ایمونولوژی عملی

گروه ایمونولوژی

دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

رشته پزشکی

نیم واحد

نیمسال دوم 95- 94

تاریخ بازبینی94.12.12.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
مقدمات	3
تکنیک های جداسازی سلولهای تک هسته ای خون محیطی	7
واکنشهای آگلوتیناسیون-رایت وCRP و RF	10
واکنشهای هماگلوتیناسیون- انتقال خون	18
نوترالیزاسیون- ASO و تست شیک و مالونی	23
ایمونوپرسی پیتاسیون	31
الایزا	42
ایمونوفوئورسانس و فلوسایتومتری	46
آزمونهای ملکولی، تکثیرِ DNA	57

با ویرایش:

کبری بامداد مهربانی، افشینه لطیفی نیا(اعضای هیئت علمی گروه ایمونولوژی)- فریماه معصومی -جواد موسوی(دانشجویان PhD ایمونولوژی پزشکی)

تدوین: کبری بامداد مهربانی

آزمایشگاه ایمونولوژی

مقدمات

تعاریف:

آنالیت: هر ماده، ترکیب یا عنصری که بدنبال بررسی وجود یا فقدان و یا سنجش میزان آن در مایعات بیولوژیک هستیم.

حساسیت آنالیتیکی: کمترین میزان آنالیت که به وسیله یک روش قابل اندازه گیری باشد.

ویژگی آنالیتیکی: توانائی یک روش ی در اندازه گیری اختصاصی یک آنالیت مشخص و بعبارت دیگر توانائی تمایز آنالیت های مشابه از یکدیگر.

نمونه های بیولوژیک: هر نمونه ای که برای سنجش میزان یا بود و نبود یک یا چند آنالیت بررسی می شود. نمونه ها از منابع مختلف تهیه می شود از جمله نمونه های خون کامل، سرم، پلاسما،مایع مغزی-نخاعی(CSF)، مایع آسیت، مایع پریتوان، مایع سینویال و بیوپسی از بافتها که از بیماران تهیه میشود یا اینکه نمونه ها از سیستم های IN-Vitro مثل سوپ روئی کشت سلول و بافت و امثال آن تهیه می شود.

In-Vivo: به بررسی هایی که در بدن موجود زنده انجام می گیرد اصطلاحا آزمایشات در محیط In-Vivo گفته می شود مثل آزمون های پریک (برای بررسی حساسیت به آلرژن های خاص) یا تست PPD (برای بررسی پاسخ ایمنی به مایکوباکتریوم ها).

In-Vitro: به بررسی هایی که در خارج بدن موجود زنده و در محیط با فراهم کردن محیط مشابه سیستم زنده انجام می گیرد اصطلاحا آزمایشات در محیط In-Vitro گفته می شود.

دقت (Precision): نمایانگر این است که اندازه گیری یک آنالیت در نوبت های مختلف چقدر به یکدیگر نزدیک است به عبارت دیگر بیانگر میزان تکرار پذیری یک روش می باشد.

صحت(Accuracy): بیانگر این است که اساسا اندازه گیری ها چقدر به میزان واقعی آنالیت در نمونه نزدیک است.

کاربردهای دانش ایمونولوژی:

پروتکل ها و روش هائی که با استفاده از دانش ایمونولوژی طراحی و اجراء می شوند درچهار حوزه علوم پزشکی و زیستی کاربرد دارند.

الف) تشخیص: استفاده از روشهای ایمونولوژی از قدیم برای تشخیص بیماری های مختلف و سنجش آنالیت های مختلف استفاده می شده اما امروزه با پیشرفت ایمونولوژی، کاربرد آن نیز در تشخیص بیماری ها اهمیت بیشتری پیدا کرده است بطوری که به تحقیق می توان گفت که روشهای ایمونولوژیک در اکثریت سنجش های آزمایشگاهی استفاده می شوند.

ب)درمان: کاربرد ایمونوگلوبولین ها و آنتی بادی های مونوکلونال در درمان بیماری های نقص ایمنی و سرطانها امروزه جزء متداول ترین درمانها محسوب می شود که کارائی این درمان ها نیاز به تسلط پزشک معالج به اساس روشهای تولید و استفاده این فراورده ها که امروزه از آنها بعنوان دارو یاد می شود، دارد.

ج)پیشگیری: واکسیناسیون بعنوان موثرترین راه پیشگیری از بیماریها جزء اولین دستاوردهای علم ایمونولوژی بحساب می آید. تولید واکسن ها مستلزم بکار گیری مجموعه ای از روشهای مختلف ایمونولوژی است که امروزه در موسسات مختلف انجام می شود.

د)تحقیق: یکی از بازوهای بسیار ضروری و کارآمد پژوهش در حوزه های مختلف علوم زیستی، علوم و فن آوری های مبتنی بر ایمونولوژی است. از این جهت کسانی که رویای ورود در پژوهش های علوم پزشکی را در سر دارند گریزی از آموختن عمیق مباحث و روشهای ایمونولوژی ندارند.

بهداشت و سلامت کار در ایمونولوژی:

قبل از هرچیز باید به خاطر داشت که هر نمونه درآزمایشگاه خطرناک و آلوده کننده است مگر آنکه با روشهای مناسب از سلامت آن مطمئن شویم. از این جهت کار در ازمایشگاه نیازمند اطلاع کامل از خطرات و تهدیدات ناشی از آن در محیط های آزمایشگاهی و آگاهی از روش های پیش گیری و مواجهه با خطرات احتمالی است .کار در ایمونولوژی مستلزم استفاده مداوم از انواع مواد شیمیائی و بیولوژیک است. برای حفظ سلامتی خود و اطرافیان باید با اصول، مفاهیم و علائم هشدار دهنده مرتبط با ایمنی فردی آشنائی کامل داشت.

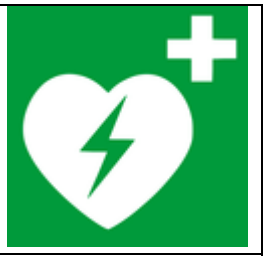
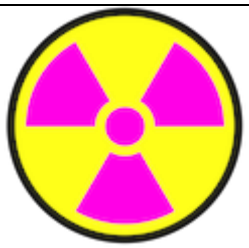
برگه های اطلاعات ایمنی مواد (MSDS): (Material Safety Data Sheet)

هنگامی که با مواد شیمیایی مختلف کار میکنیم امکان بروز حوادث مختلف نظیر تماس پوستی، بلع، استشمام، رها شدن یا ریخته شدن مواد در محیط و غیره وجود دارد. بنابراین بسیار مهم است که بدانیم در مقابله با این حوادث چگونه باید عمل نمود. اطلاعات لازم برای این منظور در برگه هایی بنام برگه های اطلاعات ایمنی مواد یا همان MSDS جمع آوری میگردد که در موارد اضطراری میتوان از آنها استفاده نمود. MSDS مواد مختلف را می توان از تولید کنندگان آنها مطالبه نمود.

از آنجاییکه اینگونه اطلاعات گاهی بصورت اضطراری و بدون پیش بینی قبلی مورد نیاز واقع میشوند، باید برگه های اطلاعات ایمنی مواد شیمیایی مورد استفاده را پرینت نموده و بترتیب نام آیوپاک آنها در یک زونکن در محل قابل دسترس عموم در آزمایشگاه نگهداری نمود تا در صورت نیاز، امکان دسترسی سریع به آنها فراهم باشد.

در یک فرآیند صحیح، دانشجویان و محققین پیش از کار با یک ماده شیمیایی ابتدا باید آشنایی کافی با آن و خطرات احتمالی ناشی از آن را کسب نمایند و سپس به سایر مراحل بپردازند. در چنین سیستمی هیچگاه وقت صرف شده برای آشنایی با خواص و خطرات ماده، وقت از دست رفته و تلف شده محسوب نمی گردد. از طرفی رعایت اصول ایمنی و بهداشتی بروز خطرات احتمالی ناشی از مواد بیولوژیک (**Biohazard) را** کاهش می دهد. Biohazard به ارگانیسم ها و یا مواد مشتق از آنها اطلاق می شود که تهدیدی برای سلامتی انسان و بهداشت محیط اطراف محسوب می شوند. بدین سبب از نظر شدت ریسک، عوامل BioHazard را به چهار سطح طبقه بندی می کنند. ریسک سطح یک از همه پایینتر و ریسک طبقه چهار از همه بالاتر است . رعایت اصول ایمنی سطح یک برای کار با عوامل، تجهیزات و امکانات مورد مصرف در کلاسهای آموزشی دوره علوم پایه و انواع دیگری از آنها مناسب است زیرا عوامل زنده به کار برده شده در ان مشخص بوده و کمتر در انسانهای سالم ایجاد بیماری می کنند با این حال این عوامل ممکن است باعث بیماری در افراد سالم و یا افراد با ضعف ایمنی و غیره شوند. لذا هنگام کار با سویه های مختلف منجمله واکسنها نباید انها را صد در صد غیر بیماریزا دانست. آزمایشهای میکربشناسی اگر به طور استاندارد انجام شوند از نظر رعایت اصول ایمنی در سطح یک قرار می گیرند که در این صورت نیاز به ایجاد شرایط خاص ندارند مگر یک سینک برای شستن دستها. اما کار معمولی در آزمایشگاههای بالینی و تشخیصی و اموزشی نظیر ایمونولوژی از نظر رعایت اصول ایمنی زیستی معمولا در سطح دو طبقه بندی می شود. یعنی این سطح برای تجهیزات و عواملی رعایت می شود که نسبتا خطر ساز هستند لذا هنگام کار با فراورده های خونی و مایعات بدن و بافتها و رده های سلولی اولیه انسانی رعایت اصول سطح دو ایمنی ضروری است. بدین سبب رعایت قوانین ذیل احتمال خطر را کاهش می دهد:

علامتهای زیر برای اخطار BioHazard بکار می روند.

			
کمک های اولیه احیای قلبی	سلاح هسته ای	سلاح شیمیایی	سلاح بیولوژیکی
محل نگهداری پتوی ضد حر	محل شستشوی چشم	ماده منفجره	خطر زیست محیطی
اشعه یونیزه کننده	مواد مضر (آزارنده)	قابل اشتعال	کمک های اولیه
محل نصب دوش ایمنی	سم	اکسید کننده	تشعشع لیزر
خورنده	مواد سمی	رادیواکتیویته	تشعشع

قوانین کار در ایمونولوژی:

1- هرگز با دهان پی پت نکشید. حتی اگر مایع مورد نظر آب باشد.
2- بروشورهای مواد شیمیائی مورد استفاده را بخوانید و مطالب آنها را بکار گیرید.
3- همواره از پوشش مناسب و دستکش استفاده کنید.
4- تجهیزات ایمنی تعبیه شده در ازمایشگاه را بشناسید و طرز کار آن را یاد بگیرید.
5- مواد شیمیایی را به روش صحیح و توصیه شده اختصاصی آنها دور بریزید.
6- در ازمایشگاه از خوردن و آشامیدن اجتناب کنید.
7- از مخلوط کردن تصادفی مواد شیمیائی جدا"خودداری کنید و بهنگام ساختن محلولها، مواد شیمیایی را به ترتیبی که در دستور کار شما آمده است اضافه کنید.
8- در طول حضور در آزمایشگاه اطلاعات بدست آمده و کارهای انجام شده را یادداشت کنید.
9- از گذاشتن وسایل شخصی روی میز آزمایش خودداری نمایند.

تفسیر نتایج:

یکی از مهمترین چالش های استفاده از آزمایش های ایمونولوژی در تشخیص بیماریها یا پی گیری درمان، بحث تفسیر نتایج است. برای اینکه تفسیر بدرستی انجام بگیرد:

1- **باید نتایج را بصورت صحیح و کامل گزارش نماید. یک گزارش نتایج کامل شامل موارد زیر است:**

الف) مشخصات کامل دموگرافیک بیمار و زمان دقیق سیکل هورمونی در مورد خانم ها

ب) تاریخ نمونه گیری و تاریخ گزارش نتایج

ج) عنوان کامل آزمایش انجام شده

د) روش انجام آزمایش از جمله مثلا RIA یا ELISA و یا.....

ه) تعیین نوع نتیجه کمی– نیمه کمی– کیفی

و) گزارش دقیق واحد اندازه گیری

د) گزارش محدوده مرجع (Reference Interval) یا طیف طبیعی (Normal Range)که مطابقت کامل با اطلاعات دموگرافیک بیمار و روش اندازه گیری داشته و ترجیحا در همان آزمایشگاه به دست آمده باشد.

لازم به ذکر است در گزارش کار کلاسی نیاز به ذکر مشخصات دموگرافیک بیمار نیست، و دانشجو به جای ان باید نام نمونه، نتیجه، علت و اساس آزمایش را نیز بیان نماید(یعنی علاوه بر موارد ذکر شده در بالا).

2- پزشک معالج باید دانش و اطلاعات کاملی از موارد زیر داشته باشد:

الف)اصول روش اندازه گیری به کار رفته

ب) حساسیت و ویژگی های روش های مختلف اندازه گیری

ج) منابع خطا در آزمایشگاه

د) تداخلات داروئی و اثرات Cross Reaction در نتیجه آزمایش .

جداسازی سلول های تک هسته ای خون محیطی و HLA Typing

جداسازی سلول های تک هسته ای خون محیطی

خون متشکل از پلاسما و سلول ها ی مختلف نظیر سلول های چند هسته ای یا پلی مورفونوکلئار سل(PMNCs) شامل گرانولوسیت ها، سلول های تک هسته ای شامل مونوسیت ها و لنفوسیت ها (که به PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells معروف هستند) و پلاکت می باشد. از آنجا که مبنای تعدادی از بررسی های سیستم ایمنی بر جداسازی سلول های تک هسته ای خون محیطی(PBMCs) استوار است. برای جدا سازی آنها خون هپارینه را با محلول هنکس و یا بافر PBS به نسبت 1 به 1 رقیق کرده و به آرامی بر روی محلول فایکول اضافه می کنند. به طوری که دو محلول با هم آمیخته نشوند. البته چون چگالی فایکول بیشتر از خون کامل است، خون به صورت لایه ای بر روی فایکول قرار می گیرد .اما پس از سانتریفوژ لوله ی حاوی خون و فایکول به صورت 5 لایه ی مختلف دیده می شود که به ترتیب از بالا شامل پلاسما، سلول های PBMC، فایکول، گرانولوسیت ها و اریتروسیت ها می باشند. پس حلقه ی ابری مانند مربوط به سلول های PBMC را جدا کرده و با بافر شستشو می دهند. پس ازآن میتوان سلول ها را شمارش کرده و با نسبت های مختلف برای انجام آزمون های بعدی مورد استفاده قرار داد.

HLA Typing

سیستم آنتی ژنی MHC توسط یک مجموعه ژنی بنام مجموعه اصلی سازگاری بافتی (MHC) کد می شود. این مولکول ها اولین بار به عنوان ژن های مسئول رد پیوند بافتی بین موش های کانژنیک(موش هایی که در همه ی لوکوس های ژنی به جز الل های MHC با هم یکسان هستند) توسط جرج اسنل و همکارانش شناخته شد. مولکول های MHC انسان نیز به دنبال جستجوی مولکول های سطحی سلول های یک فرد که او را از دیگری متمایز کند شناخته شدند. ژان دوسه (Jan Dausset) و ژان وان رد (Jan Van Rood) نشان دادند که در سرم بیماران رد پیوند شده یا افرادی که انتقال خون ناسازگار داشته اند آنتی بادی هایی وجود دارد که می توانند با آنتی ژن های بافت پیوندی و بویژه لکوسیت های دهنده واکنش دهند. سرم چنین بیمارانی را "آلو آنتی سرم" و آنتی بادی های مورد نظر را "آلو آنتی بادی" و مولکول های هدف را "آلو آنتی ژن" می نامند. آلوآنتی ژن های مذکور همان مولکول های MHC بوده که Human Leukocyte Antigen (HLA) نام گرفتند.

منطقه ژنی MHC در انسان بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره 6 قرار داشته و با وسعتی حدود چهار سانتی مورگان 1/1000 کل ژنوم انسانی را تشکیل می دهد(طول این ناحیه ی ژنی حدود 3500 باز می باشد). یکی از مهمترین ویژگی های مولکول های HLA مربوط به سیستم ژنی کد کننده این مولکول ها میباشد که دارای بیشترین پلی مورفیسم ژنی در بین جانداران می باشند. همانطور که ذکر شد این مجموعه ژنی نقش اساسی در رد پیوند اعضا بازی نموده و در عین حال پاسخ ایمنی علیه آنتی ژن های گوناگون را تنظیم می کند.

لوکوس MHC شامل دو دسته از ژن های پلی مرفیک می باشد. این دو دسته ژن مولکول های MHC کلاس یک و دو را کد می کنند، این تقسیم بندی بر اساس ساختمان، عملکرد و محل بروز آنتی ژن های فوق می باشد. مولکول های MHC کلاس یک و دو به ترتیب در عرضه ی پپتید های آنتی ژنی به لنفوسیت های TCD8+(سایتوتوکسیک) و TCD4+(کمکی) ایفای نقش می کنند. مولکول های MHC کلاس یک و دو از پلی مرفیک ترین ژن های حاضر در ژنوم انسان می باشند. تعداد کل الل های HLA در جمعیت حدود 3500 الل می باشد که بیش از 250 الل مربوط به HLA-B می باشد. بنیان های پلی مرفیک مولکول های MHC تعیین کننده ی اختصاصی بودن اتصال به پپتید آنتی ژنی و شناسایی توسط لنفوسیت T میباشند.

با توجه به اینکه نحوه وراثت ژن های MHC بصورت هم غالب (co-dominant) می باشد و هر فرد دارای دو الل برای هر لکوس ژنی می باشد (مگر اینکه آن فرد در آن لکوس هموزیگوت باشد) و از طرفی با توجه به پلی مورفیسم بالای ژنی این سیستم، حتی افراد یک خانواده می توانند هاپلوتایپ های متفاوتی نسبت به هم ولی مرتبط با پدر و مادر خود داشته باشند.

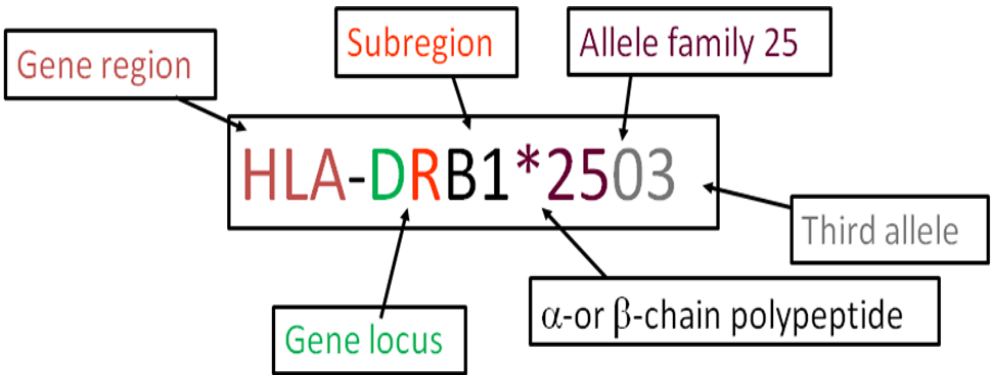
کاربرد HLA Typing

رد عضو پیوندی بعلت بر انگیخته شدن سیستم دفاعی این مهره داران در مقابل یک عامل بیگانه می باشد. مولکول های MHC با عرضه آنتی ژن به سلول های T سرنوشت و نوع پاسخ ایمنی را تعیین می کنند. بعلاوه، این مولکولها نقشی تعیین کننده در ارتباط با بیماری ها بویژه سرطان ها، عفونت ها و رد پیوند دارند. بنابراین با شناسایی مکانیسم کنترل پاسخ های ایمنی، پیشگیری و درمان این بیماری ها قابل اجرا خواهد بود. علاوه بر موارد فوق ردیابی و بررسی این مولکول ها در رابطه با رد ابوت، اثبات مجرمیت، مطالعات وسیع جمعیت شناسی، زیر گروه های نژادی و تیره شناسی، ارزش بسیار زیادی دارد.

روش های تعیین HLA (HLA typing):

همانطور که گفته شد مهمترین دلیل تعیین HLA بررسی سازگاری آنتی ژنی بین دهنده و گیرنده در روش های مختلف پیوند می باشد که البته مطالعات متعدد نشان می دهد ارزش آن در انواع پیوند متفاوت است. تعیین آنتی ژن های MHC کلاس یک HLA- (A، B و C) در افراد بروش سرولوژیک (میکرو لنفو سایتوتوکسیسیتی) از اولین روش هایی است که مورد استفاده قرار گرفته و هنوز نیز مرسوم است. ولی در مواردی که بررسی آنتی ژن های کلاس II (HLA-DR، HLA-DP , و HLA-DQ)لازم باشد (مثل پیوند مغز استخوان) از کشت مختلط لنفوسیتی و یا روش های مولکولی و DNA Sequencing استفاده می شود.

به علت پلی مرفیسم وسیع مولکول های MHC که با روش های سرولوژیک و مولکولی شناسایی می شوند، سیستم جدیدی برای نامگذاری این مولکول ها ارائه شده است. برای مثال طبق روش جدید یک الل MHC ممکن است HLA-A*0201 نامیده شود که اشاره به زیر رده ی 01 از HLA-A2 دارد. همینطور مولکول HLA-DRB1*0401 به زیر رده ی 01 از الل DR4 در ژن B1 اشاره دارد. شکل زیر نیز نمایی از نام گذاری استاندارد ارائه شده توسط WHO را نشان می دهد.



تعیین سرولوژیک مولکول های کلاس I:

ساده ترین و سریع ترین روش برای تعیین HLA، روش سرولوژیک است که از واکنش آنتی بادی در سرم خون علیه آنتی ژن های HLA لکوسیتی استفاده می شود. در نتیجه این اتصال و فعال شدن کمپلمان، لیز سلولی اتفاق می افتد. این سلول های لیز شده با استفاده از رنگ حیاتی در زیر میکروسکوپ دارای فاز کنتراست قابل مشاهده و شمارش می باشد.

آزمایش لنفوسایتوتوکسیسیتی که اول بار توسط Terasaki در سال 1964 انجام شد، امروزه بصورت متداول مورد استفاده قرار می گیرد. در گذشته آنتی سرم های HLA را عمدتا از زنان چند زا یا افراد دارای سابقه انتقال خون یا پیوند بدست می آوردند، امروزه