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

آزمایشگاه ایمونولوژی و سرولوژی

اساس و پایه آزمایش‌های سرولوژی

تهیه کننده:سهیلا عباسی

امروزه آزمایش‌های سرولوژی بالینی بر اساس اتصال آنتی بادی اختصاصی (specific anti body) مربوط صورت می‌گیرد.

آنتی ژن مورد نظر می‌تواند باکتری، ویروس، گلبول قرمز، پروتئین هورمون و یا چیزهای دیگر باشد.

اتصال آنتی ژن به آنتی بادی یک واکنش اختصاصی، دو طرفه و برگشت پذیر می‌باشد و از قوانین تئوری عکس‌العمل بین اسیدهای ضعیف و بازهای ضعیف پیروی می کنند.

آنتی بادی + آنتی ژن ↔ کمپلکس آنتی ژن آنتی-آنتی بادی

عوامل که در اتصال آنتی ژن-آنتی بای دخالت دارند.

قدرت اتصال آنتی بادی به آنتی ژن(affinity)

هر چه قدرت اتصال آنتی بادی به آنتی ژن محکمتر باشد. کمپلکس آنتی ژن آنتی بادی مشکلتر از هم جدا می‌شوند که بستگی به ظرفیت آنتی بادی و قدرت اتصال بین اپی توپ و پاراتوپ دارد.

pH محیط

مناسب ترین pH برای واکنش سرولوژی pH=۲/۷ می‌باشد.

در pH پائین تر از ۲/۷ اتصال آنتی بادی به آنتی ژن ضعیف می‌باشد. به طوری که در pH=۳/۲ کمپلکس آنتی ژن و آنتی بادی کاملا از یکدیگر جدا می‌شوند.

از طرف دیگر اتصال آنتی ژن به آنتی بادی در pH بالاتر تا حدود ۶/۸ نیز امکان پذیر است.

لازم به تذکر است که ایمونوگبولین IgD نسبت به اسیدها بسیار حساس است و در محیط اسیدی دناتوره می شود.

قدرت یونی محیط (Ionic strenght)

عکس العمل‌های سرولوژی در محیطی که فاقد الکترولیت‌ها باشد صورت نمی‌گیرد قدرت یونی محیط در حقیقت مولاریته نمک‌های محلولی است که آنتی ژن و آنتی بادی در آن محلول قرار دارند.

چنانکه غلظت نمک زیاد باشد. باعث رسوب آنتی بادی و آنتی ژن پروتئین می شود.

معمولا سرم فیزیولوژی ۰/۱۵ مولار و یا تامپون فسفات نمکی با قدرت یونی ۰/۰۲مولار در۲/۷ =pH برای رقیق کردن سرم بیمار و عکس العمل‌های سرولوژی بسیار مناسب است.

زمان (Incubation time)

اتصال مولکول‌های آنتی بادی به آنتی ژن معمولا به سرعت و در عرض چند ثانیه صورت می‌گیرد ولی برای تشکیل کمپلکس و دیدن واکنش وقت لازم است و این زمان برای هر آزمایش با توجه به نوع آنتی ژن و کلاس آنتی بادی متفاوت است.

به طور کلی چنانکه آنتی بادی از کلاس IgM و مولکولهای آنتی ژنی درشت باشد زمان لازم برای ایجاد کمپلکس آنتی ژن و آنتی بادی کمتر است. مانند تعیین گروه‌های خونی در سیستم ABO

حرارت (Tempeerature)

در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد واکنش‌های سرولوژی سریع تر قابل رویت می‌باشد.

در حرارت بالاتر از ۵۶ درجه ی سانتی گراد به مدت نیم ساعت ایمونوگلوبولینهای IgEو IgD و کمپلمان خواص بیولوژیکی خود را از دست می‌دهند.

در درجه حرارت‌های بالاتر از ۷۰ درجه سانتی گراد سایر کلاس‌های ایمونوگلولین نیز ممکن است دناتوره شوند و به آنتی ژن متصل نشوند.

در درجه حرارت پائین حتی در صفر درجه سانتی گراد نیز واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی صورت می‌گیرد.

تاثیر حرکت دادن(stirring)، تکان دادن (shaking) و سانتریفیوژ کردن (centrifagation)

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 لوله‌ی آزمایش بر روی هم ریخته شوند می‌توان با تکان دادن آرام 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 تسریع گردد. برای این کار می‌توان از سانتریفیوژ کمک گرفت.

تاثیر مواد احیا کننده (Reducing agents)

ایمونوگولین‌های IgA,IgM,IgD,IgE نسبت به مواد احیا کننده مانند (dithio threitol) حساسیت بیشتری نسبت بهIgG دارند.

بنابراین در بعضی آزمایش‌های سرولوژی چنانچه اندازه‌گیری IgG اختصاصی مورد نظر باشد، با اضافه کردن مقدار معینی از یک ماده احیا کننده به سرم سایر کلاس‌های ایمونوگلبولین را تجزیه می کنند و فقط IgG سالم می‌ماند و اندازه گیری می شود.

غلظت آنتی ژن و آنتی بادی (Optimal concentration ratio)

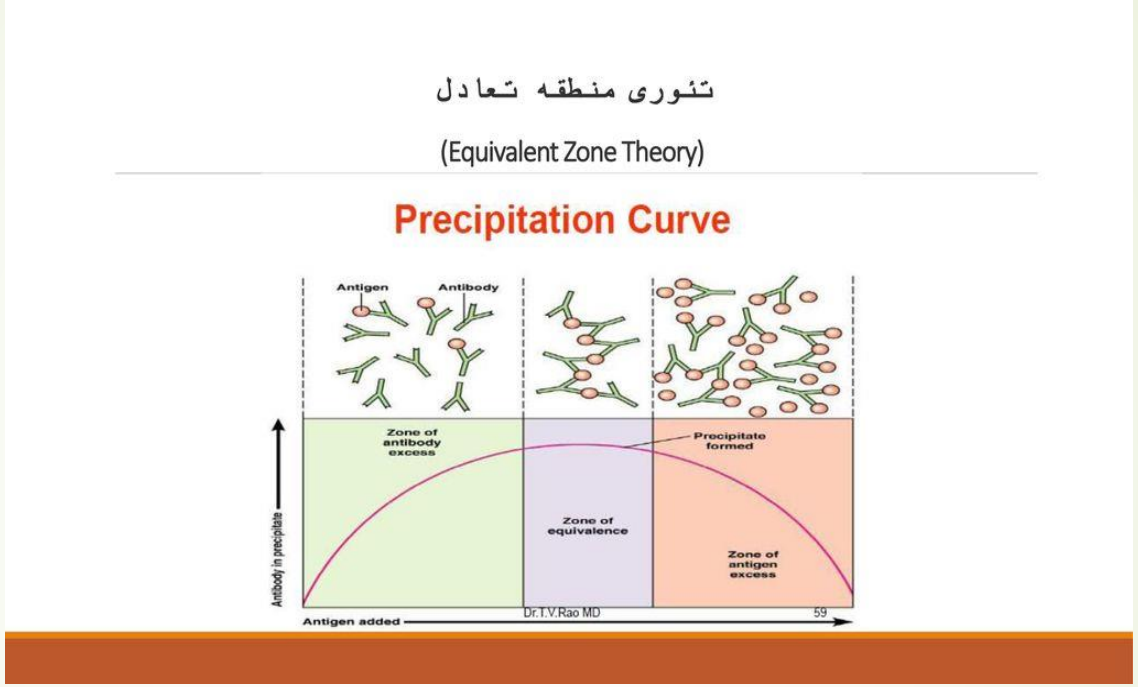
اولین بار هایدلبرگ (Heidelbrer) و همکارانش نشان دادند که غلظت آنتی ژن و آنتی بادی اختصاصی باید با یکدیگر متناسب باشند تا تمام آنتی بادی موجود در لوله آزمایش به آنتی ژن مجاورش متصل شود و حداکثر عکس العمل سرولوژی انجام پذیرد.

در این تحقیق مقادیر متفاوتی از یک آنتی ژن پلی ساکاریدی را در لوله‌های آزمایش ریخته و به آن‌ها مقدار ثابتی از آنتی بادی ضد آن اضافه نمودند سپس لوله‌های محتوی آنتی ژن و آنتی بادی را برای مدتی در گرم خانه ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد قرار دادند تا عکس العمل صورت گرفته و رسوب کمپلکس آنتی بادی و آنتی ژن حاصل شود.

رسوب را پس از جمع آوری، شستشو داده تا آنتی بادی‌های اضافی که به آنتی ژن متصل نشده اند جدا شوند و سپس مقدار پروتئین موجود در رسوب را بوسیله روش کجلدال(kejeldahl) اندازه گیری نمودند از آنجایی که آنتی ژن بکار برده شده فاقد پروتئین بود، بنابراین تمام پروتئین اندازه گیری شده نشان دهنده مقدار آنتی بادی اختصاصی است که به آنتی ژن متصل و رسوب داده‌شده‌است.

حال چنانچه مقدار پروتئین رسوب داده‌شده را نسبت به ترتیب لوله‌های آزمایش بر روی منحنی رسم کنیم.

منحنی زیر به دست می‌آید.



با توجه به این منحنی مشاهده می‌شود که در لوله‌های آزمایش شماره یک تا حدود چهار مقدار آنتی ژن نسبت به آنتی بادی کمتر است. و در این لوله‌ها مقدار آنتی بادی رسوب داده‌شده نیز کمتر از لوله پنج و شش می‌باشد. در لوله‌های یک الی چهار مقداری از آنتی بادی آزاد می‌باشند که شسته شده و محاسبه نگریده‌است. به این ناحیه ، منطقه ی آنتی بادی اضافی و یا اصطلاحا پری زون (prezone) می‌گویند.

لوله‌های پنج تا هفت منطقه‌ای است که تقریبا تمام آنتی بادی موجود در لوله به آنتی ژن متصل شده و رسوب کرده است.

به این ناحیه، منطقه تعادل (zone of equivalence) می گویند از لوله هشت به بعد که نسبت مقدار آنتی ژن به تدریج نسبت به مقدار ثابت آنتی بادی افزایش بیشتری پیدا می کند.

منحنی سیر نزولی را طی می‌کند و در نتیجه مقدار آنتی بادی که آنتی ژن متصل شده و رسوب نموده‌است کاهش می‌یابد این ناحیه را منطقه آنتی ژن اضافی و یا به اصطلاح پست زون (post zone) می‌نامند.

یکی از محققین به نام ماراک (Marak) علت ایجاد رسوب در عکس العمل‌های بین آنتی ژنی و آنتی بادی را تشکیل شبکه‌هایی (Lattic) بین مولکول‌هایی آنتی بادی و آنتی ژن می‌داند.

عوامل مداخله گر موجود در سرم

گاهی موادی که بطور طبیعی در سرم می‌باشند (bioactive substances) مانع بعضی از واکنش‌های سرولوژی خصوصا واکنش-های رسوبی می‌شوند.

بعضی از این عوامل شناخته شده عباتند از: انترفرون، لیزوزیم (lysozyme) کمپلمان، ایمونوکونگلوتینین‌ها (immunoconglutiniinges) بتالیزین‌ها (betalysins) و یا موادی که توسط میکروبهای فلور طبیعی بدن ترشح و وارد خون می‌شوند.

تست هایی که در آزمایشگاه برای نشان دادن واکنش های بین آنتی ژن و آنتی بادی در invitro انجام می‌شود به سه گروه خاص تقسیم بندی می‌شوند:

تست‌هایی که واکنش‌های اولیه بین آنتی ژن و آنتی بادی را مورد بررسی قرار می دهند primary reaction نامیده می‌شوند برای نشان دار کردن آنتی ژن یا آنتی بادی و در نتیجه ردیابی واکنش‌های اولیه بین این دو مولکول معمولا از آنزیم، مواد رایواکتیو و یا فلوئورسنت را استفاده می‌شود. مانند: LAF-ELISA-RIA

تستهای که یا تقویت شده واکنش اولیه بین آنتی ژن و آنتی بادی و یا اثرات ناشی از چنین واکنش‌هایی را نشان می‌دهند مانند پرسی پپتاسیون، آگلوتیناسیون و نوترالیزاسیون و یا واکنش‌های وابسته به کمپلمان

تست‌هایی که اثرات بیولوژیکی ناشی از واکنش‌های بین آنتی ژن آنتی بادی را مورد بررسی قرار می‌دهند. گاهی این اثرات مخرب و گاهی مفید هستند.

الف- اثرات مخرب ناشی از واکنشهای بین آنتی ژن و آنتی بادی (Immune complex) در بافتها، گلبولهای قرمز، آدم و واکنشهای التهابی را می‌توان نام برد

ب- از اثرات مفید چنین واکنشهایی می‌توان به القای عمل بیگانه خواری (Phagocytosis) و اپسونیزاسیون (Opsonization)، خنثی شدن توکسین‌ها (Neutralization) و ویروس‌ها در invivo، کیموتاکسی Chemotaxis و غیره نام برد.

انواع عکس العمل‌های سرولوژی Serological Reactions

روش‌های متعددی برای جستجوی آنتی ژن و آنتی کور و همچنین واکنش‌هایی که از برخورد آنتی ژن و آنتی کور و همچنین واکنشهایی که از برخورد آنتی ژن و آنتی کور حاصل می‌گردد وجود دارد. با استفاده از این روشها نه تنها می‌توان پی به اختلالات ایمنی برد بلکه برای سنجش پروتئین‌های مختلف سرم و شناسایی بعضی از میکروارگانیسم‌ها می‌توان از آن استفاده نمود.

به علاوه با مطالعه این آزمایش‌ها طرز کار و اثرات آنتی کور در بدن و رل آن‌ها در ایجاد بیماری روشن می‌گردد.

به وسیله‌ی سرولوژیک می‌توان یک آنتی ژن یا آنتی بادی مجهول را شناسایی و مقدار آن را اندازگیری نمود. وقتی که آنتی ژن و آنتی بادی ضد آن (specific antibody) با یکدیگر مخلوط شوند براساس فرم یا شکل مولکول‌های آنتی ژن، کمپلکس آنتی بادی و آنتی ژن به شکل‌های مختلفی تشکیل می‌شود و رسوب می‌کنند بنابراین بر اساس شکل مولکول‌ها آنتی ژن، واکنشهای سرولوژی را به سه دسته تقسیم می‌کنند.

تهیه کننده: مهیلا عباسی

بنابراین بر اساس شکل مولکول‌ها آنتی ژن، واکنشهای سرولوژی را به سه دسته تقسیم می‌کنند.

۱-واکنشهای رسوبی یا پرسیپتاسیون(precipitation reactions) در این واکنش آنتی ژن محلول (soluble) را پرسیپینوژن (precipitonogen) و آنتی بادی بر ضد آن را پرسیپیتین(precipitin) می-نامند.

در این واکنشها آنتی ژن به صوررت مولکول محلول است مانند پروتئینها این تست که متکی بر واکنشهای ثانویه بین آنتی ژن و آنتی بادی است به چندین طریق در آزمایشگاه اجرا می-شود.

یا در محیط مایع دو مولکول آنتی ژن و آنتی بادی را با یکدیگر مجاور می‌کنند که در این حالت کمپلکسهای ایمن حاصل به صورت شبکه‌های سه بعدی و گسترده precipitate جلوه گر می‌شود. این تست یا در لوله‌های آزمایش معمولی انجام می‌گیرد که نیاز به مصرف مقادیر زیادی از مولکولهای آنتی ژن و آنتی بادی دارد و یا اینکه در لوله‌های موئین اجرا می‌گردد.

گاه واکنش پرسی پتپاسیون در ژل صورت می‌گردد که به طوری مختلف قابل اجرا می‌باشد.

۲- واکنشهای متراکم یا آگلوتیناسیون (Agglutination)

اگر آنتی ژن به صورت غیر محلول (insoluble) و یا ذره ای (particle) باشد واکنش را آگلوتیناسیون می‌نامند که معمولا آنتی ژن مستقر در سطح یک سلول، یا روی ذرات لاتکس و یا یک ماده پلیمری به نام بنتونایت (Bentonite) می‌باشد آنتی ژن را در این دسته واکنشهای سرولوژی آگلوتینوژن (Agglutinogen) آنتی بادی را آگلوتینین (Agglutinin) می‌گویند.

برتری واکنش‌های آگلوتیناسیون بر سایر روشها سرولوژی یکی درشت بودن کمپلکس آنتی بادی و آنتی ژن است که با چشم غیر مسلح (naked eyes) بخوبی قابل رویت می‌باشد و دیگری مدت زمان بسیاری کوتاه آزمایش است که به نتیجه می‌رسد.

واکنشهای آگلوتیناسیون براساس ماهیت نشانه‌های آنتی ژنی در مولکولهای آنتی ژن به چند دسته تقسیم می‌شوند.

الف- آگلوتیناسیون فعال: ۱- مستقیم Direct ۲- غیر مستقیم Indirect

ب- آگلوتیناسیون غیر فعال passive:

۱- ساده

۲-ممانعت از آگلوتیناسیون Agglutination Inbibition test

آگلوتیناسیون فعال مستقیم (Direct aggglutination)

در این دسته واکنشهای آگلوتیناسیون شاخصهای آنتی ژنی antigenic determinants آنتی ژن، جز ساختمانی (intrinsic) خود آنتی ژن غیر محلول می‌باشند مانند تست رایت(Wright) ویدال (Widal)

ب: آگلوتیناسیون فعال غیر مستقیم: در این دسته واکنشها به علت وجود آنتی بادی‌ها ناقص (incomplete Ab) یا مسدود کننده (Blocking Antibody) فقط یک ظرفیت آنتی بادی به آنتی ژن غیر محلول متصل می‌شود. که در نتیجه شبکه کمپلکس آنتی ژن و آنتی بادی تشکیل نشده و آگلوتیناسیون دیده نمی‌شود. در چنین مواردی برای ظهور و رویت آگلوتیناسیون در صورتیکه آنتی بادی انسانی باشد از آنتی هیومن استفاده شود مانند تست کومبس رایت (comb s Wright)

آگلوتیناسیون ساده غیر فعال (Passive Agglutination)

اگر آنتی ژن به صورت محلول باشد و بخواهیم به روش آگلوتیناسیون آزمایش سرولوژی را انجام دهیم باید به روش آگلوتیناسیون پاسیو عمل کنیم برای این منظور آنتی ژن محلول را به ذرات غیر محلول (particle) متصل می‌کنند.

بیشترین ذرات غیر محلول که برای این منظور در آزمایشهای سرولوژی بالینی و تحقیقاتی مورد استفاده قرار می گیرند شامل ذرات لاتکس (polystyrene latex) که از جنس ذرات بسیار ریز پلاستیک است و گلبول‌های قرمز گوسفند و سایر حیوانات می‌باشند.

ذرات غیرمحلول دیگری که بندرت استفاده می‌شوند شامل ذرات بتتونایت (betonite) به فرمول ($Al_2O_3+SiO_2,H_2O$)، ذغال چوب (charcoal) و خاک چینی یا کائولین (kaoline) می‌باشد، مانند تست RF

ممانعت از آگلوتیناسیون غیر فعال (Passive inhibition of agglutination)

این آزمایش براساس رقابت یک انتی ژن به دو صورت، محلول و غیرمحلول در مقابل یک آنتی بادی اختصاصی معلوم می‌باشد.

این دسته از واکنشها که معمولا برای تست تشخیص حاملگی (βHCG) استفاده می‌شود به این ترتیب که با مجاور کردن آنتی بادی اختصاصی علیه هورمون HCG با ادرار شخص مورد آزمایش چنانچه در این ادرار هورمون HCG وجود داشته‌باشد. در این مرحله کمپکس ایمنی تشکیل می‌گردد. حال در مرحله دوم چنانچه به مجموعه حاصل از مرحله اول ذرات لاتکس که در سطح آنها HCG متصل شده‌است اضافه شود، چون در مرحله اول سایت فعال آنتی بادها با هورمون HCG موجود در ادرار اشغال شده‌است، لذا در مرحله دوم با HCG متصل به سطح ذرات لاتکس واکنش نداده و آگلوتیناسیون ظاهر نمی‌گردد. سپس در این آزمایش از ایجاد آگلوتیناسیون ممانعت به عمل آمده‌است و عدم آگلوتیناسیون در مرحله دوم این آزمایش، دال بر وجود HCG در ادرار شخص مورد آزمایش است.

تذکر: چنانچه سلول مورد مصرف در آزمایش آگلوتیناسیون گلبولهای قرمز باشند این گونه تست‌های هماگلوتیناسیون (Hemoagglutination) گویند.

واکنشهای فلوکولاسیون (Flocculation)

اگر کمپلکس آنتی ژن و آنتی بادی به شکل ذرات توده‌های متراکم و درشت آگلوتیناسیون باشند آنرا واکنش فلوکولاسیون گویند.

کمپلکس فلوکولاسیون شبیه ذرات توده‌های برف (flaks) و ظاهرا زبر و خشن (coarse) می‌باشند واکنشهای فلوکولاسیون معمولا وقتی دیده می‌شوند که مولکولهای آنتی ژن به صورت ذرات کلوئیدی باشند مانند آنتی ژن کاردیولیپین که از عصاره قلب گاو تهیه می‌شود.

آزمایشهای فلوکولاسیون را معمولا به روش لوله آزمایش، روی لام معمولی و یا لام ته گود انجام می‌دهند.

تست ثبوت مکمل(Complement Fixation test)

با استفاده از آزمایشهای ثبوت مکمل می‌توان عیار یا تیتر (titer) یک آنتی بادی مجهول و را به کمک کمپلمان اندازه‌گیری نمود.

آزمایش ثبوت مکمل کمپلمان روش بسیار حساس و دقیقی است که براساس کمپلکس سه جز آنتی ژن، آنتی بادی و کمپلمان می‌باشد. در این آزمایش به عنوان شاهد از گلبولهای قرمز حیوانات معمولا گوسفند و آنتی بادی ضد آن به نام همولیزین (Hemolysin) استفاده می‌شود.

آزمایش ثبوت مکمل برای اندازگیری مقدار آنتی بادی مجهول به دو روش انجام می‌شود. یکی به نام روش مستقیم و دیگری به نام روش غیر مستقیم. از این دو روش فقط روش کلاسیک یا مستقیم متداول است. و روش غیر مستقیم فقط در موارد نادری کلاسیک منفی باشد انجام می‌شود.

در آزمایشهای کلاسیک ثبوت مکمل دو سیستم آنتی بادی و آنتی ژن فعالیت دارند. یک سیستم شامل آنتی بادی‌های مجهول (سرم بیمار) و آنتی ژن معلوم و سیستم دیگری شامل گلبول قرمز گوسفند و آنتی بادی ضد آن می‌باشد. این دو سیستم برای مصرف و فعال کردن کمپلمان از طریق راه کلاسیک (Classic pathway) با یکدیگر رقابت می‌کنند.