



دانشگاه اصفهان

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



آزمایشگاه ایمونولوژی

جلسه ششم:

تست CRP

(C-Reactive Protein)

پروتئین های مرحله حاد بیماری:

- ✓ پروتئین هایی که در اثر صدمات ضایعات بافتی , نکروز, التهاب عفونت ها , اعمال جراحی و یا سرطان ها در مرحله حاد و در پلاسما و سرم خون انسان و حیوانات خون گرم پیدا می شود و با آنکه مقدار آنها تغییر می کند بنام پروتئین های واکنش مرحله حاد نامیده می شود.
- ✓ نقش اکثر این پروتئین ها کاهش ضایعات التهابی در بافت ها می باشد ولی در بعضی از شرایط نیز باعث تشدید ضایعات التهاب می باشد. مکانیزم سنتز , کنترل و کار بیشتر این پروتئین ها هنوز به خوبی شناخته نشده است .
- ✓ این دسته پروتئین ها از نظر منشا ساختمان و کار با یکدیگر مشابه نیستند ولی بیشتر این ها از جنس گلیکوپروتئین ها می باشند این پروتئین ها اکثرا در کبد سنتز می شوند ولی میزان ترشح آنها در سرم تحت تاثیر مستقیم و غیر مستقیم سیتوکین های مترشحه از سلول های سیستم ایمنی و مواد واسطه ای است، که از بافت ضایعه دیده و یا دچار التهاب ترشح می شوند
- ✓ موادی که از سلول های کمکی T و سلول های سفید بیگانه خوار تک هسته ای مونوسیت (ماکروفاژ) و چند هسته ای (نوتروفیل) ترشح می شوند موجب تحریک و سنتز پروتئین های فاز حاد در سلول های کبدی می شوند برای مثال این مواد شامل اینترلوکین ۱و۶ , پروستاگلاندین ها , آنزیم های لیزوزوم , فاکتور نکروز دهنده تومور , اینترفرون گاما و غیره می باشد تحقیقات نشان داده است که هورمون های غدد هیپوفیز , آدرنال و جنسی نیز در سنتز این پروتئین ها در سلول های کبدی نقش مهمی دارد .

پروتئین های مرحله حاد بیماری:

سوالی که تا کنون بدون جواب مانده است این است که آیا هر یک از سلول های کبدی به تنهایی فقط یک پروتئین خاص را سنتز می کنند و یا هر کدام از این سلول ها می توانند در یک زمان چند نوع از پروتئین های فاز حاد را سنتز کند اگر چه سلول های کبدی به عنوان منبع اصلی سنتز پروتئین های فاز حاد شناخته شده اند ولی فقط کبد نیست که قادر به این کار می باشد.

به عنوان مثال ماکروفاژها تعدادی از اجزای کمپلمان و هم چنین لکوسیت ها , آلفا یک – اسید گلیکوپروتئین را که از پروتئین های مرحله حاد بیماری ها می باشند سنتز و در سرم ترشح می کنند در بعضی بیماری های التهابی علاوه بر افزایش مقدار پروتئین های مرحله حاد , تعداد گلبول های سفید, سرعت رسوب گلبول قرمز و حرارت بدن افزایش پیدا می کند.

پروتئین های مرحله حاد بیماری:

✓ ظهور , افزایش یا کاهش مقدار هر یک پروتئین های مرحله حاد در طول یک بیماری متفاوت و مستقل از یکدیگر می باشند به طور مثال CRP و آلفا یک اسید گلیکوپروتئین ۶ تا ۸ ساعت پس از یک ضایعه در سرم پیدا می شوند و پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت به حد اکثر می رسند در صورتیکه هاپتوگلوبین , سرولوپلاسمین و آلفا یک - آنتی تریپسین , قبل از ۱۲ تا ۲۴ ساعت قابل تشخیص نبوده و در عرض ۷۲ تا ۹۶ ساعت پس از ضایعه به حد اکثر می رسد در طول ضایعه بافتی مقدار CRP و آلفا یک - اسید گلیکوپروتئین همچنان بالا باقی می ماند ولی به مجرد ترمیم بافت مقدار آنها به سرعت کاهش یافته و دیگر در سرم قابل اندازه گیری نمی باشد.

✓ در بعضی از افراد ممکن است مقدار پروتئین های فاز حاد کمتر از مقدار طبیعی و یا افزایش قابل ملاحظه ای نشان ندهد این مسئله علل مختلف دارد از جمله نقص ژنتیکی , مصرف برخی از داروها و بیماری عضوی و نوزادان می باشند .

✓ از بین پروتئین های فاز حاد اندازه گیری CRP به علت افزایش سریع آن در آغاز ضایعه بافتی و کاهش سریع آن به مجرد بهبودی بهترین راه تشخیص ضایعات بافتی است به نظر می رسد تا حدی رابطه ای بین شدت ضایعه و مقدار پروتئین های فاز حاد در جریان خون برقرار است

فاکتور CRP چیست؟

5

پروتئین CRP سال ۱۹۳۰ شناسایی شد و مشاهده شد افراد مبتلا به پنوموکوک پروتئینی در سرمشان دارند که باعث متورم شدن کپسول باکتری می شود.

این پروتئین دارای ساختار کروی شکل است و فقط در انسان و میمون وجود دارد. تحقیقات نشان داده میزان این پروتئین در بدن افراد سالم بسیار کم و حدود ۵/۳ میلی گرم بر لیتر می باشد و در موارد التهابی میزان آن تا ۳۰۰۰ برابر در مدت چند ساعت بالا می رود.

6



فاکتور CRP چیست؟ (ادامه)

میزان CRP در برخی از بیماریها از جمله عفونت های باکتریایی، عفونت های ویروسی، تب رماتیسمی، سکته قلبی، آرتریت و سرطان و بدخیمی ها و بیماری سل بالا می رود.

از عوامل دیگری که در بالا رفتن CRP نقش دارد آمبولی ریه و عمل جراحی و انتقال خون و واکسیناسیون می باشد.

اندازه گیری میزان CRP روشی حساس برای تشخیص انفارکتوس قلبی می باشد که با نشانه هایی از نکروز و التهاب بافت عضلانی همراه می باشد.

میزان بالا رفتن CRP بسته به نوع بیماری و شدت آن متفاوت است و بعد از بهبود بیماری، میزان آن سریعا به حالت نرمال باز می گردد.

8

- CRP قادر است به بعضی از باکتری ها ، قارچها ، انگل ها و حتی بعضی از سلولهای خودی مانند کلوسیتها متصل شوند. CRP در روش الکتروفورز در ناحیه بتا گلوبولینها قرار می گیرد . و از ۵ زیر واحد که به هم متصل میشوند تشکیل شده است.
- CRP در مقابل حرارت استقامت ندارد . و در حرارت ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه از بین می رود این ماده از جفت عبور نمی کند و تا کنون فقط در انسان و میمون شناخته شده است.

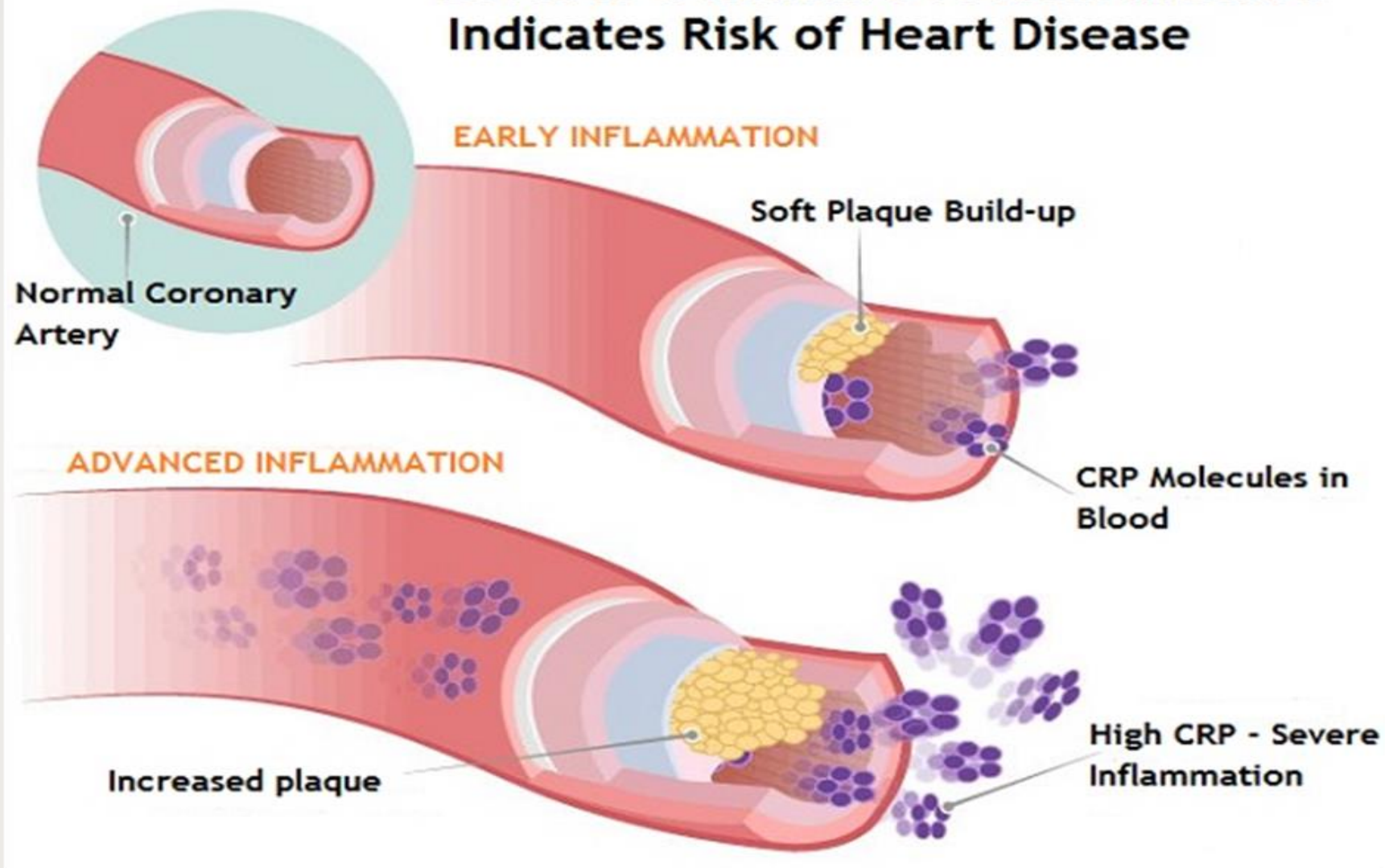
✓ در بیماریهای زیر مقدار **CRP** در سرم بالا می رود:

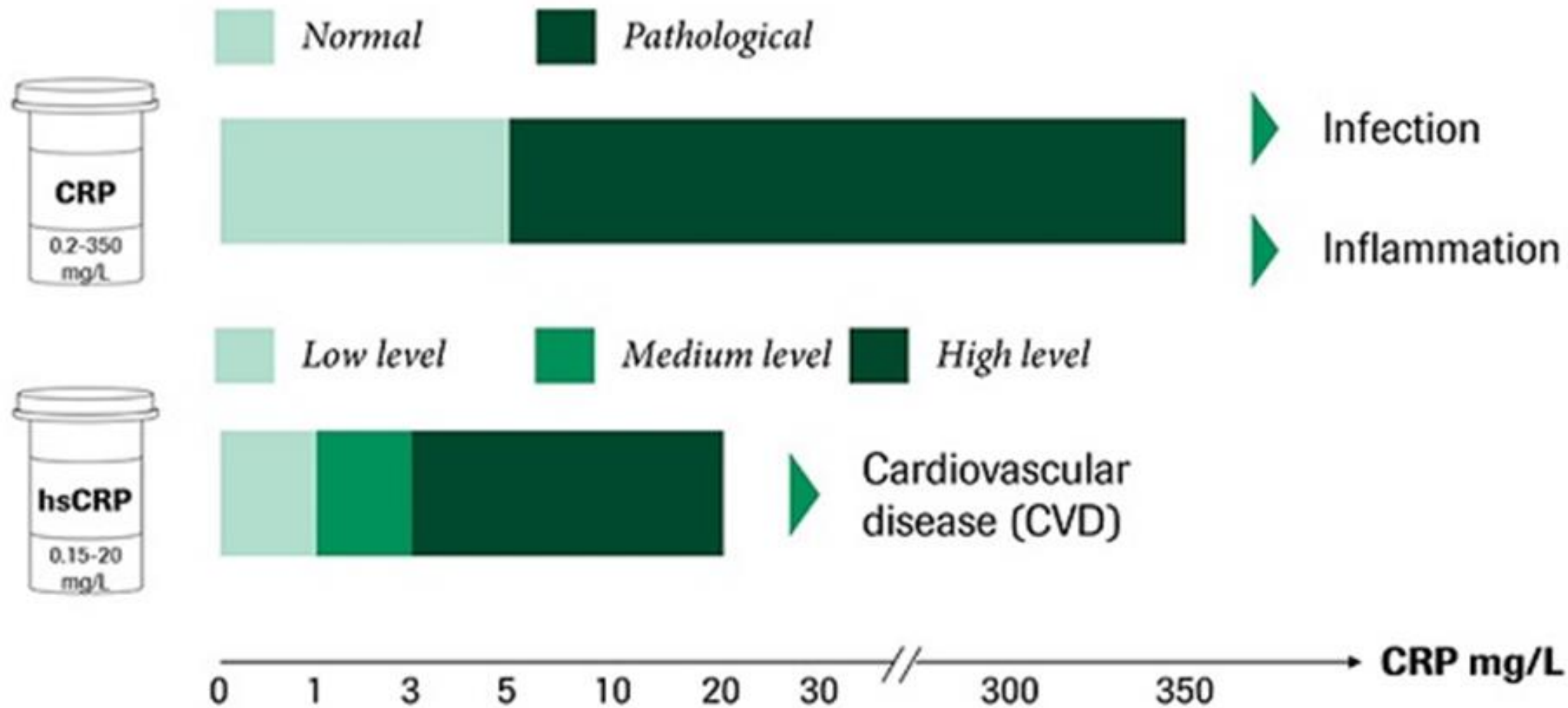
- عفونتهای باکتریایی
- تب روماتیسمی فعال
- سکته قلبی حاد
- سرطانهای بد خیم منتشر
- آرتریت روماتوئید فعال
- عفونتهای ویروسی
- سل

تست (HS CRP) C-reactive protein (HS –) برای بیماری قلبی

- ممکن است CRP برای بیماری قلبی یک فاکتور خطر باشد . به نظر می رسد اگر رگهایتان تنگ شود ، سطح CRP در خون افزایش می یابد . تست CRP به پزشک شما دقیقا نمی تواند بگوید که محل التهاب کجاست ، اگرچه این امکان وجود دارد که CRP بالا به علت وجود التهاب در جایی به جز قلب باشد.
- بنابر نظر انجمن قلب امریکا ، این تست بیشتر برای افرادی مفید است که دارای خطر متوسط (خطر ۱۰ تا ۲۰ درصدی) حمله قلبی در ۱۰ سال آینده هستند . این سطوح خطر ، ارزشیابی جهانی سطح خطر بر مبنای انتخاب ها در زندگی ، سابقه ی خانوادگی و شرایط سلامتی فعلی است.
- افراد با خطر کم حمله قلبی ، منفعت کمتری از این تست می برند و افراد با خطر بالا ، بهتر است دنبال درمان و راههای پیشگیری باشند ، جدای از اینکه نتیجه این تست چقدر بالاست.

*Level of C-Reactive Protein in Blood Indicates Risk of Heart Disease





روشهای تشخیص: CRP

روشهای سرولوژی مختلفی برای تشخیص CRP وجود دارد در قدیم از پلی ساکراید C میکروب پنوموکوک استفاده نمی شد ولی به علت مشکلات تهیه این آنتی ژن امروزه با روشهای مختلفی از قبیل پرسپیتاسیون در لوله مویینه ، ایمنودیفیوژن هماگلوتیناسیون و روش لاتکس آگلوتیناسیون مقدار CRP سرم را تشخیص و اندازه گیری می کنند . ولی از بین آنها روش لاتکس - آگلوتیناسیون از سایرین متداول تر می باشد.

آزمایش لاتکس آگلوتیناسیون (CRP - Latex Agglutination test)

اساس آزمایش : این آزمایش بر اساس آگلوتیناسیون غیر فعال معکوس reversed passive agglutination می باشد ابتدا آنتی بادی ضد اختصاصی CRP را با تزریق CRP به حیوانات آزمایشگاهی از قبیل خرگوش تهیه می کنند و سپس این آنتی بادی های اختصاصی را از طرف FC ذرات پلی استرن لاتکس Poly stren latex متصل می کنند بنابر این وقتی سرم بیماری که حاوی CRP است به ذرات فوق اضافه می شود باعث آگلوتیناسیون ذرات لاتکس می گردد این روش بسیار حساس است و بر حسب نوع کیت می توان تا یک میکروگرم CRP را در یک میلی لیتر سرم اندازه گیری نمود.

شرایط نمونه گیری آزمایش

این تست به ناشتایی نیازی ندارد اما بعضی از آزمایشگاه ها مدت چهار تا دوازده ساعت ناشتا بودن را توصیه می نمایند، در هر حال نوشیدن آب مانعی ندارد.

روش انجام آزمایش

هر جعبه آزمایش آگلوتیناسیون CRP معمولا شامل محتویات زیر می باشد.

- ۱- شیشه محتوی آنتی ژن CRP که در حقیقت آنتی CRP - می باشد که به ذرات لاتکس متصل شده است گاهی از ذرات لاتکس رنگی استفاده می شود تا آگلوتیناسیون واضحتر نمایان شود.
- ۲- شیشه محتوی سرم کنترل مثبت
- ۳- شیشه محتوی سرم کنترل منفی
- ۴- بافر نمکی تحلیسین - PH ۸٫۲ برای رقیق کردن و تیتراسیون سرم بیمار



وسایل ،دستگاه ها و مواد مورد نیاز:

- اسلاید زمینه سیاه
- قطره چکان
- لاتکس
- سرم کنترل مثبت
- سرم کنترل منفی
- نمونه سرم بیمار
- الکل
- پنبه
- اپلیکاتور

روش انجام تست CRP

روش کیفی : (Qualitative)

- ۱- همه ی معرف ها و نمونه ها را در اتاق گذاشته تا هم دما با محیط شوند. سپس به آرامی معرف لاتکس را چند بار تکان می دهیم. هیچ گاه کنترل و سرم را رقیق نکنید.
- ۲ - یک قطره از سرم، کنترل مثبت و کنترل منفی را در محل های جداگانه بر روی اسلاید مخصوص قرار دهید.
- ۳ - سپس به هر کدام از آن ها یک قطره معرف لاتکس CRP اضافه کنید.
- ۴ - هر کدام از محتویات سه جایگاه را با اپلیکاتور چوبی جداگانه (یا قطعات کوچک پلاستیکی موجود در کیت که برای این کار تعبیه شده اند) مخلوط کرده و آن ها را در محدوده ی مشخص پخش می کنیم.
- ۵ - اسلاید را به مدت ۲ دقیقه حرکت دورانی می دهیم و یا آن را به آرامی جلو و عقب می کنیم.
- ۶ - مشاهده ی آگلوتیناسیون

نتیجه آگلوتیناسیون را زیر نور بررسی می کنیم به صورت زیر گزارش می شود.

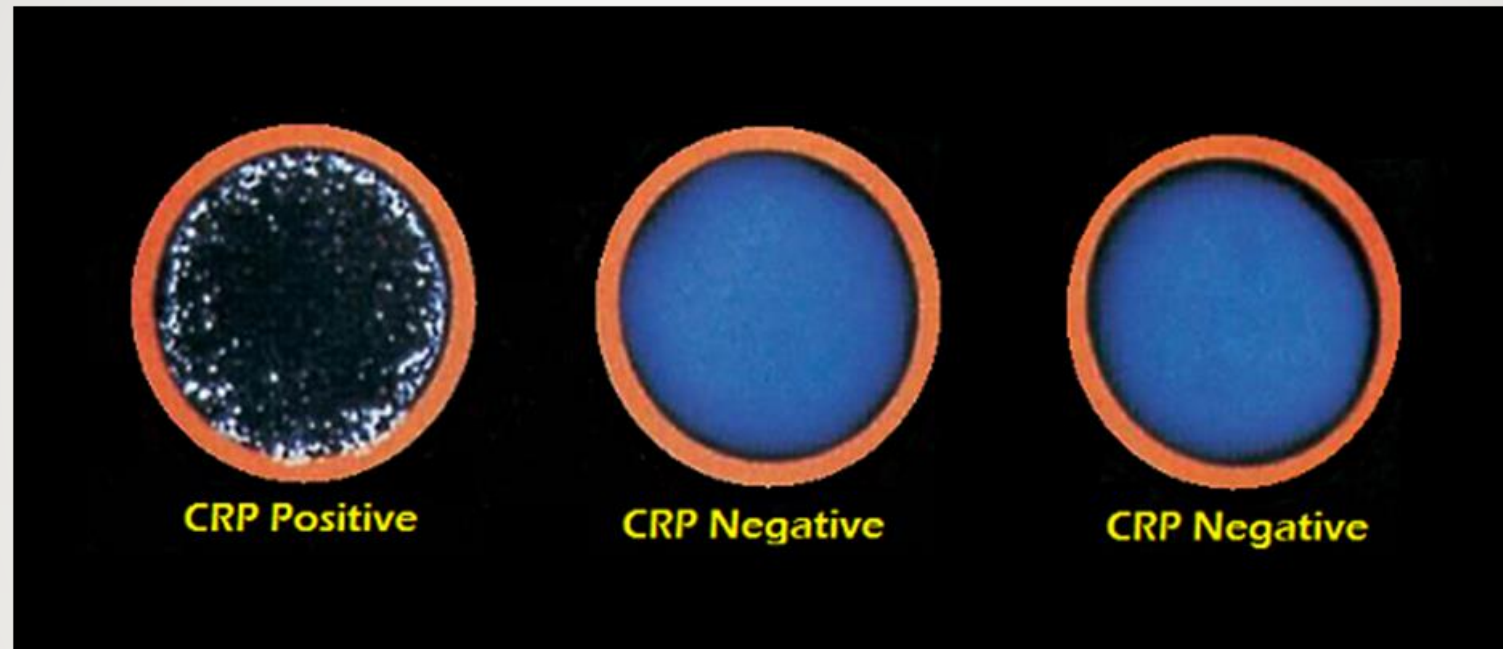
✓ آگلوتیناسیون درشت ++++ (+۴)

✓ آگلوتیناسیون درشت +++ (+۳)

✓ آگلوتیناسیون متوسط ++ (+۲)

✓ آگلوتیناسیون ریز + (+۱)

✓ آگلوتیناسیون مشاهده نمی شود (سوسپانسیون یکنواخت و شیری رنگ) - (منفی)



21

قبل از انجام آزمایش سرم وجعبه آزمایش را از یخچال بیرون آورد و حدود ۱۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه قرار دهید تا به حرارت محیط برسند.

۱- در روی یک لام بزرگ و تیره که معمولا همراه جعبه آزمایش می باشد . یک قطره سرم بیمار حرارت دیده یک قطره سرم یک قطره سرم کنترل مثبت و یک قطره سرم کنترل منفی را در سه نقطه لام قرار دهید.

۲- شیشه محتوی آنتی ژن لاتکس را به آرامی تکان داده تا به صورت محلول یکنواخت در آید و سپس با قطره چکان همراه بر روی هر کدام از سرم های فوق یک قطره از این آنتی ژن را اضافه نمایید.

۳- با اپلیکاتور چوبی جداگانه هر کدام از سرم ها را با آنتی ژن مخلوط کرده و به اندازه دایره ای به قطر ۲٫۵ سانتیمتر و بر روی لام پهن نمایید .

۴- لام را در دست یا روی روتاتور به آرامی حرکت دورانی داده و نتیجه آگلوتیناسیون را در زیر نور یک چراغ در مدت معینی که در بروشور ذکر شده بخوانید در صورتیکه سرم بیمار حاوی CRP باشد آگلوتیناسیون دیده میشود (معمولا بین ۲ تا ۵ دقیقه نتیجه معلوم خواهد شد) در این صورت ذرات لاتکس به صورت توده های درشت به هم چسبیده نمایان میشود و چنان چه ذرات لاتکس به صورت یک نواخت پراکنده باشند نتیجه آزمایش منفی است.

22

- ✓ گاهی مقدار CRP در سرم بیمار زیاد است و در نتیجه به علت پدیده منطقه ای ممکن است یک سرم مثبت اشتباهاً منفی گزارش شود بنابراین بهتر است اگر CRP منفی شد قبل از اینکه آن را منفی گزارش کنیم با رقت ۱:۵ آزمایش را تکرار کنیم.
- ✓ سرم بیمار باید تازه باشد در صورتی که نمی توانید همان روز آزمایش را انجام دهید ۴۸ تا ۷۲ ساعت سرم را در یخچال ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید چنانچه بعد از ۷۲ ساعت میخواهید با ید سرم را یخ بزیند و سرم بیش از یک بار نباید یخ بزند.
- ✓ سرم بیمار باید شفاف و فاقد هر گونه ذرات باشد.
- ✓ لام در درجه حرارت اطلاق نگهداری نمایید.
- ✓ لام باید تمیز باشد و پس از هر آزمایش با آب شسته و با دستمال خشک کنید چنانچه اثرات صابون و سایر مواد پاک کننده بر روی آن باشد ممکن است مانع واکنش آنی ژن و آنتی بادی شود.
- ✓ اگر مقدار چربی در سرم و با فاکتور روماتوئیدی سرم زیاد باشد . به طور کاذب CRP مثبت می شود.
- ✓ سعی کنید از پلاسما برای آزمایش CRP استفاده نکنید زیرا ممکن است فیبروزن موجود در آل سیب آگلوتیناسیون کاذب ذرات لاتکس گردد.
- از سرم حرارت دیده برای آزمایش های لاتکس استفاده نمائید زیرا اگر مقدار جزئی کمپلمان سرم زیاد باشد ایجاد مثبت کاذب میکند.

- گاهی مقدار CRP در سرم زیاد است و در نتیجه به علت پدیده منطقه ای ممکن است یک سرم مثبت اشتباه منفی گزارش شود بنابراین بهتر است چنانچه CRP سرمی منفی شد قبل از آنکه آن را منفی گزارش کنیم با رقت ۱:۵ یا بیشتر آزمایش را تکرار کنیم گاهی لازم است مقدار کمی CRP موجود در سرم را اندازه گیری نمائیم زیرا که مقدار CRP نسبت مستقیم با شدت التهاب دارد برای این کار ابتدا باید سرم را به نسبت های ۱:۲ یا گاهی ۱:۶۴ و یا گاهی تا ۱:۱۲۸ با بافر موجود در جعبه یا بافر PH:8/2 در لوله ها رقیق می کنیم سپس با هر کدام از این رقت ها مانند طریقه کیفی آزمایش CRP-Latex را انجام داده و رقیق ترین لوله ای از سرم که مثبت شود تیترا CRP آن سرم می باشد .

روش نیمه کمی: (Semi-Quantitative)

24

رقط	CRP در نمونه ی رقیق نشده (میکروگرم بر میلی لیتر)
۱:۲	۱۴
۱:۴	۲۸
۱:۸	۵۶
۱:۱۶	۱۱۲
۱:۳۲	۲۲۴
۱:۶۴	۴۴۸

25

۲ - سپس فرآیند هر رقت همانند روش کیفی است که در بالا توضیح داده شد (پس از رقت سازی نمونه با سرم فیزیولوژی - ۱:۲ و ۱:۴ و ... - باید معرف لاتکس CRP را اضافه کنیم).

۳ - در صورت مشاهده ی آگلوتیناسیون باید تیتراژ آن را حساب کنیم که در پایین به آن اشاره شده. در صورتی که آگلوتیناسیون مشاهده نشد، Negative گزارش می کنیم.

✓ تفسیر نتایج تست : CRP

✓ مثبت : (Positive) وجود آگلوتیناسیون ذرات لاتکس، نشان دهنده ی حضور پروتئین واکنشگر C در سرم

✓ منفی : (Negative) عدم آگلوتیناسیون

✓ برای نتایج روش نیمه کمی، آخرین رقت از سرم با آگلوتیناسیون قابل مشاهده، تیتراژ CRP سرم می باشد.

• محاسبه تیتر :

- میزان CRP بر حسب (ug/ml میکروگرم بر میلی لیتر = γ ضرب در A) که A همان بالاترین رقت سرم است که آگلوتیناسیون را نشان داده است و γ میزان حساسیت بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر است.
- نکته : بعضی از آزمایشگاه ها به جای استفاده از عدد γ ، از عدد ۶ استفاده می کنند یعنی برای به دست آوردن میزان CRP نیمه کمی، عدد ۶ را در فرمول بالا قرار می دهند.
- مثال : بالاترین رقتی که آگلوتیناسیون داده، رقت ۸:۱ است پس برای به دست آوردن CRP نیمه کمی باید عدد ۸ (که عکس رقت است) را در میزان حساسیت (می تواند عدد ۶ یا ۷ باشد) ضرب می کنیم.

✓ داروهای تداخل کننده:

- ✓ داروهایی که باعث افزایش سطح CRP شوند عبارتند از: قرص های ضد بارداری خوراکی
- ✓ داروهایی که باعث کاهش سطح CRP شوند عبارتند از: ضد التهاب های غیراستروئیدی، سالیسیلاتها، استروئیدها

• خطاهای آزمایشگاهی :

- گاهی اوقات مقدار CRP در سرم بیمار بسیار زیاد است، در نتیجه به علت پدیده منطقه‌ای (Zone Phenomenon) ممکن است یک سرم مثبت، اشتباها منفی گزارش شود. بنابراین بهتر است چنانچه آزمایش CRP سرمی منفی شد، قبل از اینکه آن را منفی گزارش شود با رقت ۱/۵ یا بیشتر آزمایش را تکرار گردد.

تفسیر تست CRP

CRP یک پروتئین واکنشگر فاز حاد غیراختصاصی است و اغلب برای تشخیص عفونت های باکتریایی و اختلالات التهابی مانند RA و تب روماتیسمی استفاده می شود. CRP در طی یک دوره التهاب حاد و سایر بیماری ها در کبد ساخته می شود. پاسخ مثبت نشان دهنده وجود بیماری است ولی این تست علت بیماری را مشخص نمی کند.

آزمایش CRP نسبت به ESR شاخص حساس تر و وسیع تری است. در التهاب حاد CRP سریع تر و بیش تر از ESR افزایش می یابد و با بهبودی بیمار، سریع تر به مقدار طبیعی باز می گردد. ممکن است از آزمایش CRP برای تشخیص عفونت پس از زخم استفاده شود. سطح CRP چهار تا شش ساعت پس از جراحی افزایش می یابد و از روز سوم پس از عمل جراحی شروع به کاهش می کند. پایین نیامدن غیرطبیعی سطح CRP می تواند نشان دهنده عفونت یا سکتة ریوی باشد.



با تشکر از حسن
توجه شما