



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی، آزمایشگاه  
میکروبیولوژی

# آزمایشگاه سرولوژی

## تست ASO

# نگاهی به آزمایش ASO

ASO آنتی بادی بر علیه **استرپتولیزین O** میباشد که آنزیم سمی تولید شده توسط باکتری **استرپتوکوک** می باشد. Anti-DNAse. و ASO شایعترین آنتی بادی است که بوسیله سیستم ایمنی در پاسخ به عفونت استرپتوکوک گروه A تولید میشود. در این آزمایش مقدار ASO در خون اندازه گیری میشود. استرپتوکوک گروه A باکتری مسئول ایجاد **گلو درد استرپتوکوکی** و بعضی عفونت های دیگر شامل عفونت پوست (پبودرما ، زرد زخم و سلولیت ) می باشد. در اکثر موارد عفونت استرپتوکوک تشخیص داده شده و با آنتی بیوتیک درمان می شود.

در صورتیکه عفونت استرپتوکوکی علائم قابل تشخیص ایجاد نکند، درمان نشده یا درمان ناکافی انجام میشود. در این صورت در بعضی موارد بخصوص در کودکان عوارض آن شامل تب روماتیسمی و نوعی بیماری کلیوی (گلوبرونفریت) ایجاد میشود. این موضوع میتواند سبب عوارض جدی مثل صدمه به قلب، بیماری حاد کلیوی ، تورم بافتی (ادم) و فشار خون شود. از آزمایش ASO برای تشخیص وجود عفونت جدید استرپتوکوکی استفاده میشود. برای کمک به تشخیص اینکه آیا اخیراً عفونت استرپتوکوکی با استرپتوکوک گروه A داشته اید. برای تشخیص عوارض ناشی از عفونت استرپتوکوکی مثل تب روماتیسمی یا گلوبرونفریت.

این آزمایش زمانی درخواست می شود که فرد علائمی مثل تب، درد قفسه سینه،  
خستگی و تنگی نفس داشته باشد که احتمال تب روماتیسمی را مطرح می کند  
یا علائمی مثل ورم (احتباس مایعات) یا ادرار تیره رنگ که علائم گلومرولونفریت وجود  
داشته باشد. بخصوص در مواقعی که عفونت استرپتوکوکی اخیر که درمان شده  
داشته باشید.

آزمایش ASO حداقل یک هفته بعد از عفونت افزایش می یابد. بنابراین آزمایش ASO برای تشخیص عفونت حاد موجود قابل استفاده نیست. بهترین روش برای تشخیص فازتثیت استرپتوکوکی کشت حلق می باشد. تشخیص آتژین استرپتوکوکی برای پیشگیری از عوارض آن و انتقال به دیگران اهمیت دارد.

اگر شخص عفونت استرپتوکوکی داشته باشد باید آزمایش ASO انجام شود. معمولاً آزمایش ASO فقط موقعی درخواست می شود که فرد علائم عوارض عفونت استرپتوکوکی را داشته باشد که در زمان عفونت تشخیص داده شده و بطور مناسب درمان نشده باشد. اکثر افراد فاقد این عوارض می باشند بنابراین انجام روتین آن معمول نمی باشد

آزمایش ASO عمدتاً برای کمک به تشخیص عفونت اخیر با استرپتوکوک گروه A استفاده می‌شود و به منظور مشخص کردن موارد زیر می‌باشد.

1. آیا گلودونفریت (بیماری کلیوی) ناشی از این میکروب است.

2. آیا بیماری که علائم تب روماتیسمی دارد ناشی از استرپتوکوک گروه A می‌باشد.

این آزمایش می‌تواند به تنهایی یا همراه با Anti – DNase B که آن نیز نشانگر عفونت اخیر استرپتوکوک گروه A می‌باشد درخواست شود.

در اکثر بیماران عفونت استرپتوکوکی شناسایی شده و با آنتی بیوتیک درمان می‌شود. در مواردی که علائم بالینی مشخصی نداشته باشد درمان نمی‌شود و در بعضی افراد بخصوص در کودکان عوارضی بوجود می‌آید. بنابراین آزمایش در افرادی خواسته می‌شود که علائم تب روماتیسمی یا گلودونفریت داشته و اخیراً عفونت استرپتوکوکی تأیید شده داشته باشند. از زمان استفاده از آزمایش ASO عوارض عفونت استرپتوکوکی کاهش یافته است.

آنتی بادی ASO یک هفته تا چهار هفته بعد از عفونت استرپتوکوکی تولید می شود. مقدار تیترا ASO سه تا پنج هفته بعد از بیماری به اوج می رسد و بعد کاهش می یابد ولی می تواند چندین ماه بعد از عفونت استرپتوکوکی قابل اندازه گیری باشد. در ۸۰٪ مبتلایان به تب روماتیسمی حاد و ۹۵٪ بیماران مبتلا به گلودونفریت ناشی از استرپتوکوک مقدار ASO افزایش می یابد. نتیجه منفی ASO یا تیترا پائین آن بخصوص اگر آزمایش دو هفته بعد نیز نتایج منفی یا تیترا پائین داشته باشد به معنی نداشتن عفونت استرپتوکوکی اخیر است در تعداد کمی از بیمارانی که عوارض عفونت استرپتوکوکی دارند بخصوص گلودونفریت بعد از عفونت استرپتوکوکی تیترا ASO افزایش نمی یابد.

تیترا بالای ASO یا افزایش تیترا آن به معنی نداشتن عفونت استرپتوکوکی اخیر می باشد. اگر تیترا آزمایش اول بالا باشد و در آزمایش دوم کاهش یابد به معنی بودن عفونت و بهبودی آن است. آزمایش ASO مشخص کننده احتمال بوجود آمدن عوارض عفونت استرپتوکوکی یا شدت آن نیست. در صورتیکه علائم تب روماتیسمی یا گلودونفریت وجود داشته باشد افزایش ASO می تواند تأیید کننده تشخیص باشد.

آزمایش ASO موقعی که پزشک معالج به عفونت استرپتوکوکی اخیر مشکوک باشد. اغلب موارد هفته ها بعد از گلو درد چرکی یا عفونت پوستی موقعی که میکروب در گلو یا پوست دیده نمی شود ولی علائم زیر را داشته باشد درخواست می شود.

• تب

• ورم مفاصل و درد در بیش از یک مفصل بخصوص مفاصل زانو ، آرنج ، مچ دست که گاهی اوقات جابجا می شود.

• ندول های بدون درد در زیر پوست

• حرکات تند (لرزش)

• راش جلدی

• گاهی اوقات قلب آماس پیدا می کند (کاردیت) که معمولا علائمی ایجاد نمی کند ولی می تواند باعث تنگی نفس ، طپش قلب و درد قفسه سینه شود.

علائم گلودرد و لوفریت مثل

• خستگی ، کاهش انرژی

• کاهش حجم ادرار

• ادرار خونی

• راش جلدی

• درد مفصلی

• ورم بدن (ادم)

• افزایش فشار خون

ولی باید توجه داشت که این علائم بعقل دیگری نیز  
بوجود می آیند. آزمایش بهتر است دو بار و به فاصله  
دو هفته درخواست شود که برای بررسی افزایش ،  
کاهش یا ثابت ماندن تیتر ASO می باشد.



برای تعیین تیتراژ ASO از دوروش را پیدو روش لوله ای استفاده می شود:

**الف) روش سریع (Rapid):** تست غربال گری سریع و براساس **آگلوتیناسیون پاسیو** می باشد. در این روش ذرات لاتکس حساس شده با استرپتولیزین O در برخورد با سرم دارای ASO آگلوتینه می گردد که در صورت مثبت بودن برای تعیین ASO تیتراژ در سرم روش لوله ای انجام می دهیم.

دقت 1: سرم باید تازه تهیه شده باشد.

دقت 2: برای انجام تست را پید از کنترل های مثبت و منفی استفاده می کنیم.

**ب) روش لوله ای:** اساس روش لوله ای **خنثی شدن (نوترالیزاسیون)** می باشد. ابتدا رقت های سرمی 100/1 ( 1/0 سی سی سرم بیمار + 9/9cc از بافر ASO) و 500/1 سرمی (1CC از رقت 100/1 + 4CC بافر ASO) و سوسپانسیون 5% گلبول های قرمز گروه خونی O و بافر ASO و استرپتولیزین O را طبق بروشور کیت مصرفی تهیه کرده و طبق جدول زیر عمل می کنیم :

لوله ی ۱ و لوله ی ۲ ← رقت  $\frac{1}{10}$

لوله ی ۳ تا لوله ی ۷ ← رقت  $\frac{1}{100}$

لوله ی ۸ و لوله ی ۱۲ ← رقت  $\frac{1}{500}$

### خنثی سازی آنزیم استرپتولایزین 0 به روش لوله ای

شاهد گلوبول قرمز	شاهد استرپتولایزین	۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	لوله
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.2	0.8	رقت ۱/۱۰
—	—	—	—	—	—	—	0.3	0.4	0.6	0.8	1.0	—	—	رقت ۱/۱۰۰
—	—	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	—	—	—	—	—	—	—	رقت ۱/۵۰۰
1.0	1.5	0.8	0.6	0.4	0.2	—	0.7	0.6	0.4	0.2	—	0.8	0.2	بافر ASO
0.5	—	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	آنتی ژن ASO

پس از مخلوط کردن لوله ها را بمدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه می کنیم.

0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	سوسپانسیون گلوبول قرمز ۵٪
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---------------------------

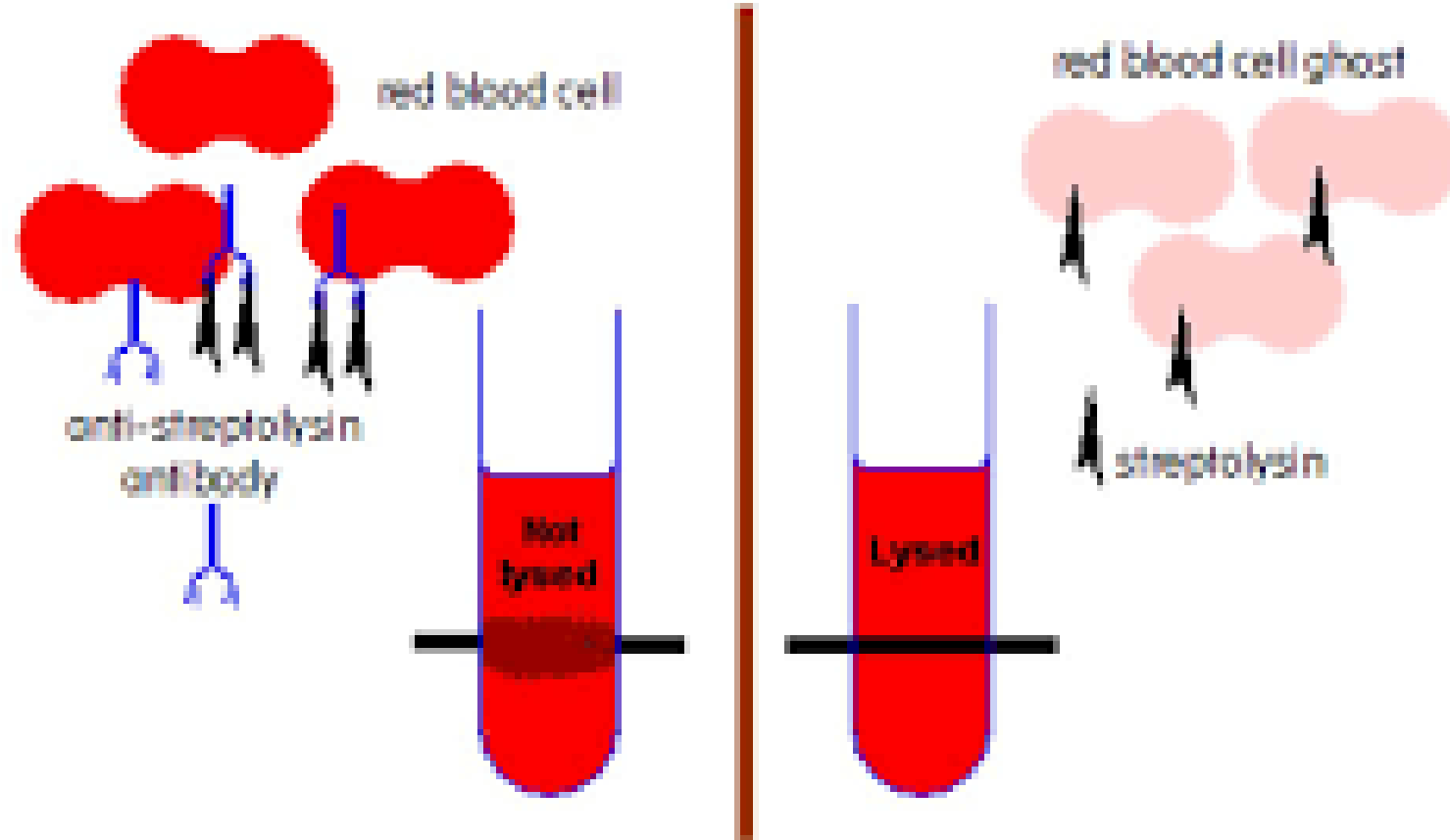
پس از مخلوط کردن لوله ها را بمدت ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کنید، سپس بمدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ

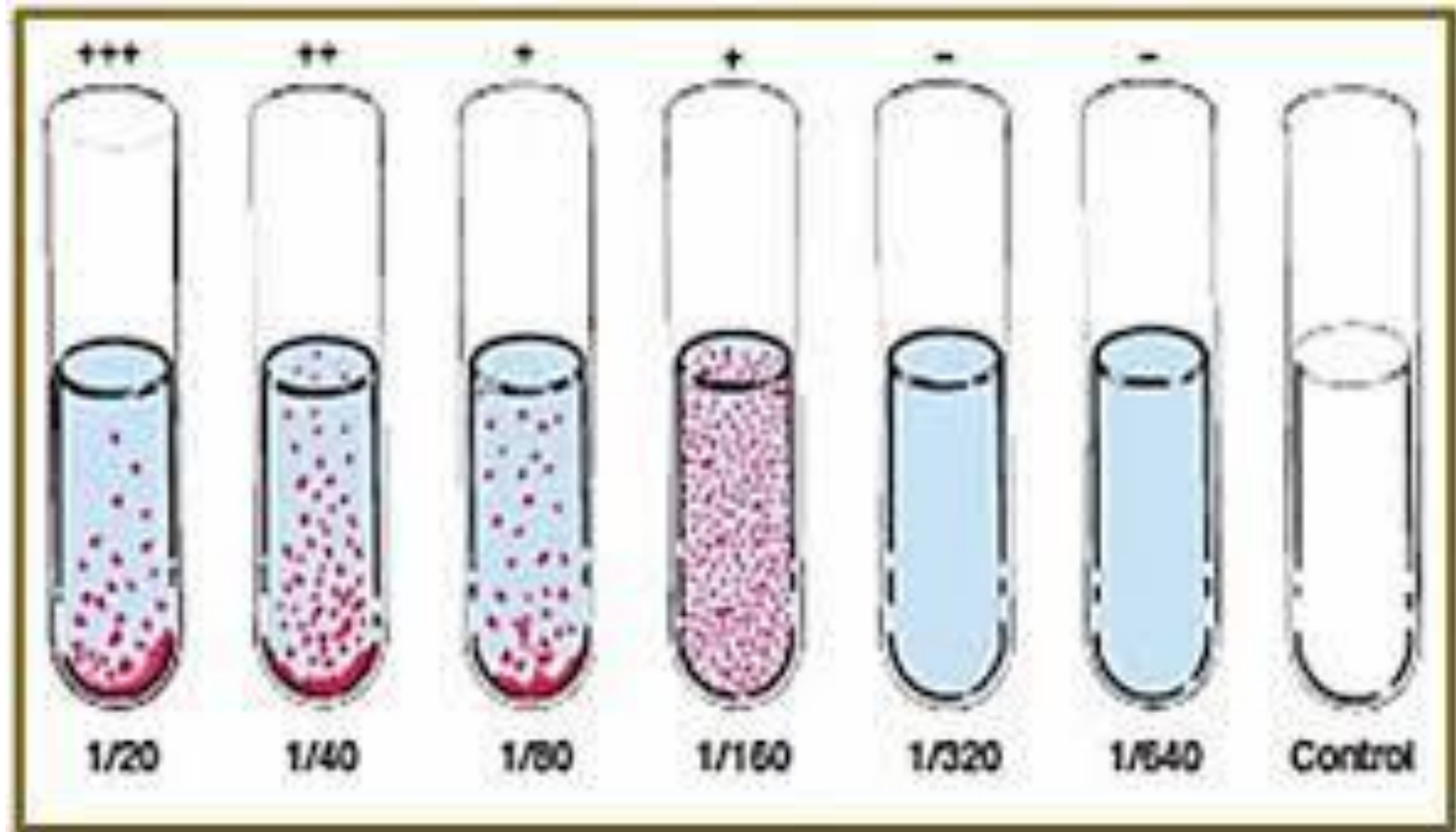
نموده واز نظر همولیز بررسی کنید.

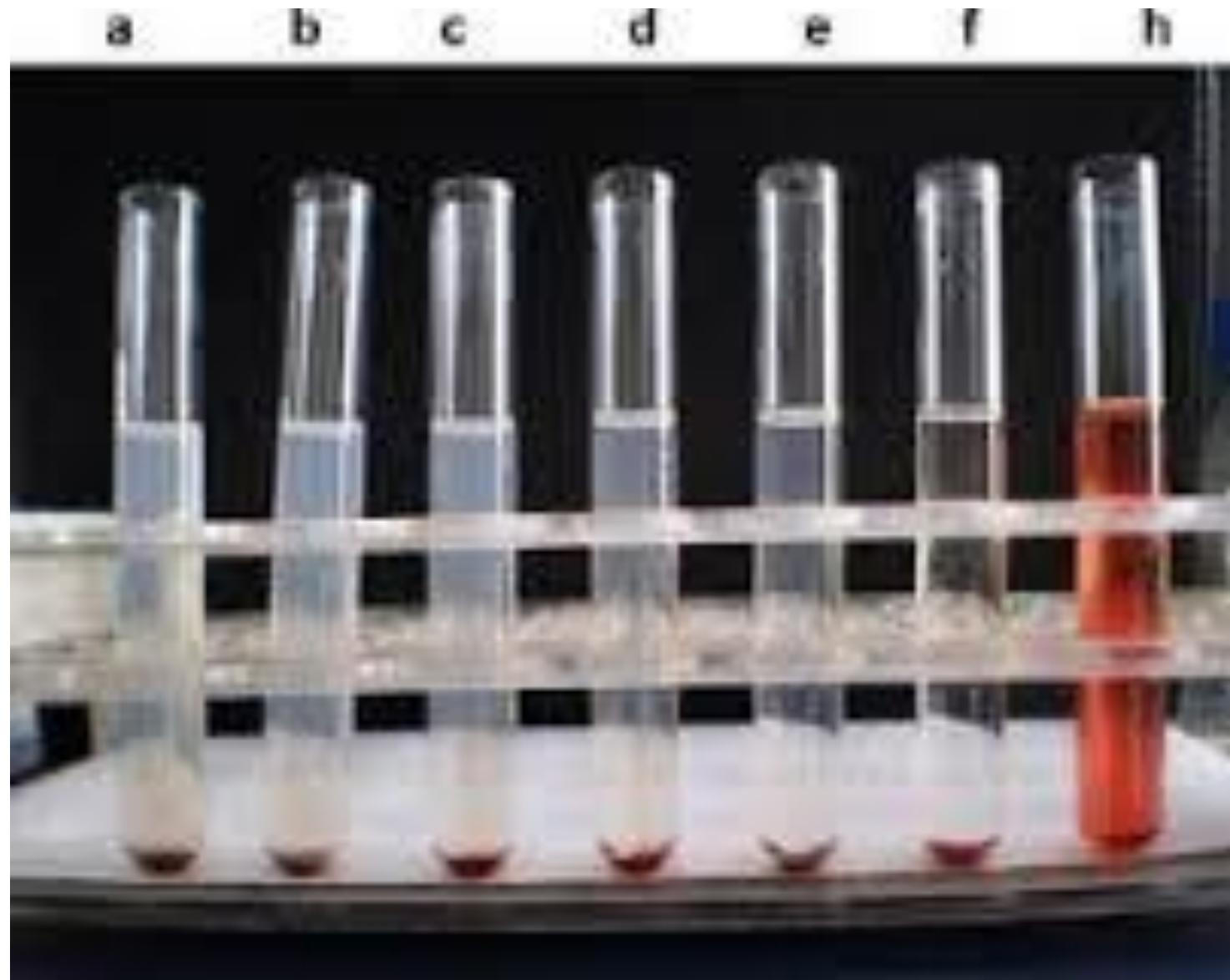
بدون همولیز	همولیز کامل	2500	1250	833	625	500	333	250	166	125	100	50	12.5	نتیجه Todd
-------------	-------------	------	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----	------	------------

رقیق ترین لوله سرمی (چاهکی) که فاقد همولیز باشد، تیترا همولیز بیمار است.

# ASO Principle







سہیلا عباسی

## خواندن نتیجه:

- 1- سرم فرد حاوی ASO باشد با SO اضافه شده خنثی و همولیز ایجاد نمی گردد آخرین لوله عدم همولیز رابه عنوان تیترا ASO برحسب واحد Todd گزارش می کنیم.
- 2- اگر سرم فرد ASO نداشته باشد SO بدون خنثی شدن باقی مانده وسبب همولیز گلبول های قرمز خواهد شد.  
واحد Todd: عبارتند از عکس بالاترین رقت سرمی که مانع از همولیز کامل گلبول های قرمز توسط SO می شود. مقدار نرمال معولا 166 تا 250 تا می باشد.

**مقادیر نرمال :** مقادیر طبیعی کمتر از IU 200-240 ( بر اساس نوع آزمایشگاه متفاوت است) می باشد که از روش لاتکس استفاده میشود. براساس روشهای گذشته شاخص طبیعی در بزرگسالان کمتر از 240 واحد Todd و کمتر از 320 واحد Todd در کودکان بود.

**موارد افزایش:** با عفونت استروپتوکوکی پس از 4-5 هفته تیترا ASO به حداکثر خود می رسد( معمولا 2-3 هفته پس از شروع تب روماتیسمی حاد). در 90% بیماران با تب حاد روماتیسمی افزایش تیترا داریم در حالیکه پس از عفونت استروپتوکوک بوسستی معمولا افزایش تیترا نداریم. ASO ممکن است در بیمارانی که هیپرگاماگلوبین دارند یا فعالیت ایمنولوژیک افزایش یافته است بصورت غیر اختصاصی بالا برود.

**فاکتورهای مخدوش کننده:** تیتراژ ASO با تغییر سن ، فصل و جغرافیای منطقه متغیر می باشد . مقادیر بالاتر در کودکان و در کسانی که در جاهای شلوغ زندگی میکنند و در آب و هوای معتدل شایعتر است . آلودگی سرمی و واکنش متقاطع با سارکولم عضله ندرتا می تواند نتایج مثبت کاذبی را به همراه داشته باشد.

**موارد کاربرد:** ASO همراه با دیگر آنتی بادی های ضد استرپتوکوکی نظیر آنتی DNaseB و Anti-NAse ، آنتی استرپتوکیناز ، آنتی هیالورونیداز برای نشان دادن شواهد عفونت استرپتوکوکی مفید می باشد.





سهیلا عباسی

## روش انجام آزمایش

قبل از مصرف معرف ها و کنترل ها آنها را به دمای محیط برسانید  
به هنگام مصرف سوسپانسیون لاتکس ASO ، آن را به خوبی تکان دهید تا به صورت هوموژن در آید.  
در این روش هیچ نیازی به رقیق کردن سرم نمی باشد.

روی یک اسلاید سیاه رنگ یک قطره از کنترل مثبت را در دایره شماره ۱ و یک قطره از کنترل منفی را در دایره شماره ۲ بریزید و در دایره شماره ۳ یک قطره از سرم بیمار قرار دهید.  
یک قطره سوسپانسیون لاتکس ASO را به هر دایره اضافه نموده و با اپلیکاتور قطرات سرم ولاتکس را مخلوط نموده، و در سطح دایره پخش نمائید.  
بلافاصله اسلاید را با حرکت دورانی دست یا روتاتوربه مدت ۲ دقیقه بچرخانید.

اگر اگلوتیناسیون مشاهده نشد:منفی است و بدین شکل گزارش میکنیم:

ASO=۱۰۰ todd

اگر اگلوتیناسیون مشاهده شد باید تیتراژ را تعیین کنیم.



**ASO Positive**



**ASO Negative**



**ASO Negative**

## تعیین تیتراژ ASO

یک اسلاید سیاه رنگ آماده میکنیم

روی هر یک از خانه های ۱ و ۲ و ۳ مقدار ۵۰ لاندا سرم فیزیولوژی میریزیم.

حال به خانه شماره ۱ مقدار ۵۰ لاندا سرم بیمار اضافه میکنیم و انرا با سرم فیزیولوژی خوب مخلوط میکنیم.

سپس با سمپلر ۵۰ مقدار ۵۰ لاندا را از خانه ۱ برداشته و روی خانه ۲ میریزیم

سپس از ۲ به ۳

سپس از ۳ به ۴

سپس ۵۰ لاندا از خانه ۴ را دور میریزیم.

حال به تمام خانه ها ۵۰ لاندا محلول ASO اضافه میکنیم.

۵ دقیقه اسلاید را روی شیکر قرار میدهیم

تیتراژ در آخرین خانه ای است که در آن آگلوتیناسیون مشاهده شده است.

تیتراژ خانه اول: ۴۰۰

خانه دوم: ۸۰۰

خانه سوم: ۱۶۰۰

خانه چهارم: ۳۲۰۰

واحد اش: todd