیناسیون است. با استفاده از آنتی بادیهای ضد آنتی ژنهای گروه خونی و انجام آگلوتیناسیون مستقیم (Direct)، می توان گروههای ABO و Rh هر فرد را مشخص نمود. آگلوتیناسیون غیر مستقیم (Indirect) نیز برای انجام آزمایش تعیین گروه خونی و نیز کراس مچ جهت انتقال خون، مورد استفاده قرار می گیرد. در این جلسه با روش تعیین گروههای خونی و چگونگی انجام آزمایش کراس مچ آشنا خواهید شد.

روش تعیین گروه های خونی:

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

۱- روش مستقیم (Front type , Cell type , Direct type): در این روش از سلول (گلبول قرمز) فرد استفاده می شود. این روش معمولاً روی اسلاید انجام می شود .



۲- روش غیر مستقیم (Back type , Reverse type , Indirect type): در این روش از سرم فرد که حاوی آنتی بادی های طبیعی ضد آنتی ژنهای سیستم گروه خونی ABO هست استفاده می شود. این روش در لوله آزمایش انجام می شود.

Direct slide test:

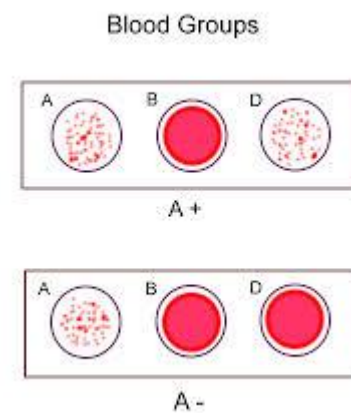
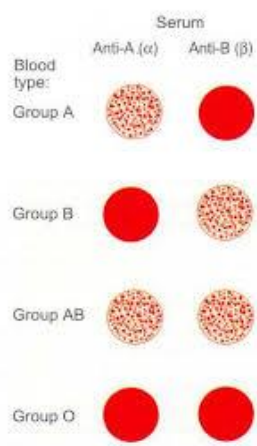
- دو اسلاید تمیز را روی میز آزمایشگاه قرار دهید.

- سه قطره خون فرد را روی اسلاید (دو قطره را روی یک اسلاید و قطره سوم را روی اسلاید دوم) قرار دهید.

- به قطرات خون روی اسلایدها ، Anti A ، Anti B , Anti D (Anti Rh) اضافه کنید.

- باکمک اپلیکاتور خون و آنتی بادیها را مخلوط کنید (دقت کنید سر اپلیکاتور را روی قطرات متفاوت ننزید).

- اسلایدها را در دست گرفته و بالای یک کاغذ سفید به مدت ۳۰ ثانیه به طور افقی حرکت دورانی دهید و نتیجه را جهت آگلو تیناسیون بررسی کنید .



Indirect tube test:

- روش غیر مستقیم: این روش بدلیل عدم حساسیت کافی روی اسلاید انجام نمی شود و تنها درون لوله آزمایش تست می شود.

- دو لوله آزمایش را با شماره های ۱ و ۲ مشخص کنید.

- به لوله شماره ۱ یک قطره سوسپانسیون ۵٪ گلبول قرمز با گروه خونی A اضافه کنید.

- به لوله شماره ۲ یک قطره سوسپانسیون ۵٪ گلبول قرمز با گروه خونی B اضافه کنید.

- به لوله شماره ۱ و ۲ یک قطره سرم فرد مورد آزمایش را اضافه کنید.

- لوله ها را به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ نموده و نتیجه را جهت آگلو تیناسیون بررسی کنید.

در این روش Rh مشخص نمی شود چون به طور طبیعی آنتی بادیهای ضد Rh در سرم وجود ندارد.

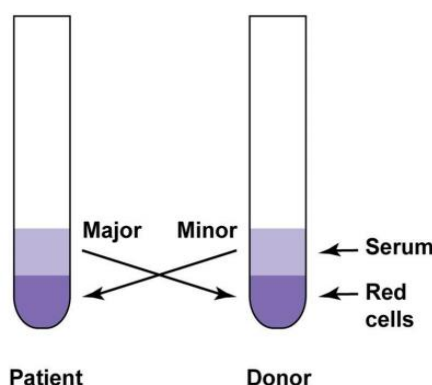
آزمایش کراس مچ گلبولهای قرمز خون (Blood group cross match) :

این تست که بین دهنده و گیرنده خون انجام می شود برای تعیین انواع آنتی بادی هایی است که ممکن است در انتقال خون مشکل ایجاد نمایند. این تست معمولاً روی سرم و گلبول گیرنده و سرم و گلبول هر کیسه خون به طور جداگانه انجام می شود.

آزمایش کراس مچ به دو منظور انجام می شود :

۱. بمنظور کشف اشتباهاتی که در تعیین گروه خون سیستم ABO , RH صورت گرفته است .
۲. برای نشان دادن آنتی کورهای بکار می رود که بطور طبیعی ویا در اثر ایمنی در سرم بیماران بوجود آمده وفعالانه بر علیه گلبول های اهداء کننده خون عمل می کنند و قابل پیش بینی نیستند .

قبل از انتقال خون و بعد از تعیین سیستم گروه خونی ABO گیرنده و دهنده خون به دو روش مستقیم و غیر مستقیم و تعیین Rh، باید جهت احتمال وجود آنتی بادهای خارج از انتظار، آزمایش کراس مچ یا سازگاری گروه خون را انجام داد. این آزمایش به دو صورت major و minor انجام می شود. در آزمایش کراس مچ major گلبولهای قرمز دهنده خون را در مقابل سرم گیرنده خون قرار می دهند ولی در کراس مچ minor بر عکس سرم دهنده خون را در مقابل گلبولهای قرمز گیرنده خون قرار می دهند. از آنجاکه خون به صورت Pack cell به گیرنده تزریق می شود معمولاً کراس مچ بصورت major انجام می گیرد و کراس مچ minor کاربرد چندانی ندارد.



روش انجام آزمایش Major cross match :

یک نمونه خون و یک نمونه سرم مجهول در اختیارتان قرار داده خواهد شد.

قبل از انجام آزمایش باید نمونه خون را شستشو داده و از آن سوسپانسیون ۵٪ درست کنید.

این آزمایش در سه مرحله به ترتیب زیر انجام می گیرد:

الف - مرحله اول یا فاز سرم فیزیولوژیک :

- یک لوله آزمایش کوچک سرولوژی را کد گذاری کنید و دو قطره سرم مجهولی که در اختیارتان قرار داده شده است را در آن بریزید.
- یک قطره از سوسپانسیون ۵٪ گلبولهای قرمز مجهول را که خودتان تهیه کرده اید را به آن افزوده و لوله را تکان دهید و سپس در حرارت اتاق به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه قرار دهید .
- لوله ها را برای مدت کوتاهی (۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه) سانتریفیوژ کنید.
- محلول رویی لوله را برای همولیز احتمالی نگاه کنید. سپس به آرامی لوله را تکان دهید و در صورت وجود آگلوتیناسیون نتایج را یادداشت نمایید.
- در صورتیکه همولیز و یا آگلوتیناسیون مشاهده نشد مرحله دوم آزمایش را شروع کنید.

ب- مرحله دوم یا فاز گرما و آلبومین:

- به لوله مرحله قبل دو قطره محلول آلبومین گاوی ۳۰٪ اضافه کرده و تکان دهید.
- لوله را به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه در حمام بخار ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید.
- لوله ها را برای مدت کوتاهی سانتریفیوژ کنید.
- لوله ها را به آرامی تکان دهید و نتیجه را در صورت بروز آگلوتیناسیون یادداشت کنید.
- در صورتیکه آگلوتیناسیون مشاهده نشد مرحله سوم را شروع کنید.

ج- مرحله سوم یا فاز سرم کومبز یا آنتی گلوبولین:

- لوله ها را با سرم فیزیولوژیک شستشو دهید.
- پس از شستشو محلول رویی را با کمک پاستور پی پت و یا وارونه کردن لوله خارج نمایید و کاملاً خشک کنید.
- به لوله ها یک تا دو قطره سرم کومبز اضافه کنید و سپس مخلوط کنید.
- لوله ها را به مدت کوتاهی سانتریفیوژ کنید و بالای یک کاغذ سفید با زدن ضربات آرام جهت آگلوتیناسیون بررسی کنید و در صورت مشکوک بودن، محتویات لوله ها را روی لام ریخته و با میکروسکوپ بررسی کنید و نتیجه را یادداشت کنید.

*** اگر نتیجه تمام مراحل کراس مچ منفی باشد خون دهنده و گیرنده سازگار می باشد و می توان انتقال خون را انجام داد در غیر این صورت خون قابل انتقال نیست.

اصول آزمایش:

در یک سوسپانسیون مخلوط متشکل از سلولهای مختلف، مانند خون، این سلولها توسط بارهای همسان سطحی از یکدیگر دور نگه داشته میشوند، چرا که در غیر این صورت، سلولها به یکدیگر چسبیده و امکان شناوری و غوطه وری را نخواهند داشت. در صورتیکه آنتی بادیهای موجود در سرم گیرنده از نوع IgM باشند (بدلیل پنتامر بودن و اندازه بزرگ مولکول) این نوع آنتی بادی قادر است

گلبولهای قرمز خون را (که بواسطه بارهای منفی سطحی از یکدیگر دورند) به یکدیگر نزدیک نموده و ایجاد آگلوتیناسیون نماید. اما اگر آنتی بادیهای موجود در سرم گیرنده از نوع IgG باشند این آنتی بادیها بدلیل منومر بودن و اندازه کوچک، قادر به نزدیک کردن گلبولهای قرمز به یکدیگر نمی باشند. بنا براین در مرحله دوم که فاز شناسائی آنتی بادیهای IgG است از آلبومین استفاده می گردد. گفته می شود آلبومین با افزایش ثابت دی الکتریک محیط واکنش و کاهش پتانسیل زتای گلبولهای قرمز باعث نزدیک شدن آنها به یکدیگر می شود.

* ثابت دی الکتریک ضریب ثابتی است که با افزایش آن، آنیونها و کاتیونهای محیط، براحتی از هم جدا شده و با کاهش آن، نسبت به یکدیگر جاذبه بیشتری خواهند داشت.

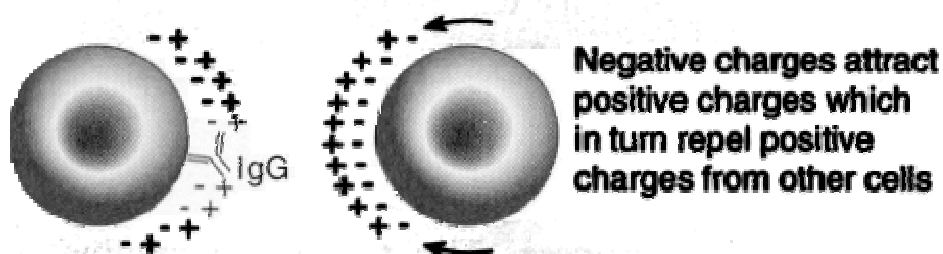
* پتانسیل زتا به بارهای منفی اطراف غشاء گلبولهای قرمز اطلاق می شود که به صورت طبیعی باعث ایجاد نیروی دافعه بین این سلولها می شود. بار منفی گلبول های قرمز ناشی از اسید سیالیک در غشای این سلولها است اما بار مثبت که در این بین درگیر است ناشی از دو عامل زیر است :

۱- کاتیون های آزاد سیتوپلاسم

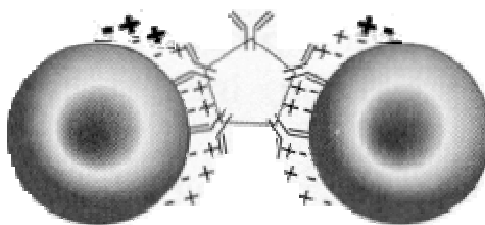
۲- کاتیون های متصل به گلبول های قرمز

نیروی دافعه و جاذبه بین این دو کاتیون و آنیون باعث ایجاد پتانسیلی به نام پتانسیل زتا می شود. این پتانسیل گلبول های قرمز را در یک فاصله معین در کنار هم نگه می دارد و از آنجا که بار منفی در این ماجرا بر بار مثبت مقداری برتری دارد باعث می شود تا گلبولها در یک فاصله معین و دقیق در اطراف هم قرار بگیرند.

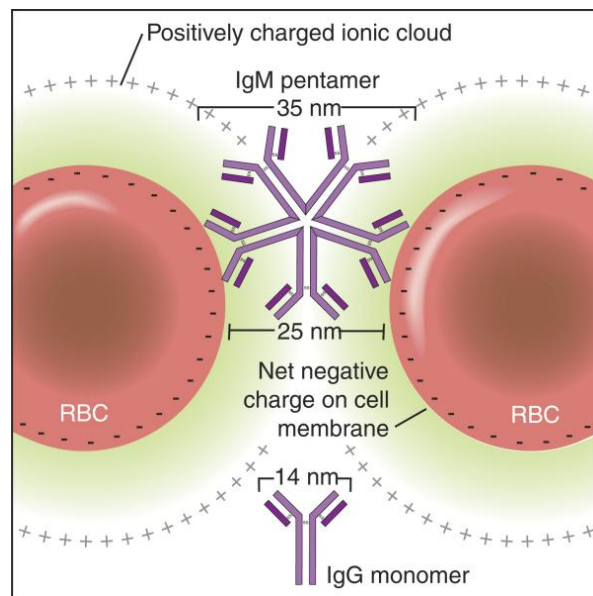
Ionic charges on the surface of red cells keep them separated



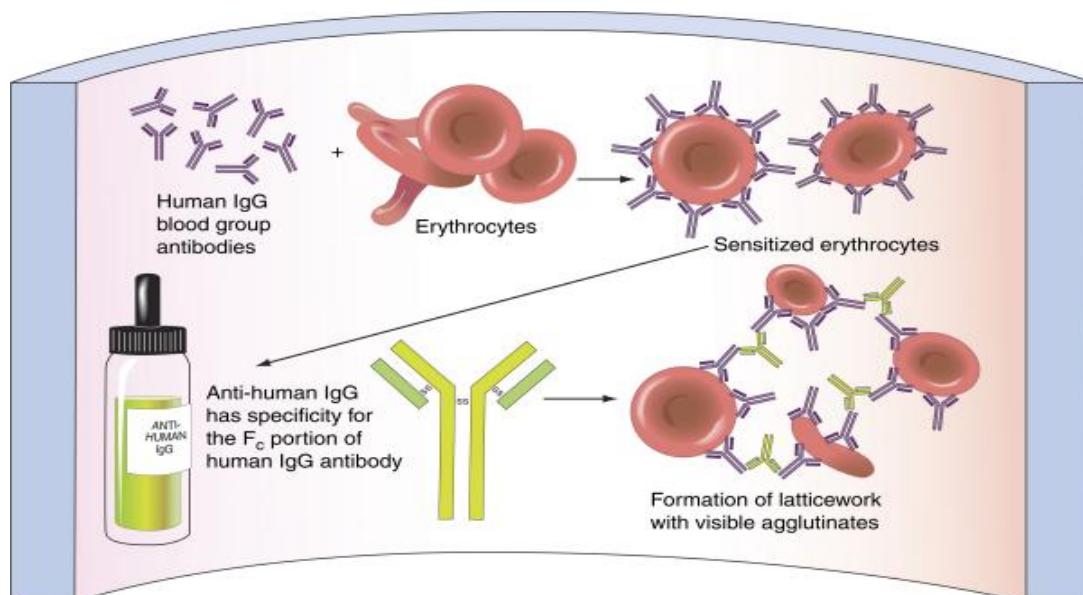
A IgG cannot bridge the space between red cells because it is too small a molecule



B IgM is large enough to bridge the space between red cells



برخی از آنتی بادیهای IgG که به آنها آنتی بادی ناقص یا بلوکان می گویند حتی با استفاده از تقویت کننده هائی مثل آلبومین هنوز قادر به ایجاد آگلوتیناسیون قابل تشخیص نمی باشند. به همین دلیل در فاز سوم از آنتی گلوبولین استفاده می شود. آنتی گلوبولین با متصل شدن به IgG های چسبیده به گلبولهای قرمز به صورت پل عمل می کند و باعث نزدیک شدن این سلولها به یکدیگر و ایجاد آگلوتیناسیون می گردد.



تفسیر آزمایش کراس میچ:

۱- اگر آگلوتیناسیون و یا همولیز در مرحله اول رخ دهد خون دهنده و گیرنده ناسازگار هستند که می تواند بدلیل وجود آنتی بادیهای سرد (cold) مانند آنتی بادیهای سیستم ABO (در اثر اشتباه احتمالی در تایپ گروههای خونی)، گروه های فرعی خونی I, Le, M, در سرم گیرنده علیه گلبولهای دهنده خون باشد.

۲- اگر آگلوتیناسیون در مرحله دوم مشاهده گردد خون دهنده و گیرنده ناسازگار بوده و علت وجود آنتی بادیهای گرم (warm) نظیر آنتی بادی علیه سیستم Rh در خون گیرنده می باشد.

۳- اگر در مرحله سوم آگلوتیناسیون دیده شد نیز خون قابل انتقال نبوده و علت می تواند ناسازگاری در گروههای فرعی نظیر Duffy, Kidd, Kell باشد.

عواملی که در تعیین گروههای خونی مداخله می کنند:

اشتباه در تایپ گروههای خونی ممکن است منجر به پاسخ مثبت کاذب و یا منفی کاذب گردد.

۱- عواملی که در روش مستقیم تعیین گروه خونی مداخله دارند:

الف- تعیین گروه خونی نوزادان: به دو دلیل تعیین گروه خونی نوزاد مشکل است. اول اینکه پس از تولد نوزاد تا دو سالگی و یا حتی بیشتر طول می کشد تا تعداد شاخصهای آنتی ژنی مربوط به گروههای خونی در سطح گلبولهای قرمز به اندازه طبیعی افراد بالغ برسد و دوم اینکه بطور معمول گروه خونی نوزاد با استفاده از خون بند ناف آنان تعیین می شود که به علت وجود ماده ژله ماندنی به نام ژله وارتون (Wharton's jelly) که یک پلی ساکارید است می تواند بطور غیر اختصاصی گلبولهای قرمز را به هم متصل کرده و ایجاد مثبت کاذب کند. جهت تشخیص این حالت که پدیده رولکس نامیده می شود بایستی یک قطره سرم فیزیولوژیک به واکنش ظاهراً مثبت افزود که اگر آگلوتیناسیون واقعی باشد حل نخواهد شد ولی اگر پدیده رولکس باشد حل خواهد شد جهت اطمینان می توان بصورت میکروسکوپی لام را بررسی کرد.

ب- افزایش ویسکوزیته خون به هر دلیل مثل myeloma یا افزایش فیبرینوژن و باعث مثبت کاذب می شود.

ج- مصرف برخی داروها و یا آنتی بیوتیک ها نیز باعث مثبت کاذب می شوند.

د- سانتریفیوژ بیش از اندازه و یا انکوباسیون (incubation) طولانی مدت نیز باعث مثبت کاذب می شوند.

ه- سانتریفیوژ کمتر از حد و همچنین سوسپانسیون غلیظ در تست با روش لوله ای و یا سوسپانسیون بیش از حد رقیق در تست بوسیله روش اسلاید می توانند باعث منفی کاذب شوند.

و- افراد مبتلا به سرطانهای خون (leukemia) یا تومورهای Adenocarcinomaی معده نیز ممکن است واکنش منفی کاذب نشان دهند.

۲- عواملی که در روش غیر مستقیم تعیین گروه خونی مداخله دارند:

الف- تایپ گروههای خونی در افراد مسن به دلیل ضعف سیستم ایمنی و یا نوزادان کوچکتر از شش ماه (حدود ۶ ماه طول می کشد تا آنتی بادیهای سیستم گروه خونی ABO در سرم نوزادان، ساخته و قابل بررسی شود). در این موارد گروه خونی فرد به اشتباه AB گزارش می شود.

ب- بالا بودن پروتئین های سرم به هر دلیل مثل myeloma ایجاد پدیده رولکس خواهد کرد.

ج- بیماران مبتلا به کاهش یا نقص سنتر گاما گلوبولین.

د- انتقال خون کامل قبل از تایپ گروه خونی و یا انتقال و یا تعویض پلاسما قبل از آن.