مقدمه

سرولوژی (Serology) از دو واژه سرم (Serum) و لوژی (Logy) به معنای شناختن و شناسایی تشکیل یافته است. به عبارت دیگر، سرولوژی به کلیه آزمایشات و مطالعاتی که بر روی سرم انسان و یا حیوانات خونگرم دیگر انجام می گیرد، اطلاق می شود. امروزه آزمایشهای سرولوژی بالینی، یکی از روشهای سریع و آسان در تشخیص بیماریها می باشد. اساس همه آزمایشهای سرولوژی، واکنش آنتی بادی اختصاصی (Specific antibody) به آنتی ژن مربوطه می باشد. آنتی ژن مورد نظر می تواند باکتری، ویروس، گلبول قرمز، پروتئین، هورمون و یا چیزهای دیگر باشد. اتصال آنتی بادی به آنتی ژن یک واکنش اختصاصی، دو طرفه و برگشت پذیر می باشد، زیرا در اتصال آنتی بادی به آنتی ژن، پیوندهای ضعیف (پیوندهای هیدروفوب، هیدروژنی، یونی و واندروالس) مشارکت دارند.

آنتی بادی (Ab) + آنتی ژن (Ag) $\rightleftharpoons$ (Ab- Ag)

عوامل مؤثر بر واکنش آنتی بادی و آنتی ژن

۱) *قدرت اتصال آنتی بادی به آنتی ژن (Avidity)*

هر چه قدرت اتصال و یا میل پیوندی آنتی بادی به آنتی ژن بیشتر باشد، کمپلکس آنتی بادی و آنتی ژن مشکلتر از یکدیگر جدا می شوند.

۲) *pH محیط*

مناسبترین pH برای واکنش آنتی بادی و آنتی ژن (واکنشهای سرولوژی) ۷/۲ یا همان pH فیزیولوژیک بدن انسان می باشد. در pH های بالاتر (بازی) و یا پایین تر (اسیدی)، اتصال آنتی بادی به آنتی ژن ضعیف می باشد. در میان کلاسهای مختلف آنتی بادیها (IgE, IgD, IgA, IgG, IgM)) ، آنتی بادی IgD نسبت به pH اسیدی بسیار حساس بوده و در محیط اسیدی، شکل طبیعی خود را از دست می دهد (دناتوره می شود).

۳) *قدرت یونی محیط (Ionic Strength)*

واکنش آنتی بادی و آنتی ژن در محیط فاقد یون (مانند آب مقطر) صورت نمی گیرد. از طرفی قدرت یونی زیاد هم، باعث رسوب آنتی بادی و آنتی ژن پروتئینی می شود. در این میان معمولاً استفاده از سرم فیزیولوژی ۰/۱۵ مولار یا ۸/۵ gr/L (۸/۵ گرم نمک طعام (Nacl) در یک لیتر آب مقطر) برای رقیق کردن سرم بیمار و واکنشهای سرولوژی، بسیار مناسب است.

۴) *تأثیر مواد احیاء کننده (Reducing Agents)*

در میان کلاسهای مختلف ایمونوگلبولینها، آنتی بادی های IgE، IgD و IgM نسبت به مواد احیاء کننده ای نظیر 2-ME (۲-مرکاپتواتانول، 2-Mercaptoethanol) و DTT (دی تیوتریتول،

Dithiothreitol) حساسیت بیشتری نسبت به IgG و IgA دارند. به عنوان مثال اگر در آزمایشی، تعیین کلاس آنتی بادی مورد نظر باشد، (مانند آزمایش 2ME- wright برای تشخیص بیماری تب مالت مزمن)، با اضافه کردن مقدار معینی از یک ماده احیاء کننده برروی سرم بیمار، IgM تجزیه شده ولی IgG سالم مانده و اندازه گیری می شود (برای مطالعه بیشتر به آزمایشهای سرولوژی تشخیص تب مالت (بروسلوز) مراجعه نمایید).

نکته: در غلظت زیاد مواد احیاء کننده تمام کلاسهای مختلف آنتی بادیها، تجزیه می شوند.

۵) *دما*

مناسبترین دما برای واکنشهای آنتی بادی و آنتی ژن، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (دمای فیزیولوژیک بدن انسان) می باشد. در دماهای بالاتر از ۵۶ ̊c به مدت نیم ساعت آنتی بادیهای IgD و IgE و همچنین کمپلمان سرم، خواص بیولوژیکی خود را از دست می دهند. در درجه حرارتهای بالاتر از ۷۰ درجه نیز تمام کلاسهای آنتی بادی، دناتوره شده و نمی توانند به آنتی ژن متصل شوند.

۶) *زمان (Incubation time)*

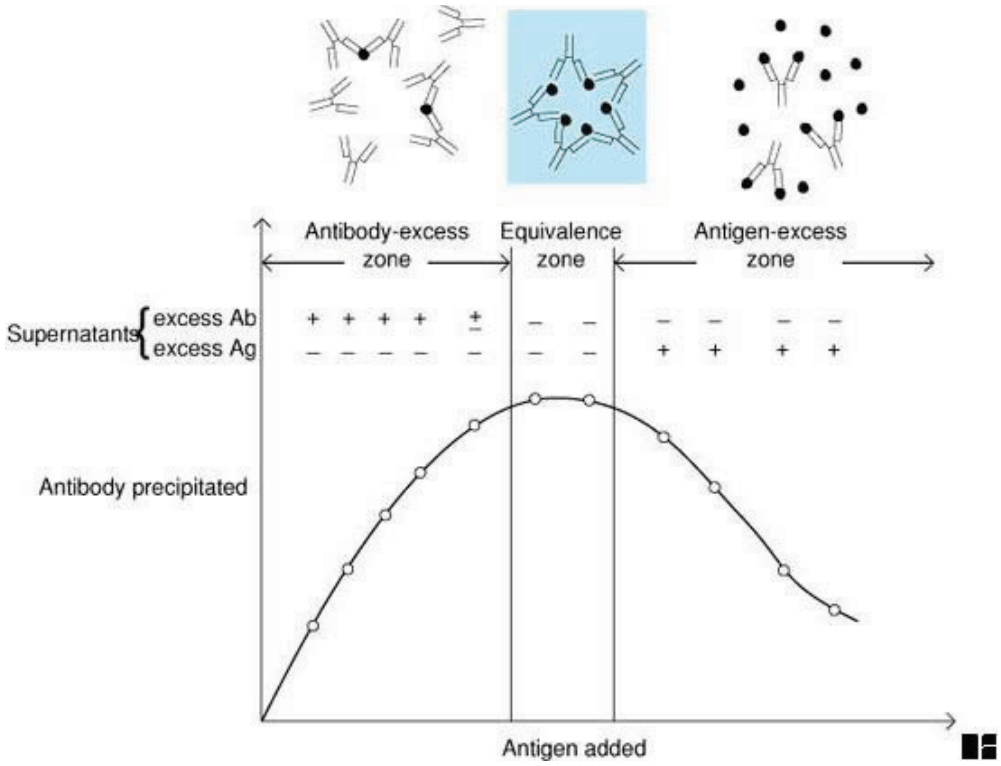
اتصال مولکولهای آنتی بادی به آنتی ژن، معمولاً بسرعت و در عرض چند ثانیه صورت می گیرد، ولی برای تشکیل کمپلکس و دیدن واکنش مدت زمانی وقت لازم است که البته این مدت زمان برای هر

آزمایش با توجه به نوع آنتی ژن و کلاس آنتی بادی متفاوت است. بطور کلی چنانچه آنتی بادی از کلاس IgM (IgM ساختمان پنتامری دارد یعنی از ۵ مونومر تشکیل شده است و از نظر تئوری دارای ۱۰ ناحیه اتصال به آنتی ژن می باشد، در مقابل کلاسهای دیگر آنتی بادیها، اکثراً ساختار مونومری دارند و تنها دارای ۲ ناحیه اتصال به آنتی ژن می باشند) و مولکولهای آنتی ژن، درشت باشند، زمان لازم برای دیده شدن کمپلکس آنتی بادی – آنتی ژن کوتاهتر از کلاس IgG است. مانند تعیین گروه خونی ABO در مقایسه با گروه خونی Rh.

۷) *نسبت غلظت آنتی بادی و آنتی ژن*

اولین بار هایدلبرگر (Heidelberger) و همکارانش نشان دادند که غلظت آنتی بادی اختصاصی و آنتی ژن مربوطه باید با یکدیگر متناسب باشد تا تمام آنتی بادی موجود در لوله آزمایش به آنتی ژن مجاورش متصل شود و حداکثر واکنش سرولوژی انجام پذیرد. این محققین مقادیر متفاوتی از یک آنتی ژن پلی ساکاریدی را در لوله های آزمایش ریخته و به آنها مقدار ثابتی از آنتی بادی ضد آن را اضافه نمودند. سپس لوله های محتوی آنتی بادی و آنتی ژن را مدتی در گرمخانه (Incubator) ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دادند تا واکنش 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، حذف شوند، سپس مقدار

پروتئین موجود در رسوب را بوسیله روش کجلدال (Kjeldahl) اندازه گیری نمودند. از آنجایی که آنتی ژن بکار برده شده فاقد پروتئین بود، بنابراین تمام پروتئین اندازه گیری شده، نشاندهنده مقدار آنتی بادی اختصاصی است که به آنتی ژن متصل و رسوب داده شده است. حال چنانچه مقدار پروتئین رسوب داده شده را نسبت به ترتیب لوله های آزمایش، بر روی منحنی رسم کنیم، نمودار شماره ۱ بدست می آید.



نمودار ۱: *منحنی واکنش رسوبی مقدار ثابت آنتی بادی با غلظتهای مختلف آنتی ژن (منحنی هایدلبرگر)*

با توجه به این منحنی، مشاهده می شود که در لوله های آزمایش ابتدایی از سمت چپ، مقدار آنتی ژن نسبت به آنتی بادی کمتر است. در این لوله ها مقدار آنتی بادی رسوب داده شده نیز کمتر از لوله های

وسط می باشد. در لوله های ابتدایی، مقداری از آنتی بادی آزاد می باشد که شسته شده و محاسبه نگردیده است. به این ناحیه، منطقه فزونی آنتی بادی (Antibody-excess Zone) یا پروزون (Prozone) گفته می شود. در لوله های وسط، منطقه ای است که تقریباً تمام آنتی بادی موجود در لوله آزمایش به آنتی ژن متصل شده و رسوب کرده است. به این ناحیه، منطقه تعادل (Equivalence zone) می گویند. در لوله های سمت راست منحنی، نسبت مقدار آنتی ژن بتدریج نسبت به مقدار ثابت آنتی بادی افزایش بیشتری پیدا می کند و منحنی سیر نزولی را طی می کند و در نتیجه مقدار آنتی بادیی که به آنتی ژن متصل شده و رسوب نموده است، کاهش می یابد. این ناحیه را منطقه فزونی آنتی ژن (Atigen-excess Zone) یا پستزون (Postzone) می نامند.

کاربرد عملی نمودار ۱ در تمام آزمایشهای سرولوژی می باشد. بر اساس این نمودار، چنانچه در تیتراسیون سرم بیماری، در لوله های اول، جواب آزمایش منفی ولی در لوله های وسط مثبت شود و یا بطور غیر یکنواخت، لوله های آزمایش مثبت و منفی شوند، علت آن همین نامتناسب بودن غلظتهای آنتی بادی و آنتی ژن نسبت به یکدیگر می باشد. به این وضعیت در اصطلاح، پدیدهٔ منطقه ای (Zone Phenomenon) می گویند. از جمله آزمایشهایی که پدیدهٔ منطقه ای ممکن است در آنها اتفاق بیفتد، می توان به آزمایش رایت (برای تشخیص بیماری تب مالت) و CRP اشاره کرد.

انواع واکنشهای سرولوژی

بوسیله آزمایشهای سرولوژی، می توان یک آنتی ژن یا یک آنتی بادی مجهول را شناسایی و مقدار آن را اندازه گیری کرد. وقتی که یک آنتی ژن با آنتی بادی اختصاصی ضد آن، با یکدیگر مخلوط شوند، بر اساس شکل و یا ساختمان مولکولهای آنتی ژن، کمپلکسهای آنتی بادی و آنتی ژن به شکلهای مختلفی تشکیل شده و رسوب می کنند. بنابراین بر اساس ماهیت و شکل مولکولهای آنتی ژن، واکنشهای سرولوژی را به سه دسته تقسیم می کنند:

۱) واکنشهای آگلوتیناسیون یا متراکم (Agglutination Reactions)

اگر آنتی ژن یک ذره نامحلول مانند یک باکتری، باشد واکنش را آگلوتیناسیون گویند. اگر آنتی ژن نامحلول، گلبول قرمز باشد، اصطلاحاً به آن، واکنش هماگلوتیناسیون (Hemagglutination) گویند. در واکنشهای آگلوتیناسیون، به آنتی بادی، آگلوتینین (Agglutinin)، به آنتی ژن، آگلوتینوژن (Agglutinogen)، و به واکنش صورت گرفته آگلوتیناسیون (Agglutination)گویند.

از طرفی خود واکنشهای آگلوتیناسیون را بر اساس ماهیت شاخصهای آنتی ژنی در مولکولهای آنتی ژن، می توان به سه دسته تقسیم کرد:

الف) واکنشهای آگلوتیناسیون فعال (Active) یا مستقیم (Direct)

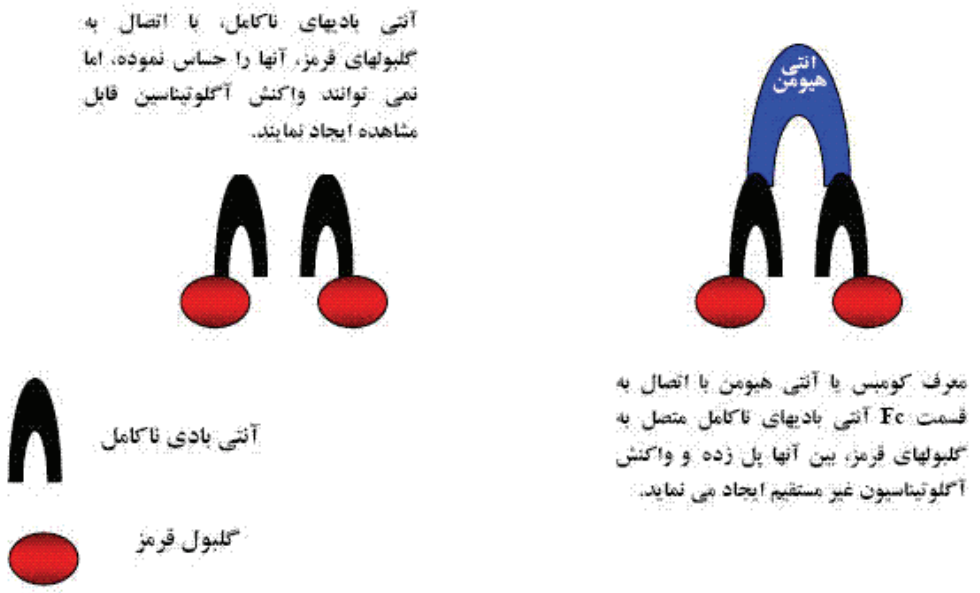
در این دسته از واکنشهای آگلوتیناسیون، شاخصهای آنتی ژنی (Antigenic Determinants) یا اپی توپ، جزء ساختمانی خود آنتی ژن نامحلول می باشد، مانند آزمایشهای رایت (Wright) و ویدال (Widal)، که در این آزمایشها از میکروب کشته شده بروسلا (Brucella) و سالمونلا (Salmonella) به ترتیب برای تشخیص بیماری تب مالت و حصبه استفاده می شود.

ب) واکنشهای آگلوتیناسیون غیر فعال (Passive)

اگر آنتی ژن محلول را بخواهیم به روش آگلوتیناسیون شناسایی نماییم، باید به روش آگلوتیناسیون پسیو عمل نماییم. بدین منظور می بایست آنتی ژن محلول را به ذرات غیر محلول متصل کرد. از آنجا که در این دسته واکنشهای آگلوتیناسیون، شاخصهای آنتی ژنیک، جزء ساختمانی ذره غیر محلول نمی باشد، به آنها واکنشهای آگلوتیناسیون پسیو یا غیر فعال می گویند. از ذرات غیر محلول که بیشترین کاربرد را در آزمایشهای سرولوژی دارند، می توان به ذرات لاتکس (از جنس ذرات بسیار ریز پلاستیک است) و گلبولهای قرمز گوسفند اشاره کرد. از ذرات غیر محلول دیگری که بندرت استفاده می شوند. می توان به ذرات بنتونایت (Bentonite) زغال چوب (Charcoal) اشاره کرد. به عنوان مثال در آزمایشهای سرولوژی تشخیص فاکتور روماتوئیدی (RF) و حاملگی، به ترتیب آنتی بادی IgG و هورمون hCG انسان را که محلول هستند، به ذرات غیر محلول لاتکس متصل کرده اند.

ج) واکنشهای آگلوتیناسیون غیر مستقیم (Indirect)

گاهی به علت وجود آنتی بادیهای ناقص (Incomplete) یا مسدود کننده (Blocking Antibody)، فقط یک بازوی آنتی بادی به آنتی ژن غیر محلول متصل می شود که در نتیجه شبکه بین آنتی بادی و آنتی ژن تشکیل نشده و آگلوتیناسیون دیده نمی شود. در چنین مواردی برای مشاهده آگلوتیناسیون و در صورتیکه آنتی بادی ناقص، انسانی باشد، از آنتی هیومن (آنتی بادی ضد آنتی بادی انسانی یا آنتی گاماگلبولین) استفاده می شود (شکل زیر)، مانند آزمایش کومبس رایت. به این روش آگلوتیناسیون غیر مستقیم گویند.



۲) واکنشهای رسوبی یا پرسیپیتاسیون *(Precipitation Reactions)*

اگر در واکنشهای سرولوژی، آنتی ژن یک ذره محلول باشد (مانند هورمون، پروتئین های موجود در سرم و غیره) واکنش رسوبی یا پرسیپیتاسیون نامیده می شود. در واکنشهای پرسیپیتاسیون، به آنتی بادی، پرسیپیتین (Precipitin)، به آنتی ژن پرسیپیتینوژن (Precipitinogen)، و به واکنش صورت گرفته پرسیپیتاسیون (Precipitation)گویند. واکنشهای رسوبی در محیط نیمه جامد مانند ژل، انجام می شوند.

۲) واکنشهای فلوکولاسیون *(Fluccolation Reactions)*

وقتی که در واکنشهای سرولوژی، آنتی ژن بصورت ذرات کلوئیدی باشد، مثل کاردیولیپین قلب گاو در آزمایش VDRL (برای تشخیص بیماری سیفیلیس)، واکنش را فلوکولاسیون می نامند.

از طرفی، واکنشهای سرولوژی آزمایشگاهی را می توان به دو دسته اولیه و ثانویه نیز تقسیم نمود:

واکنشهای اولیه سرلوژی در واقع، واکنش بین یک مولکول آنتی ژن با یک یا چند ظرفیت، با مولکول آنتی بادی می باشند. واکنشهای اولیه سرلوژی بخودی خود، مستقیماً قابل مشاهده نیستند. برای مشاهده این دسته واکنشها باید آنتی بادی یا آنتی ژن را بوسیله موادی از جمله مواد فلورسنت (مانند FITC و PE)، مواد رادیو اکتیو (مانند ید ۱۲۵: I ۱۲۵) و یا آنزیم (مانند آنزیمهای آلکالین فسفاتاز: ALP و

پراکسیداز HRP) نشاندار کرد. این گونه آزمایشهای سرولوژی را بر حسب نوع ماده نشاندار به ترتیب آزمایشهای ایمونو فلورئورسنت (IFA: Immunofluorescent assay)، رادیو ایمونواسی (RIA: Radioimmuno assay) و الایزا (ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent assay) می نامند.

این دسته از آزمایشات از حساسیت بسیار بالایی برخوردار هستند و مقادیر بسیار جزئی از آنتی بادی و یا آنتی ژن را می توانند شناسایی کنند.

واکنشهای ثانویه در حقیقت تجلی اجتماع چندین مولکول آنتی ژن و آنتی بادی است که به صورتهای پرسیپیتاسیون، آگلوتیناسیون و یا فلوکولاسیون، در صورتی که مقادیر کافی آنتی ژن و آنتی بادی موجود باشند، دیده می شوند.

iranpuyesh.ir