به نام خداوند جان و خرد

آزمایشگاه ایمونولوژی و سرولوژی

دکتر نیک فرجام

عوامل موثر بر واکنش های آنتی ژن و آنتی بادی

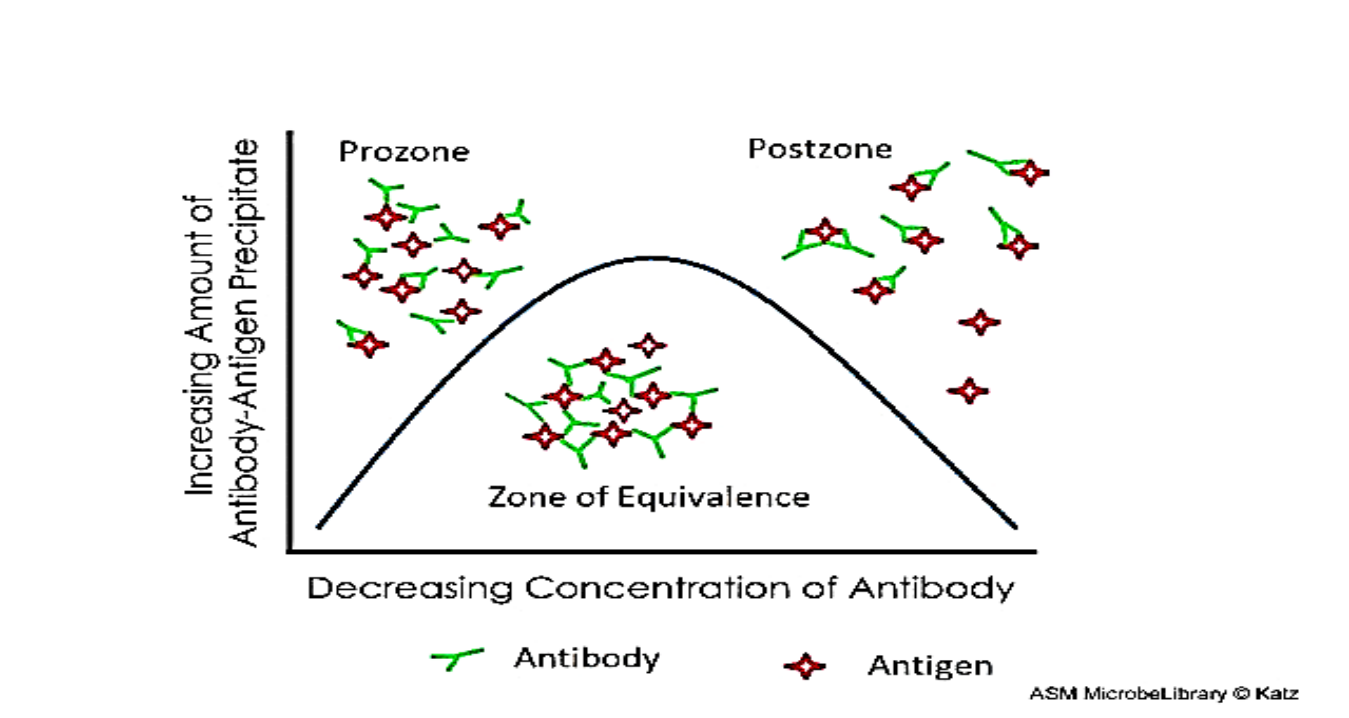
۱- قدرت اتصال آنتی بادی به آنتی ژن (Avidity): هر چه قدرت اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن بیشتر باشد، کمپلکس آنتی‌بادی و آنتی‌ژن سخت تر از یکدیگر جدا می‌شوند.

۲- pH محیط: بهترین pH برای انجام واکنش های سرولوژی ۷/۲ می‌باشد. در pH کمتر از ۷/۲ اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن ضعیف و در pH اسیدی این کمپلکس کاملا از هم جدا می‌شود.

۳- قدرت یونی محیط: انجام واکنش های سرولوژی در محیط های فاقد الکترولیت مانند آب مقطر غیرممکن است. قدرت یونی، مولاریته نمک های محلولی است که آنتی‌بادی و آنتی‌ژن در آن وجود دارند. سرم فیزیولوژی یا بافر فسفات نمکی (PBS: Phosphate Buffer Saline) برای رقیق نمودن سرم بیمار و واکنش های سرولوژی مناسب می‌باشد.

عوامل موثر بر واکنش های آنتی ژن و آنتی بادی

۴- نسبت غلظت آنتی ژن و آنتی بادی: اولین بار هایدلبرگ نشان داد که غلظت آنتی‌بادی اختصاصی و آنتی‌ژن باید با یکدیگر متناسب باشد، تا تمام آنتی‌بادی موجود در لوله آزمایش به آنتی‌ژن مجاورش متصل و حداکثر واکنش سرولوژی انجام پذیرد.



عوامل موثر بر واکنش های آنتی ژن و آنتی بادی

۵- درجه حرارت: در ۳۷°C واکنش ها سریع تر انجام شده و قابل مشاهده می گردند.

۶- زمان انکوباسیون: اتصال مولکول‌های آنتی‌بادی به آنتی‌ژن، به طور معمول به سرعت و ظرف چند ثانیه صورت می‌گیرد،

اما برای تشکیل کمپلکس و مشاهده واکنش زمان نیاز است که برای هر آزمایش با توجه به نوع آنتی‌ژن و کلاس آنتی‌بادی متفاوت می‌باشد.

اگر آنتی‌بادی از کلاس IgM و مولکول آنتی‌ژن درشت باشد، زمان لازم برای قابل مشاهده شدن کمپلکس آنتی‌ژن و آنتی‌بادی کوتاه تر از کلاس IgG می‌باشد، مانند تعیین گروه خونی سیستم ABO در مقایسه با Rh.

عوامل موثر بر واکنش های آنتی ژن و آنتی بادی

۷- تاثیر حرکت دادن و سانتریفوژ کردن: برای سرعت بخشیدن به مشاهده واکنش آنتی‌بادی و آنتی‌ژن، پس از مخلوط نمودن آنها می‌توان از روش های مختلف استفاده نمود.

- اگر واکنش بر روی لام انجام گیرد، می‌توان بصورت دورانی آرام، لام را حرکت داد.
- این واکنش در لوله آزمایش را می‌توان با تکان دادن لوله تسریع نمود.
- می‌توان با استفاده از سانتریفوژ مولکول‌های آنتی‌ژن و آنتی‌بادی را با فشار در مجاورت هم قرار داد.

۸- عوامل مداخله گر موجود در سرم: در برخی موارد موادی که به صورت طبیعی در سرم وجود دارند، مانع برخی از واکنش های سرولوژی به ویژه پرسیپیتاسیون می‌شوند. مانند: اینترفرون ها، لیزوزیم، کمپلمان، بتالیزین ها، موادی که توسط میکروب های فلور طبیعی بدن ترشح و وارد خون می‌شوند.

آزمایش تشخیص روماتوئید فاکتور

روماتوئید آرتریت

❖ روماتوئید آرتریت (RA) یک بیماری خودایمن است، بیشتر موجب درگیری مفاصل انتهایی بدن، نظیر انگشتان دست ها و پاها می‌شود. در صورت درمان نشدن، مفاصل بزرگتر نیز مبتلا خواهند شد.

❖ در مراحل پیشرفته، حتی احتمال بی حرکت شدن بدن بیمار نیز وجود دارد. میزان شیوع RA یک درصد بوده و در زن ها به دلیل وجود هورمون های استروئیدی ۳ برابر بیشتر از مردان است.

❖ ابتلا بیشتر در دهه سوم و چهارم زندگی اتفاق می افتد. در این بیماری، کمپلکس های ایمنی IgG و اتوآنتی بادی ضد آن (IgM) در سینوویوم مفاصل، رسوب کرده و با فعال کردن کمپلمان و فراخوانی سلول های التهابی، بخصوص نوتروفیل ها و لنفوسیت های T و B به محل، ضایعاتی در مفاصل بوجود می آید.

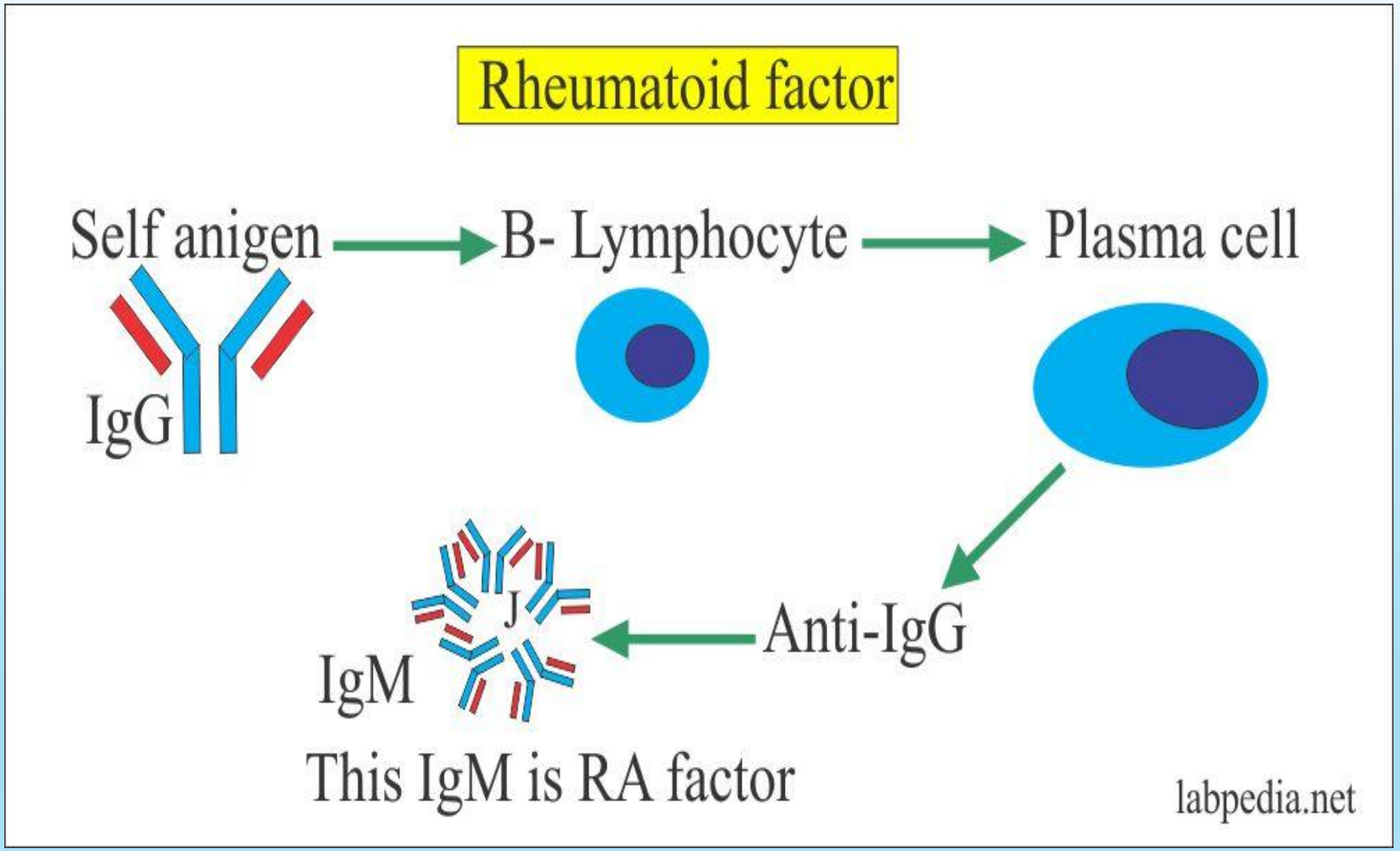
❖ علائم بالینی این بیماری، شامل التهاب، تورم، سفت شدن و تجمع مایع در مفاصل و تخریب غضروف مفاصل می باشد.

فاکتور روماتوئید

- در سرم ۶۰ تا ۸۸ درصد بیماران مبتلا به RA، نوعی اتوآنتی‌بادی ضد ناحیه Fc مولکول‌های IgG انسان به نام فاکتور روماتوئید (RF: Rheumatoid Factor) مشاهده می‌شود. بیمارانی که در سرم آنها، RF وجود دارد، سرم مثبت (Seropositive) نامیده می شوند.

- این فاکتور، بوسیله روش های متداول آزمایشگاهی تشخیص داده می‌شود. تقریبا تمام بیمارانی که دارای RF از کلاس IgM می‌باشند، دارای این فاکتور از کلاس IgG و سایر کلاس ها نیز هستند.

- **RF که در مقابل شاخص های آلوتیپ IgG بوجود می‌آید با نام روماتوئید آگلوتینین (Ragg) شناخته می‌شود.**


Rheumatoid factor
Self anigen
B- Lymphocyte
Plasma cell
IgG
Anti-IgG
J
IgM
This IgM is RA factor
labpedia.net

فاکتور روماتوئید

- RF، در سرم حدود ۲۰ درصد از بیماران مبتلا RA، با روش های متداول آزمایشگاهی، تشخیص داده نمی‌شود، و از ایزوتیپ های IgG، IgM مونومر، IgA یا IgE می‌باشد این بیماران سرم منفی (Seronegative) هستند.

- چنانکه سرم این بیماران از روی ستون ژل کروماتوگرافی (سفادکس) همراه با بافر اسیدی عبور داده شود، RF کلاس IgM قابل جداسازی می‌باشد.

- در واقع ناحیه ای که آنتی‌بادی به آنتی‌ژن متصل می‌شود، بوسیله IgG خودی پوشیده شده و در نتیجه RF موجود در سرم این بیماران در آزمایشگاه قابل تشخیص نمی‌باشد.

فاکتور روماتوئید

- ولی پس از عبور از روی ستون کروماتوگرافی این مولکول ها از یکدیگر جدا می‌شوند. RF که بدین صورت از سرم جدا می‌شود، فاکتور روماتوئید نهفته نام دارد.
- در این بیماران، ظهور RF از کلاس IgG در سرم و افزایش آن دلالت بر پیشرفت بیماری دارد.
- همچنین، وجود RF از کلاس IgA نشان دهنده بروز ضایعات مفصلی بوده و از کلاس IgE، در ۵۰ درصد بیمارانی که ضایعات واسکولیت دارند مشاهده می‌شود.

فاکتور روماتوئید

مشکل تشخیص فاکتورهای روماتوئیدی از کلاس های IgG، IgA و IgE:

۱- این فاکتورها دو ظرفیتی هستند و تشکیل شبکه آگلوتیناسیون با آنتی‌ژن های درشت مانند لاتکس متصل به IgG در مقایسه با فاکتور روماتوئیدی IgM بسیار مشکل تر است.
۲- RF از کلاس IgG، یک اتوآنتی‌بادی ضد Fc مولکول‌های IgG می‌باشد و دارای تمایل زیادی به پلیمر و متصل شدن به یکدیگر هستند.

- در نتیجه تشخیص مولکول‌های بهم چسبیده RF با روش های متداول میسر نمی‌باشد. اگر بوسیله آنزیم پپسین این مولکول ها را از یکدیگر جدا کنند، تشخیص امکان پذیر خواهد بود.

- امروزه روش های حساسی مانند الایزا، رادیوایمونواسی، توربیدومتری و نفلومتری برای تشخیص و اندازه گیری آن انجام می‌گیرد.
-

روماتوئید آرتریت

۱) عفونت های باکتریایی: اگرچه باکتری ها، از لحاظ مورفولوژی و ساختار با سلول های غضروف بدن اختلاف زیادی دارند، ولی برخی از آنها دارای شاخص های آنتی ژنی مشابهی با شاخص های آنتی ژنی موجود بر سطح این سلول هستند. آنتی بادی های اختصاصی، به علت تشابه آنتی ژنی که بین باکتری و غضروف، قادرند به غضروف موجود در مفاصل نیز اتصال یابند (واکنش دهی متقاطع).

پس از اتصال آنتی بادی به آنتی ژن های غضروف، سیستم کمپلمان از مسیرکلاسیک فعال و فاکتورهای کموتاکتیک نظیر C5a، C3a و C4a و کمپلکس حمله به غشا تشکیل می‌شود. این فاکتورها، موجب فراخوانی سلول های التهابی به ویژه نوتروفیل ها به مفاصل می شوند.

نوتروفیل ها با ترشح آنزیم هایی نظیر کلاژناز، سبب تخریب غضروف مفاصل می شوند. همچنین، نقش سایتوکاین های پیش التهابی (TNF-α, IL-1)، در این بیماری به اثبات رسیده است.

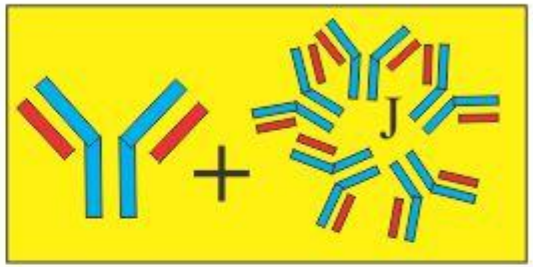
روماتوئید آرتریت

۲) واکنش های خود ایمن: کمپلکس های RF و IgG در عروق بسیار ریز سینوویوم مفاصل، به دام افتاده و باعث فعال شدن کمپلمان و تولید فاکتورهای کموتاکتیک C5a، C3a و C4a، ارتشاح سلول های التهابی و در نهایت التهاب و تخریب غضروف یا حتی استخوان مفاصل گردد.

بررسی وجود یا عدم وجود RF در سرم افراد، مبنای تشخیص بیماری RA می باشد. بیمارانی که دارای این فاکتور هستند، علائم بیماری در آنها شدیدتر می‌باشد. در هنگام بهبود، مقادیر RF کاهش می یابد، بنابراین به عنوان شاخص فعالیت بیماری در نظر گرفته می شود.

Rheumatoid Arthritis

IgG + Anti-IgG(IgM) → (IgG + IgM) Complex

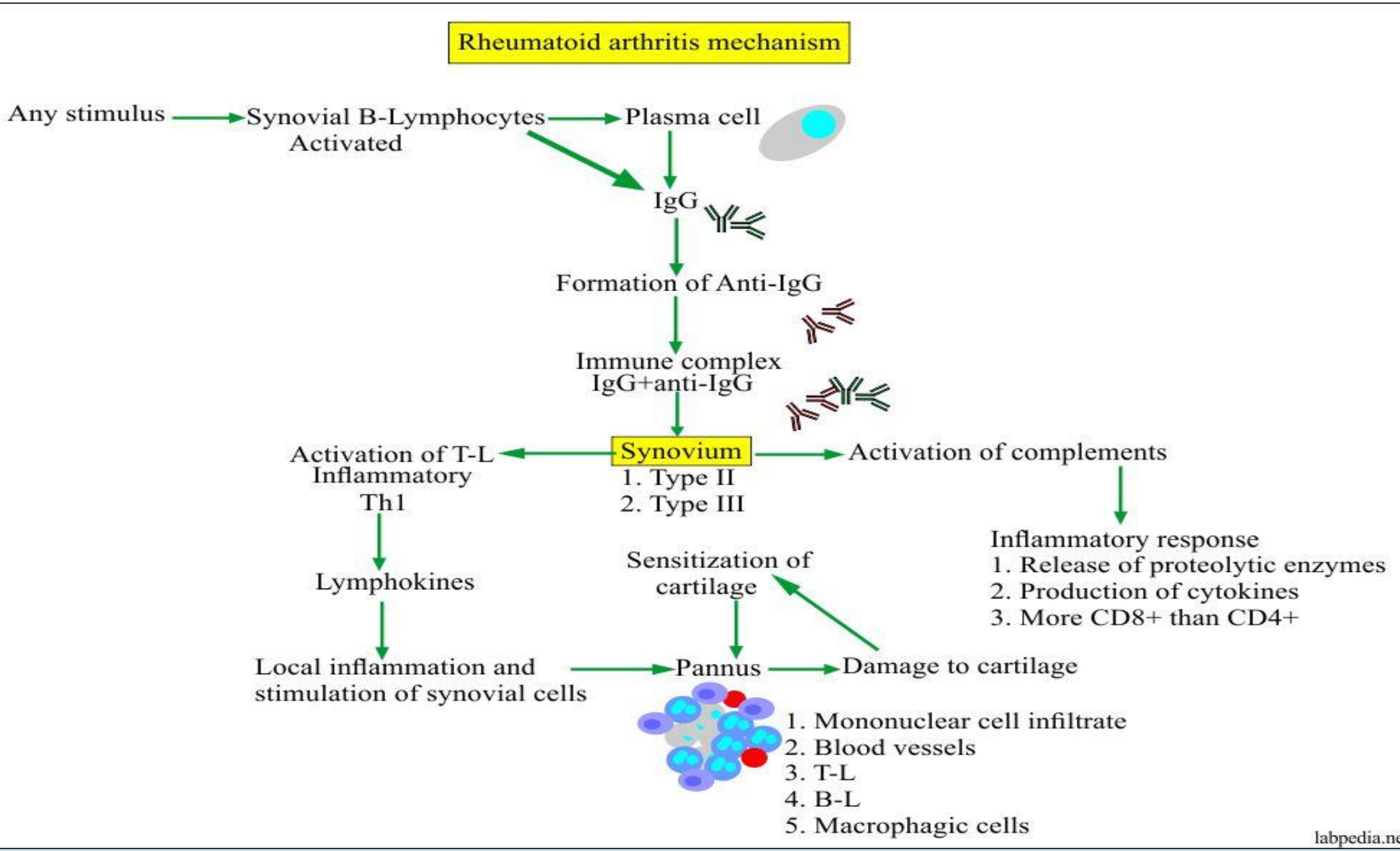


Activate Complement → Inflammatory Cytokines

1. Produce Inflamation
2. Damage cartilage
3. Destroy the bone

labpedia.net

Rheumatoid arthritis mechanism



labpedia.net

عوامل مستعد کننده بیماری روماتوئید آرتریت

۱) **عامل ژنتیک**: افرادی که دارای ژن HLA-DR4 هستند استعداد بیشتری جهت ابتلا به RA دارند و در مقایسه با مبتلایانی که فاقد این آنتی ژن هستند به شکل شدیدتری از بیماری مبتلا می شوند. بیشتر افراد مذکری که بعد از سن هشت سالگی مبتلا به RA می شوند، دارای HLA-B27 هستند.

۲) **عامل هورمونی**: این بیماری در زنان به علت هورمون های استروژنی، ۳ برابر بیشتر از مردان رخ می‌دهد.

۳) **عامل ویروسی**: ویروس اپشتاین بار (EBV) به گیرنده CR2 سطح سلول های B متصل و موجب تحریک پلی کلونال می شود.

در افراد طبیعی، سلول های Th، با ترشح IFN-γ، از فعالیت ویروس جلوگیری می کنند. اما در بیماران RA، این دسته از سلول ها نقص داشته و IFN-γ ترشح نمی‌کنند، در نتیجه EBV موجب تحریک ترشح RF می گردد. همچنین، EBV باعث تکثیر سلول های B و جهش ژنتیکی در این سلول ها و ایجاد لنفوما می‌شود.

عوامل مستعد کننده بیماری روماتوئید آرتریت

۴) عوامل تغذیه ای: تظاهرات بیماری RA با مصرف روغن ماهی تخفیف می یابد. روغن ماهی موجب کاهش تولید پروستاگلاندین ها می گردد (به ویژه PGE_2). پروستاگلاندین ها و لکوترین های مترشحه از سلول های التهابی، نقش عمده ای در ایجاد التهاب دارند.

همچنین، تغذیه با کلاژن نوع دو مرغ، ضایعات این بیماری را کاهش می دهد. کلاژن نوع دو ماده اصلی غضروف را تشکیل می دهد. بعلاوه در سینوویوم مفاصل نیز وجود دارد. حدود ۵۰ درصد از مبتلایان در مایع مفصلی دارای پلاسماسل های تولید کننده آنتی بادی ضد کلاژن نوع دو می باشند.

به نظر می رسد در صورتی که تغذیه با کلاژن تیپ دو درست انجام شود، سلول های تنظیمی افزایش یافته و نسبت به کلاژن نوع دو تحمل ایجاد می‌شود.

آزمایش های متداول جهت تشخیص بیماری روماتوئید آرتریت

۱- تشخیص اتو آنتی بادی فاکتور روماتوئید در سرم بیماران

۲- اندازه گیری سرعت رسوب اریتروسیت ها(ESR)

۳- تشخیص پروتئین واکنشگر C (CRP)

۴- تغییرات مقدار اجزای کمپلمان (C_4-C_3)

تشخیص فاکتور روماتوئید

تشخیص RF در سرم یا مایع مفصلی، متداول ترین راه متمایز کردن بیماری RA از سایر بیماری های مزمن التهابی مفاصل می‌باشد.

معمولا این فاکتور از کلاس IgM پنتامر می‌باشد و در سرم قابل تشخیص است. جهت تشخیص این فاکتور از روش آگلوتیناسیون غیرفعال استفاده می‌گردد:

آزمایش RA-latex: اساس این آزمایش آگلوتیناسیون پاسیو معکوس می باشد. نمونه مورد استفاده، سرم تازه و شفاف بوده و پلاسما غیر قابل استفاده است.

سرم لیپمیک یا آلودگی های میکروبی، باعث جواب های نادرست می شوند. نمونه ها تا ۲۴ ساعت در یخچال و برای مدت طولانی تر در فریزر $-20^{\circ}C$ قابل نگهداری است. این آزمایش به دو صورت کیفی و کمی انجام می‌شود.

آزمایش RA-latex

روش انجام آزمایش کیفی

۱- ۵۰ میکرولیتر از نمونه سرمی رقیق شده (به نسبت ۱:۲۰) و یک قطره از کنترل های مثبت و منفی را در دایره های اسلاید زمینه سیاه قرار داده و یک قطره سوسپاسیون لاتکس را در کنار آنها گذاشته می‌شود.

۲- با استفاده از همزن پلاستیکی، قطرات مخلوط و در سطح دایره ها پخش می‌شود.

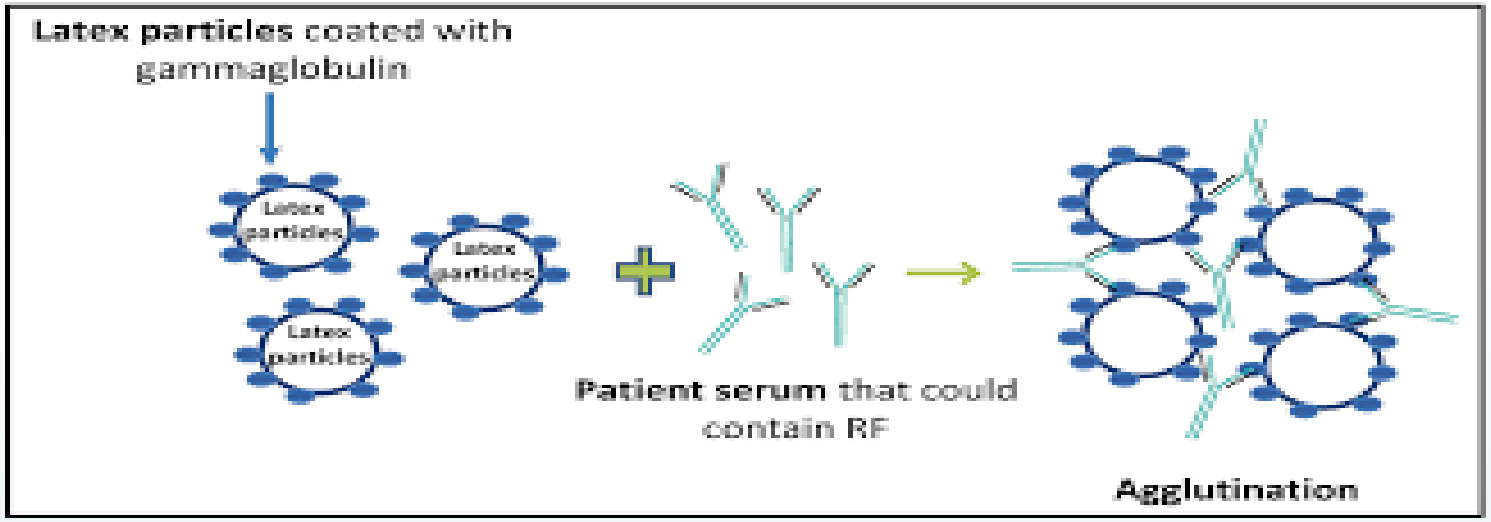
۳- اسلاید بطور دورانی به مدت ۲ دقیقه حرکت داده می‌شود.

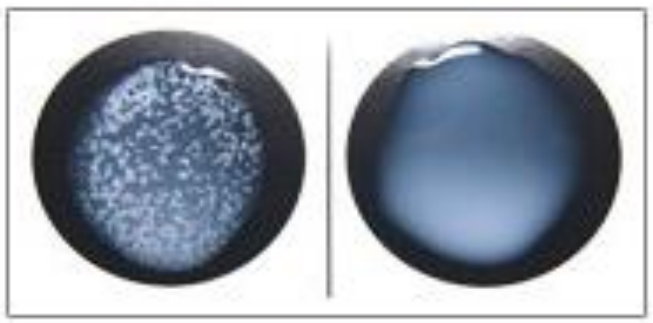
۴- میزان آگلوتیناسیون به صورت زیر گزارش می‌شود.

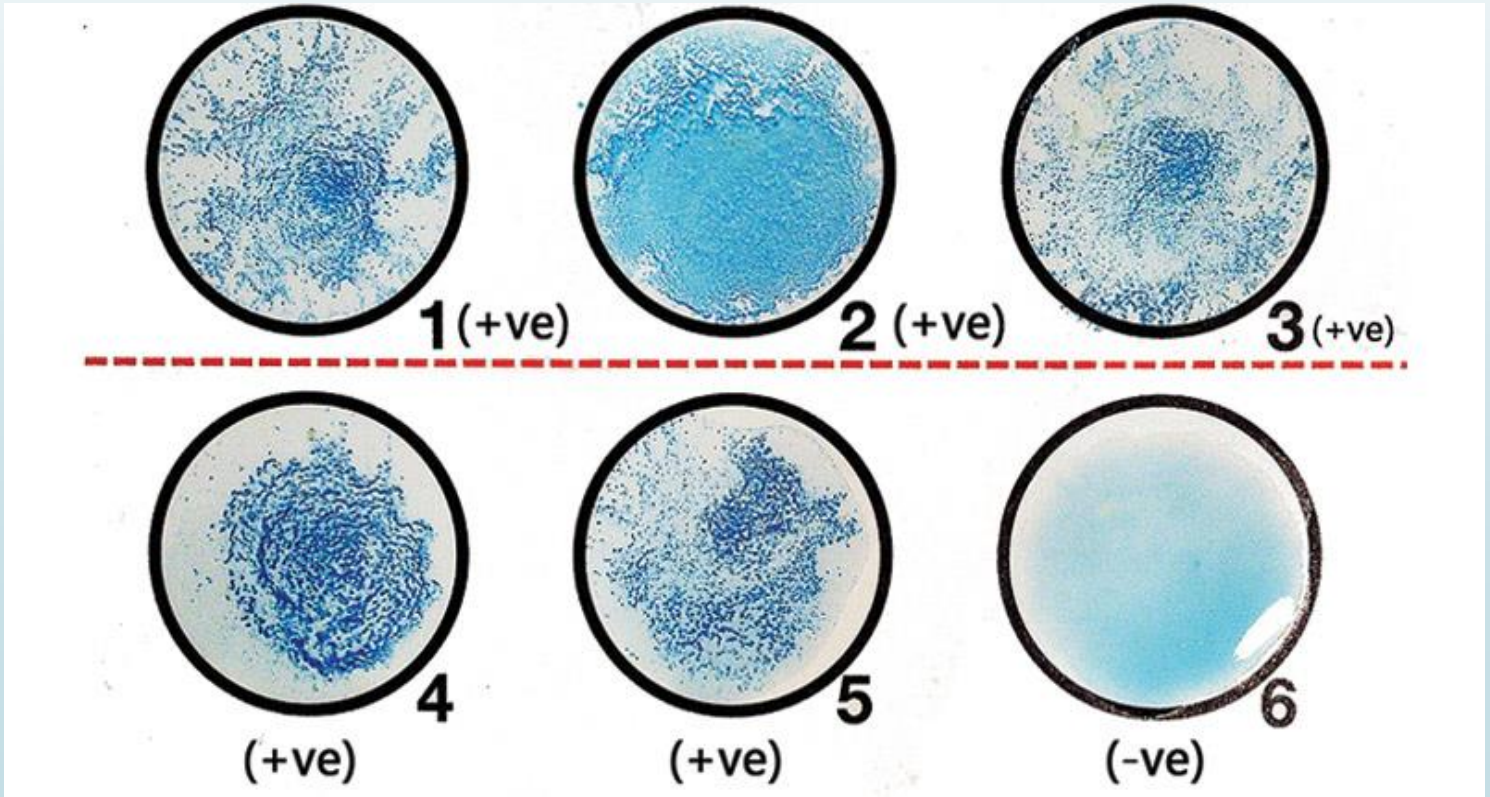


آگلوتیناسیون		
درشت	+ + +	مثبت
متوسط	++	مثبت متوسط
ریز	+	مثبت ضعیف


InstaTest ™ CE
RHEUMATOID FACTOR Latex
REF 320-100
100
LOT 19492
8ºC
2011-06
2 Cº
CORTEZ
DIAGNOSTICS INC
ONE-STEP TESTS


Latex particles coated with gammaglobulin
Latex particles
Latex particles
Latex particles
Patient serum that could contain RF
Agglutination




1 (+ve)
2 (+ve)
3 (+ve)
4
(+ve)
5
(+ve)
6
(-ve)

آزمایش RF-latex

- حدود ۲۰ درصد از بیماران مبتلا به RA، سرم منفی هستند و منفی شدن این آزمایش دلالت بر سالم بودن قطعی شخص نمی‌باشد. RF در سرم حدود نیمی از مبتلایان، که بیماری آنها در حال فروکش کردن است، ناپدید می‌شود، در صورتی که ۲۵ درصد بقیه دارای تیتر بالایی هستند.

- RF در سرم ۱ تا ۴ درصد از افراد طبیعی، با روش لاتکس مثبت می‌شود. در بعضی وضعیت های حاد مانند منونوکلئوز عفونی یا بیماران سالخورده ممکن است مقدار RF افزایش قابل ملاحظه ای پیدا کند، بنابراین تفسیر بالینی یک آزمایش مثبت باید با احتیاط صورت گیرد.

- در خون محیطی برخی از بیماران، نوعی آنتی گاماگلبولین به نام فاکتور روماتوئیدی واکنشگر سرد (Cold Reactive RF) وجود دارد که در ۴°C رسوب می‌کند.

- این نوع فاکتور در بیماران SLE، سندرم شوگرن، منونوکلئوز عفونی و سرطان سلول های ایمنی وقتی که همراه با واسکولیت باشد، دیده می‌شود. فاکتور روماتوئیدی سرد در بیماری RA نیز بوجود می‌آید.

معایب روش RF-latex

۱- در ماه های اولیه بیماری RA ممکن است RF در سرم دیده نشود ولی در مایع مفصلی ملتهب وجود داشته باشد.

۲- تقریبا فقط RF از کلاس IgM با این روش شناسایی می شود.

۳- گاهی ممکن است در آزمایش هایی که از لاتکس استفاده می‌شود، بدلایل زیر نتایج مثبت کاذب شوند:

- حرارت دادن ناقص سرم بیمار برای غیرفعال کردن کمپلمان که مقدار بالای C1q باعث آگلوتینه شدن ذرات لاتکس شده و در نتیجه آزمایش مثبت کاذب می‌گردد.

- بالا بودن غیرطبیعی چربی خون، کرایوگلبولین های سرم و وجود فیبرینوژن در سرم یا پلاسما.

آزمایش های اختصاصی برای تشخیص بیماری روماتوئید آرتریت

۱- آنتی‌بادی ضد پپتیدهای حلقوی سیترولینه (Anti-CCP: Anti-Cyclic Citrullnated Peptide)

- یکی از آزمایش ها در تشخیص زودرس RA، Anti-CCP می‌باشد. این آنتی‌بادی ها ضد پروتئین های حاوی آرژینین که به سیترولین تغییر یافته اند واکنش گسترده ای نشان می دهند.
- این اتوآنتی‌بادی ها، شامل آنتی پری نوکلئار فاکتور (APF)، آنتی کراتین آنتی‌بادی (AKA)، آنتی فیلاگرین آنتی‌بادی (AFA) و Anti-CCP، از نوع IgG می‌باشند.

۲- آنتی‌بادی ضد ویمنتین سیترولینه جهش یافته (Anti-MCV: Anti Mutated Citrullinated Vimentin)

۳- آنتی‌بادی ضد هسته (ANA: Anti Nuclear Antibody)

تشخیص آنتی‌بادی های ضد پپتید های حلقوی سیترولینه (Anti-CCP)

- سیترولینه شدن پروتئین ها در فضای ملتهب موضعی مبتلا به RA است، ممکن است در اثر آپوپتوزیس باشد.
- آزمایش Anti-CCP به روش ELISA انجام می‌شود. این آزمایش، برای بیماران مبتلا به RA قطعی ۹۸ درصد اختصاصیت و برای بیمارانی که کمتر از یک سال از شروع علائم بیماری آنها گذشته است ۹۶ درصد اختصاصیت نشان می‌دهد.
- آزمایش RF که تست سرولوژیک استاندارد برای تشخیص RA به شمار می‌رود، ۹۰ تا ۹۵ درصد اختصاصیت دارد. اما RF از نوع IgM جهت تشخیص RA اختصاصی و حساس نمی‌باشد.
- از آزمایش تشخیص Anti-CCP در شناسایی بیماران مبتلا به RA حتی سال ها قبل از شروع علائم و سینوویت مخرب نیز می‌توان استفاده نمود.

کاربرد آزمایش Anti-CCP

۱- ارزیابی بیماران مشکوک به RA و کمک به تشخیص زود هنگام بیماری

۲- پایش میزان پیشرفت بیماری RA

۳- افتراق بین RA و سایر بیماری های التهابی بافت همبند که علائم بالینی مشابهی دارند.

تفسیر آزمایش Anti-CCP

- مقادیر کمتر از ۵U/ml، منفی و مقادیر بیشتر از ۵U/ml مثبت در نظر گرفته می‌شوند.

- نتایج مثبت به احتمال قوی نشان دهنده ابتلا به بیماری RA می‌باشد.
- این تست دارای حساسیت ۷۸ درصدی و اختصاصیت ۹۸ درصدی می‌باشد.

- در ۴۰ درصد از بیماران با RF منفی، Anti-CCP یافت شده است. نتایج مثبت بالا در این تست به احتمال زیاد نشان دهنده یک دوره مخرب یا فرسایش بیماری است.

- سطوح Anti-CCP ممکن است با شدت فعالیت بیماری در RA مرتبط باشد. با انجام تست RF و Anti-MCV همراه با Anti-CCP اختصاصیت به بالای ۹۹ درصد افزایش می‌یابد.

آزمایش های تشخیص بارداری

آزمایش تشخیص بارداری

- یکی از بهترین و سریع ترین روش های تشخیص حاملگی، بررسی وجود هورمون گنادوتروپین جفتی انسان یا HCG در ادرار می‌باشد.
- سیکل ماهیانه (Menstrual cycle) در زنان هر ۲۸ روز تکرار می‌شود که روزهای پایانی آن با خونریزی همراه است. در طی این سیکل، تغییرات هورمونی رخ می دهد.
- در نیمه اول سیکل هورمون های LH و FSH تولید می شوند.
- در روز ۱۴، هورمون LH در سطح بالایی تولید شده که باعث تحریک تخمک گذاری از فولیکول می گردد. پس از آزاد شدن تخمک، فولیکول به جسم زرد تبدیل شده و شروع به تولید هورمون پروژسترون می کند.

آزمایش تشخیص بارداری

- پروژسترون با بر اثر روی سلول های دیواره رحم، باعث تکثیر و سرشار شدن از منابع غذایی می شود. عمر جسم زرد کوتاه بوده و با تحلیل رفتن آن، در واقع منبع تولید پروژسترون از بین می رود.

- بنابراین دیواره رحم ریزش پیدا کرده و خونریزی شروع می‌شود. بدین ترتیب دوباره سیکل قاعدگی تکرار می‌شود.

- اگر در روز ۱۴ تخمک گذاری، اسپرم در مجاورت تخمک قرار گیرد، تخمک بارور شده و سلول تخم ایجاد می‌شود. در این صورت، سلول تخم شروع به تکثیر کرده و بلاستوسیت ها را بوجود می آورد.

آزمایش تشخیص بارداری

- در اطراف بلاستوسیت ها، سلول های تروفوبلاست و سلول های syncytiotrophoblast بوجود می آیند که هورمون HCG تولید می کنند.

- هورمون HCG بر جسم زرد اثر گذاشته و از تحلیل رفتن آن جلوگیری می کند. پروژسترون تولید شده از جسم زرد، بر روی سلول های دیواره رحم اثر گذاشته و از ریزش آنها جلوگیری کرده و بدین ترتیب، زمینه را برای لانه گزینی و شروع حاملگی آماده می گردد.

- در روز ۲۲، لانه گزینی انجام و با تشکیل جفت، تولید هورمون های HCGو پروژسترون توسط سلول های آن انجام می گیرد. تخمک لقاح یافته به طرف رحم رفته و در جدار آن لانه گزینی کرده و ۱۰-۳ روز بعد جفت تشکیل می‌شود.

آزمایش تشخیص بارداری

- هر دو زیر واحد آلفا و بتا هورمون HCG توسط سلول های تروفوبلاستیک جفت سنتز می‌شود و نیمه عمر آن ۳۶-۱۲ ساعت است.

- مهمترین وظیفه این هورمون نگهداری از جسم زرد است که تولید استرادیول و پروژسترون می‌کند.

- هورمون HCG ابتدا در خون ظاهر می‌شود و پس از متابولیزه شدن وارد ادرار شده و دفع می‌گردد، بنابراین آزمایش خون حساس تر است و زودتر مثبت می‌شود و درموارد حاملگی خارج رحمی باید خون تست شود.

آزمایش تشخیص بارداری

- مقدار این هورمون در حاملگی طبیعی ۶ تا ۱۰روز بعد از لقاح در سرم مادر افزایش می‌یابد (حتی گاهی از روز سوم لقاح هم قابل شناسایی است).
- معمولا ۲۵-۲۰ روز پس از آخرین قاعدگی (و نه زودتر) مقدار این هورمون در ادرار مادر به اندازه ای می رسد که قابل تشخیص باشد.
- این هورمون ۳ تا ۵ روز پس از عقب افتادن قاعدگی در ادرار و قبل از آن در سرم زنان باردار قابل تشخیص است.
- این هورمون در حاملگی طبیعی ۴ تا ۶ هفته پس از شروع بارداری، افزایش چشم گیری پیدا کرده و سپس به مرور افت می‌کند.

آزمایش تشخیص بارداری

❖ تولید هورمون HCG توسط جفت در طول ۹ ماه حاملگی انجام می‌شود. اما میزان تولید آن در ماه های مختلف حاملگی متفاوت است.

❖ در بارداری طبیعی، ۶ تا ۸ روز پس از لقاح می‌توان هورمون HCG را در سرم اندازه گیری نمود.

❖ این هورمون تا هفته ۸ تا ۱۰ به سرعت افزایش یافته و به ۱۰۰۰۰۰ mIU/ml می رسد. سپس، مقدار آن کاهش یافته و به ۲۰۰۰۰-۱۰۰۰۰ mIU/ml در هفته ۱۵ تا ۱۶ می رسد و میزان آن تا آخر بارداری ثابت باقی می ماند.

❖ برطبق قرارداد، اولین روز از آخرین عادت ماهیانه (LMP: Last Menestrual Period) را شروع بارداری در نظر می گیرند و در واقع در روز چهل و یکم آن هورمون HCG در ادرار قابل تشخیص می‌گردد.

آزمایش تشخیص بارداری

❖در مادرانی که دوقلو باردار هستند، میزان هورمون HCG دو برابر مقدار طبیعی می‌باشد.

❖حدود دو هفته پس از زایمان طبیعی، هورمون HCG در سرم ناپدید می‌شود، در حالی که پس از سقط جنین خودبخودی، ۹ تا ۳۵ روز (به طور متوسط ۱۹روز)، سقط جنین عمدی، ۱۶ تا ۶۰ روز (به طور متوسط ۳۰ روز) و پس از جراحی حاملگی خارج رحمی حدود ۱ تا ۳۱ روز (به طور متوسط ۵/۸ روز)، این هورمون در سرم ناپدید می‌گردد.

❖در دوران حاملگی هورمون HCG توسط سلول های syncytiotrophoblast جفت تولید شده که در سرم و سایر مایعات بدن قابل تشخیص است. این هورمون به مقدار بسیار کم از هیپوفیز مردان و زنان غیرباردار نیز به صورت متناوب ترشح می‌گردد.

آزمایش تشخیص بارداری

- هورمون HCG، گلیکوپروتئینی است که تغییرات بخش کربوهیدراتی آن موجب تفاوت در خصوصیات بیولوژیک آن می‌گردد.

- این هورمون، همانند گلیکوپروتئین های FSH، LH و TSH، از دو زیر واحد آلفا و بتا تشکیل یافته، اما فعالیت بیولوژیک ویژه هر کدام، مربوط به تفاوت های مولکولی و کربوهیدراتی زیر واحد های بتا است.

- در یک بارداری طبیعی، بیش از ۹۰ درصد مولکول‌های HCG موجود در سرم ساختمان کامل دارند و مقدار اندکی زنجیره های آزاد آلفا، بتا و قطعات شکسته شده می‌باشد.

آزمایش تشخیص بارداری

- نسبت زنجیره های آزاد و قطعات شکسته شده هورمون HCG به مولکول کامل در ادرار بیش از سرم است. در سه ماهه اول بارداری، نسبت زنجیره بتا و در سه ماهه دوم و سوم بارداری، نسبت زنجیره آلفا بیش از دیگری می‌باشد.

- در بیماری ها این نسبت تغییر می یابد، در بیماری تروفوبلاستیک (GTD: Gestational Trophoblastic Diseases)، هر چه نسبت β-HCG به مولکول کامل بیشتر باشد، بیماری وخیم تر می‌باشد.

- بنابراین، زنجیره آزاد β-HCG، شاخص بیماری های تروفوبلاستیک محسوب می‌شود.

کاربردهای تست β-HCG

۱- تشخیص حاملگی، هنگامی که قاعدگی عقب افتاده است.

۲- تشخیص، پیش آگهی و درمان بیماری های تروفوبلاستیک که در این موارد تعیین تیتر دقیق β-HCG ضروری است.

۳- تومور مارکر در مردان جهت تشخیص تومورهای بیضه و تومورهای تولید کننده هورمون HCG مانند کارسینومای ریه، که همراه با آلفا فیتو پروتئین اندازه گیری می‌شود.

در بعضی بدخیمی ها از قبیل کوریوکارسینوما، امبریونال سل کارسینوما و نیز حاملگی خارج رحمی میزان β-HCG به شدت بالا می‌رود و اندازه گیری های مرتب آن برای بررسی پاسخ بیمار به شیمی درمانی ضروری است.

۴- علاوه بر این که می توان با جستجوی وجود یا عدم وجود هورمون HCG در نمونه ادرار، حاملگی و برخی از شرایط پاتولوژیک را تشخیص داد.

۵- کاهش تولید مقدار هورمون HCG از میزان طبیعی آن، نشان دهنده احتمال سقط جنین و حاملگی خارج رحمی (Pregnancy Ectopic) می باشد.

۶- افزایش تولید غیرطبیعی هورمون HCG از میزان طبیعی (بیش از ۲۵۰IU/ml) نیز نشانه ای از تومورهایی نظیر کارسینومای جفتی (Choriocarcinoma)، مول هیداتیدیفرم (Hidatidiform Mole) و کارسینومای اولیه تخمدان می باشد.

روش های تشخیص و اندازه گیری هورمون HCG

۱- روش آگلوتیناسیون معکوس غیر فعال لاتکس (Reversed Passive Latex Agglutination)

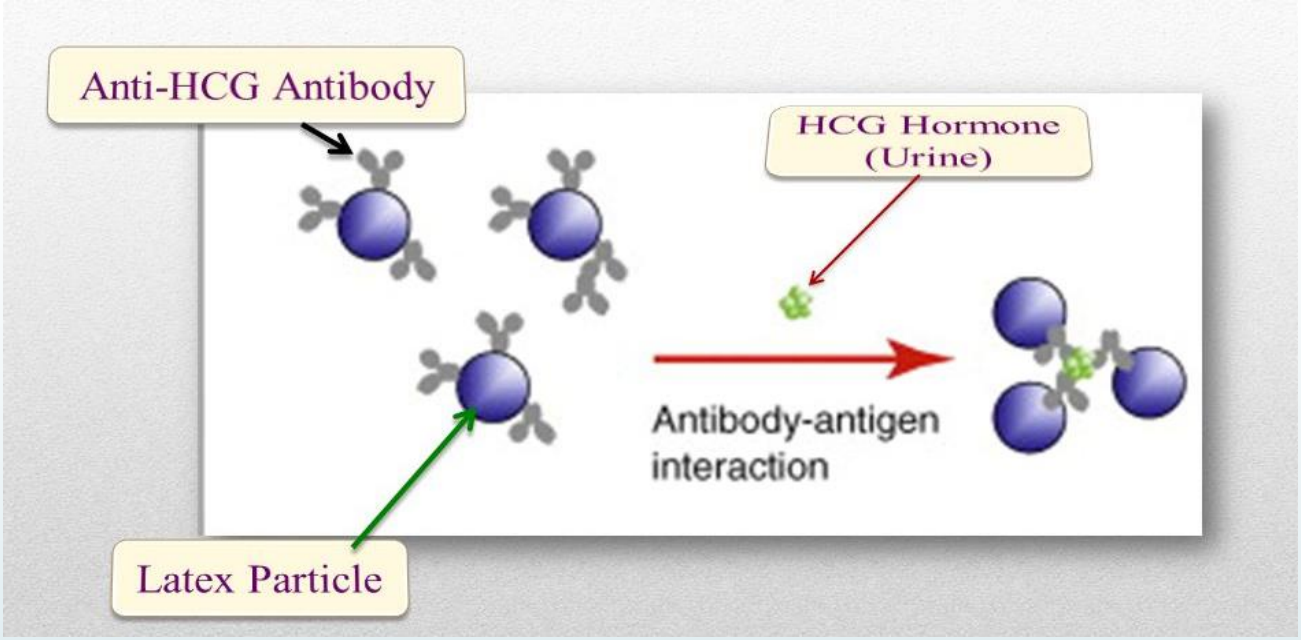
در این روش آنتی‌بادی ضد HCG به ذرات لاتکس متصل می‌باشد. درجه حساسیت به افینیتی آنتی‌بادی ضد HCG بستگی دارد. این روش، به صورت کیفی یا نیمه کمی بر روی لام برای نمونه ادرار انجام می‌شود و درجه حساسیت آنها بر حسب نوع آنتی‌بادی شرکت سازنده حدود ۳/۵-۰/۳ mIU/ml می‌باشد.

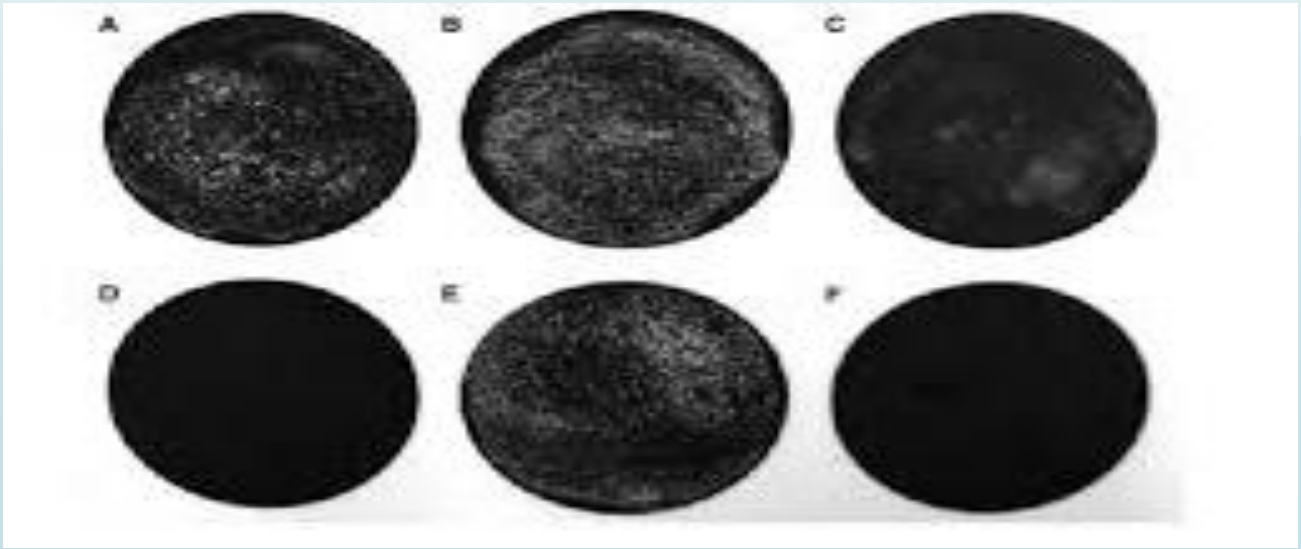
۲- روش ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) که دارای حساسیتی مشابه روش RIA می‌باشد.

۳- روش RIA (Radio Immuno Assay) که حساسترین و دقیق ترین روش است و میزان ۵ IU/L را در نمونه شناسایی می‌نماید.

HCG Latex Agglutination Test







تفسیر

- اگر هورمون HCG در ادرار وجود داشته باشد، به آنتی‌بادی اختصاصی متصل به ذرات لاتکس اتصال می‌یابد.
- اگر در نمونه ادرار مورد آزمایش، ذرات آگلوتینه مشاهده شد، نشان دهنده وجود هورمون HCG بارداری است.
- جهت تایید نتیجه منفی، باید آزمایش را پس از مدتی تکرار نمود.

نکات مهم در مورد روش تشخیص بارداری به روش سرولوژیک

۱- جهت بررسی نتیجه آزمایش از نور مستقیم چراغ مطالعه با لامپ فلوئورسنت استفاده می‌شود.

۲- مواد آزمایش باید در یخچال ۶-۲ $^{\circ}C$ نگهداری و از یخ زدگی محافظت شود.

۳- نمونه ادرار باید تازه و در یخچال نگهداری شود. همچنین، از گرفتن آن بیش از ۱۲ ساعت نگذشته باشد. در صورتی که نمونه پس از ۴۸ ساعت آزمایش می‌شود، جهت جلوگیری از رشد میکروب ها باید در ۲۰- $^{\circ}C$ نگهداری شود. در هنگام آزمایش، پس از ذوب آن را بهم زده و مواد رسوبی را با سانتریفوژ جدا می‌شود.

۴- در صورتی که کدورت در ادرار مشاهده می‌شود باید ابتدا آن را صاف و سپس سانتریفوژ نموده تا کدورت از بین برود.

۵- نمونه ادرار که آلودگی باکتریایی دارد، برای این آزمایش مناسب نمی‌باشد.

۶- نمی‌توان بجای ادرار از سرم برای تشخیص حاملگی با روش آگلوتیناسیون لاتکس استفاده نمود.

۷- لام های مورد استفاده برای آزمایش باید کاملا تمیز و خشک باشند. برای تمیز کردن لام ها فقط از آب استفاده شود. مواد پاک کننده و حلال های آلی در نتیجه آزمایش تداخل می‌کنند.

نکات مهم در مورد روش تشخیص بارداری به روش سرولوژیک

۸- نمونه ادرار باید در ظرف شیشه ای یا پلاستیکی تمیز و فاقد مواد پاک کننده و نگهدارنده جمع آوری شود.

۹- حدود ۴۸ ساعت قبل از آزمایش، نباید داروهای مسکن مانند متادون، سالیسیلات ها و خواب آورها مانند ترکیبات اسید باربیتوریک (فنوباربیتال) استفاده نمود.

۱۰- جهت اندازه گیری هورمون در خون باید از سرم استفاده کرد که ۴۸ ساعت در یخچال قابل نگهداری است و پس از آن باید در ۲۰°C- نگهداری شود. اگر نمونه سرم دارای خون همولیز شده، چربی زیاد یا کدر باشد، نتیجه آزمایش قابل اطمینان نمی‌باشد

۱۱- بالا بودن میزان پروتئین سرم و ادرار، در اندازه گیری هورمون HCG به روش RIA و ELISA مشکلی ایجاد نمی‌نماید، اما در روش آگلوتیناسیون لاتکس ادرار، سبب بروز نتیجه مثبت کاذب می‌شود. بنابراین، بهتر است آلبومین ادرار هم کنترل شده و نتیجه آن به همراه جواب آزمایش بارداری گزارش شود.

آزمایش های تشخیص پروتئین های مرحله حاد

پروتئین های مرحله حاد

- پروتئین های واکنش مرحله حاد، در اثر آسیب های ناشی از ضایعات بافتی، التهاب، عفونت، نکروز و سرطان، در مرحله حاد در سرم یافت شده یا مقدار آنها تغییر می‌نماید. بین شدت آسیب و مقدار پروتئین های مرحله حاد، در جریان خون رابطه وجود دارد.

- نقش بیشتر این پروتئین ها، کاهش ضایعات التهابی در بافت ها، اما گاهی باعث افزایش این آسیب ها می گردند. تمامی این اعمال موجب از بین بردن عامل ایجاد کننده التهاب، خارج ساختن و از بین بردن قطعات بافتی صدمه دیده و ترمیم بافتی می‌شود.

- این پروتئین ها از نظر منشا، ساختمان و عملکرد متفاوت هستند. بیشتر این پروتئین ها در کبد سنتز و میزان ترشح آنها توسط سایتوکاین ها و مواد واسطه ای آزاد شده از بافت های آسیب دیده یا ملتهب تنظیم می‌شود.

- ترکیباتی مانند IL-1، IL-6، TNF-α، INF-γ، پروستاگلاندین ها و آنزیم های لیزوزومی که از سلول های Th، مونوسیت ها و ماکروفاژها و نوتروفیل ها ترشح و باعث تحریک سنتز پروتئین های فاز حاد از کبد می‌شوند.

- به علاوه، هورمون های غدد جنسی، هیپوفیز و آدرنال نیز در سنتز این پروتئین ها در سلول های کبدی نقش دارند.

پروتئین های مرحله حاد

- در برخی از بیماری های التهابی، علاوه بر افزایش مقدار پروتئین های مرحله حاد، تعداد لکوسیت ها، سرعت رسوب گلبول های قرمز و حرارت بدن نیز افزایش می‌یابد. ظهور، افزایش یا کاهش مقدار هر یک از این پروتئین ها در یک بیماری متفاوت و مستقل از یکدیگر می‌باشد.

- برای مثال پروتئین واکنشگر C (CRP: C-Reactive Protein) و α1-acid glycoprotein، ۶ تا ۸ ساعت پس از ضایعه در سرم ظاهر شده و پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت به بیشترین میزان می رسند و در طول ضایعه همچنان بالا باقی مانده و پس از ترمیم بافت، مقدار آنها به سرعت کاهش و در سرم قابل تشخیص نمی‌باشند.

- در حالی که هاپتوگلوبین، سرولوپلاسمین و α1-antitrypsin پس از ۱۲ تا ۲۴ ساعت در سرم قابل تشخیص شده و ظرف ۳ تا ۴ روز به بیشترین مقدار خود می رسند.

- نقایص ژنتیکی، مصرف برخی داروها و بعضی از بیماری ها موجب عدم افزایش این پروتئین ها در فاز حاد می‌گردد.

پروتئین واکنشگر C

- CRP در فاز حاد بیماری ها در سرم ظاهر و به باکتری ها، قارچ ها، انگل ها و سلول ها مانند لکوسیت ها متصل می‌شود.
- پلیمر CRP مسیر کلاسیک سیستم کمپلمان فعال نموده، بنابراین بطور غیرمستقیم موجب اپسونیزاسیون و لیز سلول ها می گردد.
- CRP، با اتصال مستقیم به میکروارگانیسم ها و لکوسیت ها اپسونیزاسیون را تسهیل می‌نماید.
- بنابراین، پروتئین CRP، یک اپسونین است که در پاکسازی ذرات خارجی از جریان خون نقش دارد.
- CRP در دفاع بدن در مقابل عفونت های پنوموکوک نقش مهمی دارد و قبل از تولید آنتی‌بادی، ضد میکروب فعالیت می‌کند.

پروتئین واکنشگر C

- در حالت طبیعی به میزان خیلی کم در سرم و مایعات بدن (مایع صفاقی، مایع پلورال، مایع سینوویال وجود دارد (کمتر از ۰/۵ mg/dl) و در واکنش های التهابی، ظرف مدت ۶ تا ۴۸ ساعت مقدار این پروتئین تا ۳۰۰۰ برابر، افزایش می یابد.
- میزان CRP در ضایعات بافتی نیز تا ۲ درصد از کل پروتئین های سرم افزایش می‌یابد. CRP به حرارت مقاوم نیست و در ۷۰°C به مدت ۳۰ دقیقه از بین می‌رود.
- این مولکول از جفت عبور نمی‌کند. CRP پنتامر و وزن مولکولی آن ۱۴۰ کیلودالتون است که در هپاتوسیت ها سنتز می‌شود.
- CRP و ایمونوگلبولین ها، از نظر عملکرد شباهت های زیادی دارند. CRP از تجمع پلاکت ها و فعال شدن فاکتورهای آن و خروج سروتونین و بتاگلوکورونیداز از پلاکت ها ممانعت می‌نماید.

پروتئین واکنشگر C

- میزان CRP بعد از اعمال جراحی، انتقال خون، واکسیناسیون و آمبولی ریه، بیماری های مختلف از جمله عفونت های باکتریایی، تب روماتیسمی فعال، سکته قلبی حاد، سرطان های بدخیم منتشر، آرتریت روماتوئید فعال، عفونت های ویروسی، سل، التهاب، تروما و انفارکتوس میوکارد در سرم افزایش می‌یابد.
- اندوتوکسین باکتری ها قوی ترین محرک ساخته شدن پروتئین های مرحله حاد می‌باشد. بنابراین، اندازه گیری CRP از قابل اعتمادترین روش های تشخیص و کنترل التهاب های حاد باکتریایی و عفونت های نهفته است. اندازه گیری میزان CRP جهت تشخیص مننژیت باکتریایی، سپتی سمی و پنومونی ارزش بالایی دارد. در عفونت مجاری ادراری اندازه گیری CRP به عنوان تست آزمایشگاهی قابل اعتماد در تشخیص افتراقی پیلونفریت از سیستیس گزارش شده است. در عفونت های مزمن با کلامیدیا پنومونیه و هلیکوباکتر پیلوری میزان CRP از افراد نرمال بیشتر است.

پروتئین واکنشگر C

- در انفارکتوس میوکارد، اندازه گیری CRP آزمایش حساسی جهت سنجش نکروز یا التهاب بافت عضلانی ماهیچه قلب می‌باشد.
- CRP، پس از کاهش مقدار SGOT تا مدتی مثبت می ماند. در صورتی که CRP منفی باشد، ضایعه ماهیچه قلبی وجود ندارد و نارسایی عروق کرونر یا سایر بیماری های قلبی محتمل است. کنترل مداوم میزان CRP امکان تشخیص زودرس مشکلات احتمالی پس از سکته قلبی را میسر می سازد.
- در تب روماتیسمی، CRP حساس ترین آزمایشی است که در طول بیماری مثبت می ماند. با اندازه گیری CRP در بیماری های خود ایمن، می‌توان شدت و پیشرفت بیماری را بررسی نمود، زیرا به ندرت بدون وجود التهاب بافتی، مقدار آن به طور مداوم بالا می‌باشد.
- آزمایش CRP در مقایسه با بررسی دیگر شاخص های التهاب مانند تب، درد، افزایش لکوسیت های خون و سرعت رسوب اریتروسیت ها قابل اعتمادترین شاخص است و به دلیل نیمه عمر کوتاه آن بعد از حذف عامل تحریک، بسرعت کاهش می یابد.

ارزش CRP در تشخیص بیماری های التهابی و انفارکتوس میوکارد

- در حالت طبیعی کمتر از ۰/۵ mg/dl
- در عفونت های حاد باکتریایی ۱۵۰-۳۵۰ mg/dl
- در عفونت های حاد ویروسی ۲۰-۴۰ mg/dl
- در انفارکتوس میوکارد ۴-۱۰ mg/dl

آزمایش CRP

- برای تشخیص CRP، از آنتی‌بادی ضد CRP از کلاس IgG برای تشخیص CRP در سرم استفاده می‌شود.
- روش های پرسیپیتاسیون در لوله موئینه، ایمونودیفوزیون، ثبوت مکمل، هماگلوتیناسیون، نفلومتری، توربیدومتری و آگلوتیناسیون لاتکس برای تشخیص و اندازه گیری CRP در سرم استفاده می‌شود.
- برای انجام تست فقط از سرم تازه حاصل از سانتریفوژ نمودن خون لخته در لوله شیشه ای استفاده می‌شود.
- در این آزمایش نباید از سرم همولیز، لیپمیک و آلوده استفاده شود. قبل از انجام آزمایش، سرم و کیت را از یخچال خارج نموده و به مدت ۱۵ دقیقه در آزمایشگاه قرار دهید تا به دمای محیط برسد.

مراحل آزمایش کیفی CRP-Latex

۱- بر روی یک اسلاید زمینه سیاه تمیز یک قطره سرم بیمار، سرم کنترل مثبت و سرم کنترل منفی ریخته می‌شود.

۲- شیشه محتوی آنتی‌بادی ضدCRP متصل به ذرات لاتکس را به آرامی تکان داده و به سرم ها یک قطره از آن را اضافه می‌شود.

۳- با اپلیکاتورهای جداگانه، سرم ها را با ذرات لاتکس مخلوط و به صورت دایره ای روی لام پهن می‌شود.

۴- لام را به مدت ۲ تا ۵ دقیقه به آرامی حرکت دورانی داده و نتیجه آگلوتیناسیون زیر نور چراغ بررسی می‌شود.

خشک شدن نمونه باعث نتیجه مثبت کاذب می‌گردد.

تفسیر آزمایش کیفی CRP-Latex

چنانچه ذرات لاتکس به صورت سوسپانسیون یکنواخت و شیری رنگ پراکنده باشند، نتیجه آزمایش منفی است.

اگر سرم بیمار حاوی CRP باشد ذرات لاتکس به شکل توده های درشت بهم چسبیده نمایان می‌شود و نتیجه آزمایش به صورت زیر گزارش می‌گردد:

آگلوتیناسیون درشت +++

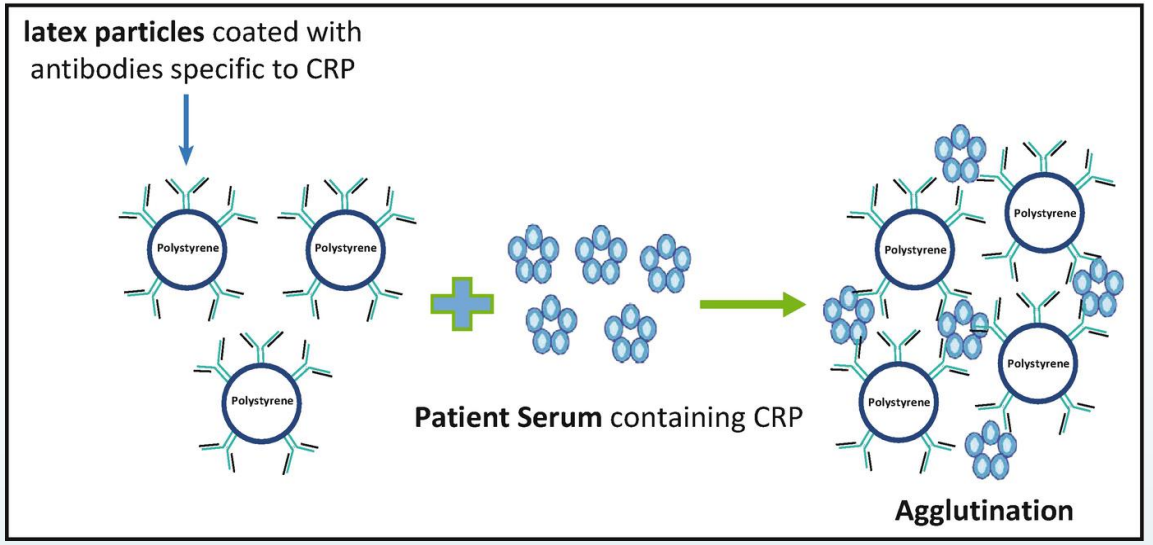
آگلوتیناسیون متوسط ++

آگلوتیناسیون ریز +

عدم آگلوتیناسیون –

در این تست مقدار CRP بالاتر از ۰/۶mg/dl در نمونه تشخیص می‌شود.


CRP Latex


latex particles coated with
antibodies specific to CRP
Polystyrene
Polystyrene
Polystyrene
Patient Serum containing CRP
Polystyrene
Polystyrene
Polystyrene
Polystyrene
Agglutination


RESULT INTERPRETATION
POSITIVE
NEGATIVE
NEGATIVE
NEGATIVE
POSITIVE
POSITIVE

روش کمی آزمایش CRP-Latex

- در صورت اثبات وجود CRP در سرم بیمار، به منظور اندازه گیری مقدار یا تیتر آن در سرم، روش کمی (لوله ای) انجام می‌شود؛ زیرا مقدار CRP ارتباط مستقیمی با شدت التهاب دارد.

- همچنین، گاهی اوقات مقدار CRP در سرم بیمار بسیار زیاد است، در نتیجه به علت پدیده منطقه ای ممکن است یک سرم مثبت، به اشتباه منفی گزارش شود.

- بنابراین بهتر است، چنانچه آزمایش CRP منفی شد، قبل از اینکه منفی گزارش شود با رقت ۱:۵ یا بیشتر آزمایش دوباره انجام شود.

روش کمی آزمایش CRP-Latex

۱- سرم بیمار را به نسبت های ۱:۲ تا ۱:۶۴ و گاهی ۱:۱۲۸ با بافر موجود در کیت رقیق می‌شود. بدین منظور، برای هر نمونه سرمی، شش عدد لوله آزمایش را شماره گذاری می‌شود.

۲- به همه لوله ها ۵۰ میکرولیتر بافر اضافه می‌گردد. به لوله شماره ۱، ۵۰ میکرولیتر سرم بیمار اضافه نموده و با تکان دادن لوله محتویات داخل آن را به خوبی مخلوط می‌شود (رقت ۱:۲).

۳-۵۰ میکرولیتر از محلول لوله ۱ را به لوله ۲ اضافه و بعد از مخلوط کردن این عمل را برای لوله های دیگر بطور سریال تکرار می‌گردد (۲ به ۳ و ...). در آخر ۵۰ میکرولیتر از محلول لوله شماره ۶ را بیرون ریخته می‌شود. با این روش رقت های مختلفی از سرم (۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶و ...) تهیه می‌شود.

۴- هر کدام از نمونه های رقیق شده را مانند روش کیفی بررسی می‌گردد. آخرین رقتی که واکنش آگلوتیناسیون در آن قابل مشاهده است به عنوان تیتر CRP گزارش می‌شود.

تفسیر

- CRP در مقادیر کم در سرم افراد سالم وجود دارد. میزان نرمال mg/dl ۴-۰/۸ می‌باشد.
- میزان CRP در سرم افرادی که دچار التهاب یا نکروز بافتی نیستند، کمتر از mg/dl ۰/۵ است.

- میزان متوسط مقادیر نرمال در نوزادان mg/dl ۰/۰۱ و در بزرگسالان و خانم های غیرباردار کمتر از mg/dl ۰/۵ می‌باشد.

داروهای تداخل کننده

- داروهایی افزایش دهنده سطح CRP مانند قرص های ضد بارداری خوراکی
  داروهایی کاهش سطح دهنده CRP مانند ضد التهاب های غیراستروئیدی، سالیسیلات ها، استروئیدها

اندازه گیری hsCRP (High Sensitivity CRP)

- hsCRP در پاسخ به التهاب و عفونت در کبد تولید می‌شود. در اوایل فاز حاد بیماری، سطح این پروتئین، در پاسخ به تولید سایتوکاین های التهابی مانند IL-6 به طور چشمگیری افزایش می‌یابد.
- تست hs-CRP همراه تری گلیسرید، کلسترول، LDL، HDL و فسفولیپاز مرتبط با فسفولیپید A_2 به منظور ارزیابی احتمال خطر بروز بیماری های قلبی-عروقی انجام می‌شود.
(Lp-PLA2: Lipoprotein-associated phospholipase A_2)
- تست hs-CRP در مقایسه با آزمون استاندارد CRP حساسیت بالاتری دارد که می‌تواند غلظت های بسیار پایین را در خون اندازه گیری نماید.
- به همین دلیل این آزمایش برای پیش بینی «خطر بروز بیماری های قلبی – عروقی در افراد سالم» از دقت بیشتری نسبت به آزمون CRP برخوردار است.

اندازه گیری hsCRP (High Sensitivity CRP)

- سطوح بالای hs-CRP در افراد سالم، پیش بینی کننده افزایش خطر ابتلا به حمله قلبی، سکته، مرگ ناگهانی، بیماری سرخرگی محیطی، حتی زمانی که سطح کلسترول در گسترده قابل قبول قرار دارد، می باشد.
- این تست به دو روش ایمونوتوربیدومتری یا ELISA انجام می گیرد. اساس روش توربیدومتری مبتنی بر تشکیل کمپلکس حاصل از واکنش بین hs-CRP و آنتی سرم اختصاصی آن می باشد.
- میزان کدورت ایجاد شده با مقدار hs-CRP رابطه مستقیم دارد.

کاربردهای بالینی hsCRP (High Sensitivity CRP)

۱- ارزیابی خطر ابتلا به انفارکتوس میوکارد (MI) در بیماران حاد عروق کرونری

۲- ارزیابی خطر ابتلا به بیمار قلبی-عروقی یا حوادث ایسکمیک در افراد بدون تظاهرات بالینی

۳- تشخیص زود هنگام عفونت در اطفال

عوامل مداخله گر: استفاده از IUD به علت التهاب بافتی موجب نتایج مثبت کاذب می‌گردد.

مصرف قرص های ضدبارداری (OCP) و هورمون های اگزوژن موجب افزایش کاذب CRP می‌گردد.

تفسیر hsCRP (High Sensitivity CRP)

- افزایش مقادیر hs-CRP با بالا رفتن خطر ابتلا به بیماری ها یا حوادث قلبی و عروقی مرتبط است.
- این آزمایش برای ارزیابی خطر ابتلا به مشکلات قلبی و عروقی توصیه می‌شود. از آنجا که CRP یک واکنش دهنده فاز حاد می‌باشد، اندازه گیری آن در افراد به ظاهر سالم، بطور واقعی منعکس کننده میزان سطح التهاب نمی باشد.
- افزایش میزان CRP غیراختصاصی بوده و بدون یک سابقه بالینی کامل نباید تفسیر گردد.

خطر پایین mg/L> ۱/۵ **خطر حد واسط mg/L ۳-۱**

خطر بالا mg/L> ۳ **التهاب حاد mg/L> ۱۰**

- مقادیر متوسط hsCRP (۱۰mg/L-۱) با بیماری های قلبی- عروقی و پریودنتال مرتبط می‌باشد.
- مقادیر بالاتر از ۱۰mg/L از hsCRP با انواع بیماری های حاد شامل سرماخوردگی، بیماری های مزمن مانند برونشیت یا بیماری های مزمن انسدادی ریوی (COPD) و بیماری های RA و لوپوس اریتماتوز سیستمیک ارتباط دارد.

اهمیت بالینی آزمایش hsCRP (High Sensitivity CRP)

۱- hsCRP یک مارکر بالینی با اهمیت و شناخته شده در التهاب عمومی یا مرتبط با قلب می‌باشد.

۲- در افراد به ظاهر سالم با میزان hsCRP بالا، احتمال ابتلا و بروز بیماری های قلبی عروقی ۴ برابر بالاتر است.

۳- افزایش hsCRP در افراد به ظاهر سالم و بیماران عروق کرونر، احتمال خطر وقایع قلبی-عروقی در آینده مانند حمله قلبی، سکته و مرگ را نشان می‌دهد.

۴- کاهش هر دو مارکر hsCRP و LDL کلسترول، نشان دهنده کاهش در سرعت پیشرفت آترواسکلروز و بهبود شرایط بالینی بیمار است.

۵- درمان با استاتین در بیمارانی که hsCRP بالا و سطح لیپید سرم آنها طبیعی است، موجب کاهش قابل توجهی در خطر احتمال حمله های قلبی، سکته و مرگ دارد.

آزمایش های تشخیص تب مالت

تب مالت

- تب مالت (بروسلوزیس) یا تب مواج یک بیماری عفونی مشترک بین انسان و دام بوده و موجب سقط جنین در حیوان است.

- این بیماری توسط کوکوباسیل گرم منفی بروسلا ایجاد و از طریق مصرف لبنیات آلوده مانند شیر غیرپاستوریزه، پنیر، بستی و خامه و یا تماس مستقیم کشاورزان، دامداران، دامپزشکان و کارکنان کشتارگاه ها به انسان منتقل می‌گردد. گونه های باکتری بروسلا بیماری زا برای انسان بر اساس میزبان مخزن عبارتند از:

۱- بروسلا ملی تنسیس عامل بیماری در بز و گوسفند و بیشتر موارد تب مالت انسانی در ایران
۲- بروسلا آبورتوس عامل بیماری در گاو
۳- بروسلا سوئیس عامل بیماری در خوک
۴- بروسلا کانیس عامل بیماری در سگ

تب مالت

- تظاهرات بالینی بیماری تب مالت، ضایعات و درد های استخوانی و مفصلی و اختلالات عصبی می‌باشد.
- بیماری از نظر بالینی به سه نوع حاد، تحت حاد و مزمن طبقه بندی می‌شود. در صورت درمان، مرحله حاد بین ۳ تا ۱۲ ماه می‌باشد.
- بیش از ۸۰ درصد بیمارانی که به صورت مناسب آنتی بیوتیک درمانی می‌شوند، بهبود یافته اما در مواردی بازگشت بیماری مزمن نیز دیده می‌شود.
- **نکته قابل توجه این است که یک بار آلودگی و ابتلا به تب مالت موجب مصونیت کامل نمی‌شود.**
- در صورت آلودگی با باکتری های بروسلا، ایمونوگلوبولین های IgM، IgA، IgG1، IgG2 و به مقدار کم IgE تولید می‌گردد.

تب مالت

- بروسلا دارای آنتی ژن های A و M در لیپوپلی ساکارید دیواره می باشد. بروسلا با ویبریو کلرا آنتی ژن مشترک دارد. بنابراین، واکسیناسیون بیماری وبا، تیتر آنتی بادی ضد بروسلا را بصورت کاذب بالا می برد.

- در این عفونت IgM از روز ۵ تا ۷ ظاهر شده و در طی ۱۳ تا ۲۱ روز پس از ورود باکتری در بدن به بالاترین تیتر خود خواهد رسید.

- در اوائل این مرحله، آزمایش 2ME-رایت منفی و سایر آزمایش ها مثبت می‌شوند. سپس سنتز IgG اختصاصی (IgG1 و IgG2) از روز ۱۴ تا ۲۱ بیماری آغاز شده و پس از چند هفته تیتر آن از IgM نیز بیشتر می‌شود.

تب مالت

- در اواخر این مرحله تمام آزمایش های سرولوژی تشخیص بروسلوز مثبت می‌شوند. معمولا در هفته ۴ تا ۸ مرحله حاد بیماری، تیتر آنتی‌بادی IgG به حداکثر خود رسیده و در صورتی که درمان با آنتی بیوتیک مناسب صورت گیرد، تیتر IgG کاهش یافته ولی تیتر IgM از ۶ ماه تا دو سال ممکن است دوام داشته باشد و به طور معمول هر سه ماه یک رقت کاهش می‌یابد.

- اگر تیتر آنتی بادی کاهش یابد، نشانه درمان و فروکش کردن بیماری است. حال اگر درمان صورت نگیرد یا ناقص انجام پذیرد، بیماری وارد سیر مزمن می‌شود.

- در مرحله مزمن آنتی بادی های تولید شده اغلب از نوع IgG3 و IgG4 و نیز IgA بوده که در اصطلاح به نام آنتی بادی های ناقص یا مسدود کننده مشهورند.

تب مالت

- تشخیص بیماری تب مالت بر اساس یافته های اپیدمیولوژیکی، بالینی و آزمایشگاهی صورت می‌گیرد.
- بهترین راه تشخیص تب مالت کشت خون، مغز استخوان، مایع مغزی نخاعی، مایع مفصلی و سایر نمونه ها جهت جداسازی باکتری بروسلا می‌باشد،
- اما این روش همیشه موفق نمی‌باشد. بنابراین می‌توان از آزمایش های سرولوژی تخصصی جهت تشخیص هر مرحله بیماری استفاده نمود.
- در تشخیص تب مالت، علاوه بر کشت باکتری و روش های سرولوژیک، از آزمایش الایزا جهت تعیین غلظت هر یک از زیر کلاس های آنتی‌بادی ضد بروسلا نیز استفاده می‌شود.

تب مالت

- در تشخیص تب مالت از آزمایش های رز بنگال، رایت، کومبس- رایت، رایت- سانتریفوژ، 2ME- رایت استفاده می‌شود. آزمایش های رزبنگال و رایت زودتر از دیگر آزمایش ها مثبت می‌شود، زیرا آنتی‌بادی های IgM و IgG در این آزمایش ها تشخیص داده می‌شوند. آزمایش رزبنگال جهت تشخیص مرحله حاد تب مالت کاربرد دارد.

- در تشخیص تب مالت، حساسیت آزمایش رز بنگال و رایت لوله ای به ترتیب ۱۰۰ و ۹۴/۳ درصد می‌باشد، اما حساسیت آزمایش الایزا برای آنتی‌بادی های IgM، IgG و IgA اختصاصی ضد بروسلا به ترتیب ۹۷/۱، ۹۴/۳ و ۷۱/۴ می‌باشد. بنابراین، آزمایش رز بنگال و رایت لوله ای حساس تر و اختصاصی تر هستند.

روش های تشخیص سرولوژیکی بروسلوزیس

- با وجود این از الایزا جهت پیگیری درمان به دلیل حساسیت و ویژگی مناسب و تعیین زیرکلاس های آنتی‌بادی استفاده می‌شود.
- در بررسی سرولوژی بیماری تعیین تفاوت تیتر دو نمونه سرم حداقل به فاصله دو هفته با ارزش می باشد.
- در افرادی که در تماس مکرر با آنتی ژن بروسلا هستند، آزمایش سرمی مثبت بدون علائم بالینی مشاهده می‌شود. از این رو نتایج آزمایش های سرمی در بروسلوز شغلی از اهمیت اندکی برخوردار است.
- گاهی نتایج مثبت کاذب ناشی از واکنش متقاطع سایر آنتی‌بادی های ضد باکتریایی با آنتی‌ژن های بروسلا مشاهده می‌گردد. بنابراین، به منظور تشخیص بروسلوز روش های استاندارد آزمایشگاهی توام با اطلاعات کسب شده اپیدمیولوژی -کلینیکی-آزمایشگاهی کاربرد دارد.

آزمایش رزبنگال

- آزمایش رزبنگال در منابع مختلف به اسامی پلیت تست، کارد تست (Card test) و آزمون سریع نامیده می‌شود.
- آنتی‌ژن رزبنگال به رنگ قرمز مایل به صورتی و با pH اسیدی برابر با ۰/۵± ۶/۳ و به جرم نهایی ۸٪، از کلنی های صاف (smooth) بروسلا آبورتوس، سویه ۱۹ یا ۹۹ که شاخص های آنتی‌ژنی مشترکی با دیگر سویه های بروسلا دارند (طبق روش استاندارد بین المللی در موسسه رازی)، تهیه می‌شود.
- این آنتی‌ژن جهت تشخیص اولیه در برنامه های کنترل و ریشه کنی تب مالت کاربرد دارد. آنتی‌ژن رزبنگال را باید دور از نور و در یخچال $4^{\circ}C$ نگهداری کرد.
- این آنتی‌ژن تا زمانی که اتوآگلوتینه نشده، قابل مصرف می‌باشد. آنتی‌ژن رزبنگال موسسه رازی را نباید رقیق کرد.

آزمایش رزبنگال

- قبل از انجام آزمایش باید ابتدا آنتی‌ژن رزبنگال و سرم بیمار را از یخچال خارج کرده و در محیط آزمایشگاه به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه نگهداری نمود تا به دمای محیط برسند.
- سپس، بر روی یک لام شیشه ای۱۲ خانه،۵۰ میکرولیتر سرم را مجاور یک قطره آنتی‌ژن قرار داده و با یک اپلیکاتور پلاستیکی، این دو قطره را با هم مخلوط نمود.
- سپس صفحه را در دست یا روی روتاتور به مدت ۴ دقیقه حرکت داده و نتیجه آگلوتیناسیون را زیر نور چراغ مطالعه یا با کمک میکروسکوپ نوری مشاهده نمود.

تفسیر آزمایش رزبنگال

- واکنش مثبت به حالتی گفته می‌شود که دانه های آگلوتینه بطور مشخص و جدا از هم دیده شوند و در موارد منفی، دو قطره مخلوط شده به حالت یکنواختی باقی خواهند ماند.

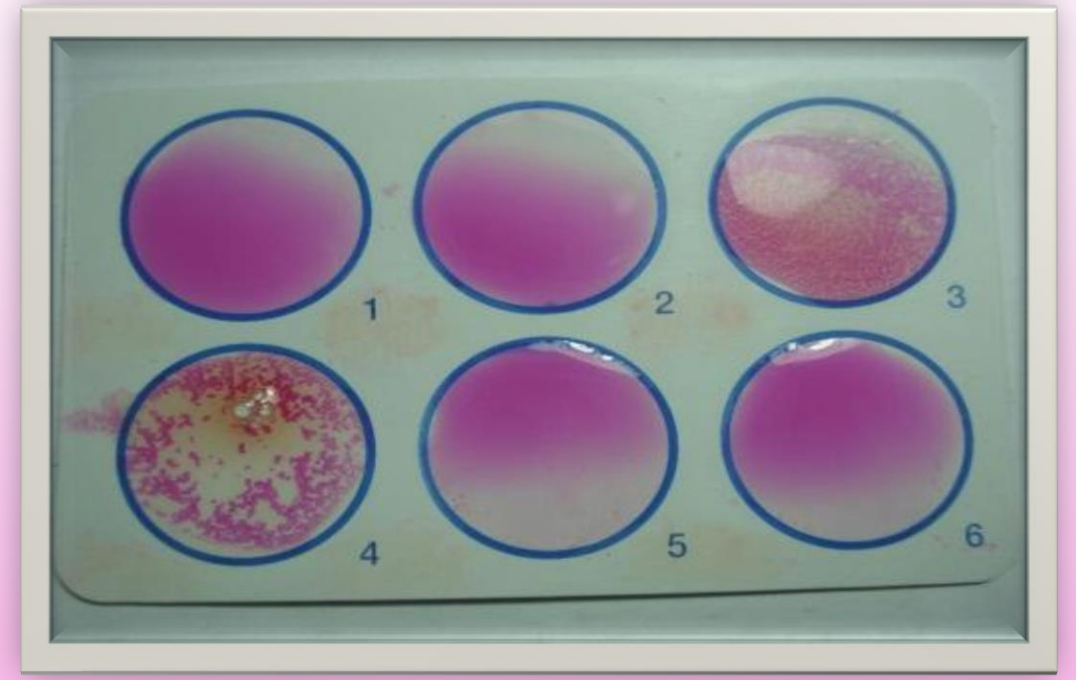
- در آزمایش رزبنگال موارد مشکوک دیده نمی‌شود و نتیجه با قاطعیت مثبت یا منفی می‌باشد.

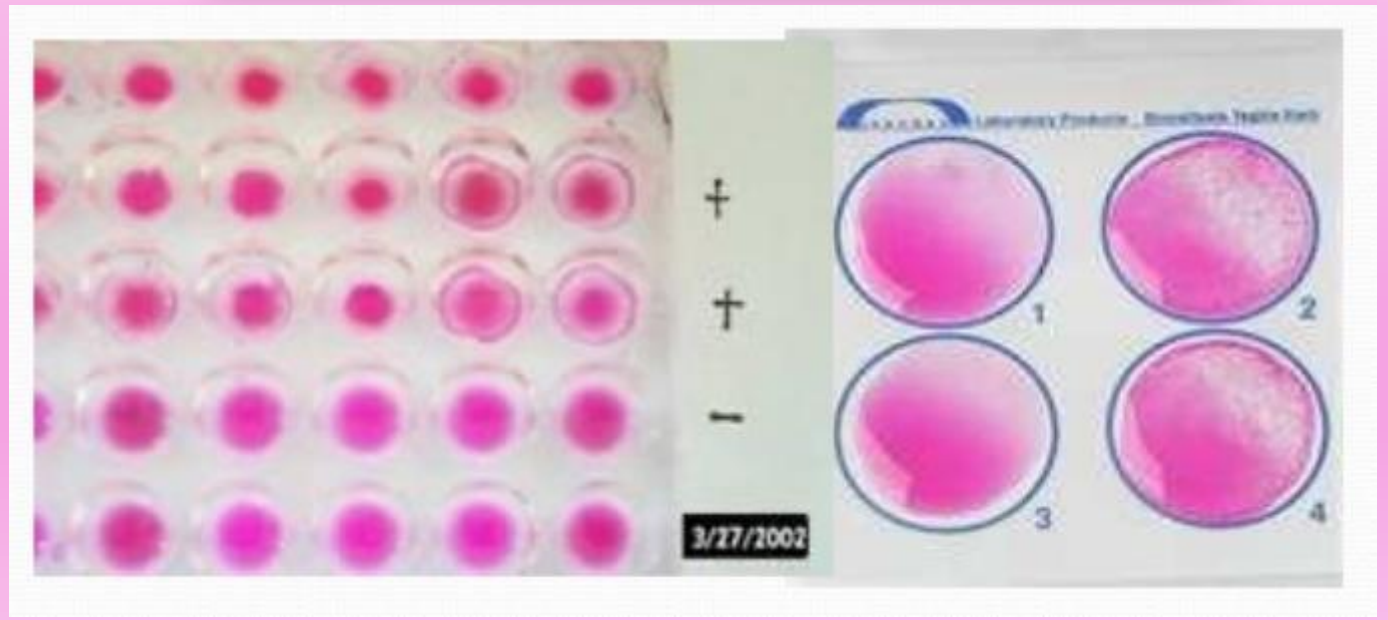
- این آزمایش بسیار حساس و نتیجه آن با آزمایش الایزا قابل مقایسه است. همچنین آنتی‌ژن رزبنگال با باکتری های عامل تولارمی و وبا واکنش متقاطع ندارد، بنابراین نتیجه مثبت کاذب در این آزمایش دیده نمی‌شود.

تفسیر آزمایش رزبنگال

- گاهی در سرم نوزادان کمتر از ۶ ماه آزمایش های رزبنگال، رایت و 2-ME مثبت می‌شوند.
- برای اثبات بیماری تب مالت درکودک نتایج آزمایش رایت با 2-ME مقایسه می‌شود، اگر نتیجه آزمایش 2-ME رایت کمتر از آزمایش رایت لوله ای شد، احتمالا این کاهش مربوط به کلاس IgM است که دلالت بر بیماری تب مالت در نوزاد دارد.
- در صورتی که نتایج آزمایش رایت و 2-ME رایت مشابه باشد، نشان دهنده وجود آنتی‌بادی IgG مادری در سرم نوزاد بوده است و نوزاد بیمار نیست.
- اگر نتیجه آزمایش رایت و ویدال نوزادی مثبت شود، جهت تفسیر باید نتایج آزمایش های سرولوژی با آزمایش های باکتریولوژی و علائم بالینی بیمار به دقت مقایسه گردد.


ROSA
BENGALA
:CZV
ROSE
BENGAL
(10 ml)
Brucella abortus
antigen for Rose
Bengal test
:CZV


1
2
3
4
5
6


+
+
-
3/27/2002
1
2
3
4

آزمایش رایت (Wright Test)

- آزمایش رایت به دو روش سریع بر روی لام و در لوله با رقیق سازی سرم بیمار انجام می‌گیرد.
- آنتی‌ژنی که استفاده می‌شود از کلنی های صاف بروسلا آبورتوس سویه ۹۹ یا ۱۹ یا بروسلا ملی تنسیس می‌باشد.
- چنانچه در روز تهیه سرم، نمونه مورد آزمایش قرار نگیرد، تا روز آزمایش سرم در ۲-۸°C نگهداری می‌شوند.

آزمایش کومبس–رایت

- آزمایش کومبس-رایت (Coombs-Wright Test) جهت تشخیص آنتی‌بادی های ناقص (Incomplete) یا مسدود کننده (Blocking)، بویژه در موارد بازگشت تب مالت یا مرحله مزمن بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرد.

- در موارد بازگشت بیماری، چند ماه بعد از بهبودی ممکن است افزایش تیتر آنتی‌بادی در آزمایش های رایت و 2ME قابل تشخیص نباشد.

- بنابراین جهت تشخیص بیماری از آزمایش کومبس رایت، ثبوت مکمل و اندازه گیری IgA وIgG ضد بروسلا با روش الایزا استفاده می گردد. در این آزمایش ها، افزایش تیتر در مقایسه با دوران بهبودی مشاهده می‌شود.

آزمایش رایت–سانتریفوژ

- روش رایت سانتریفوژ توسط دکتر نظری و همکاران در بخش ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران پیشنهاد شده است.

- برای انجام این آزمایش، سرم را طبق روش معمولی رایت در لوله ها رقیق کرده و به آنها آنتی‌ژن بروسلا اضافه نموده و بلافاصله با سرعت ۲۵۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و جواب ها یادداشت می‌شود. با این روش در بیشتر موارد پدیده منطقه ای از بین می‌رود.

آزمایش 2ME-Wright

- این آزمایش پس از مثبت شدن آزمایش رایت، جهت تشخیص کلاس آنتی‌بادی انجام می‌شود. مولکول‌های IgM سرم با مواد احیا کننده از بین می روند، در صورتی که IgG و IgA نسبت به این مواد در غلظت مورد استفاده، مقاوم هستند.

- مواد احیا کننده همچون ۲- مرکاپتواتانول (2-ME)، پیوندهای دی سولفیدی، بین زنجیره های سنگین و سبک ایمونوگلبولین را می شکنند. مهمترین کاربرد این آزمایش، تشخیص افتراقی بین تب مالت فعال از غیر فعال در بیمارانی است که تظاهرات بالینی بیماری را نشان می‌دهند ولی کشت خون یا سایر نمونه ها، عاری از میکروب بروسلا و تیتر آزمایش رایت آنها نیز پایین است، انجام می‌گیرد.

- با انجام این آزمایش تاثیر آنتی‌بیوتیک مناسب را در درمان بیماری بررسی می شود.

آزمایش تشخیص تب تیفوئید

Widal Test

آزمایش تشخیص تب تیفوئید

- از آزمایش ویدال جهت تشخص بیماری حصبه (تب تیفوئید) و شبه حصبه (پاراتیفوئید) استفاده می‌شود. این بیماری توسط باسیل روده ای سالمونلا که از طریق دستگاه گوارش وارد بدن می‌شود، ایجاد می‌گردد. گونه های سالمونلا عامل بیماری عبارتند از: سالمونلا تیفی گروه D و سالمونلا پاراتیفی گروه A، B و C.

- این باکتری ها عامل تب های تیفوئیدی و پاراتیفوئیدی، سپتی سمی و مسمومیت های غذایی می باشند.

- تب های تیفوئیدی و پاراتیفوئیدی، بیماری های عفونی منتشر، حاد و تب دار می‌باشند که سیستم رتیکولواندوتلیال، بافت لنفوئیدی روده ای و کیسه صفرا را درگیر می‌کنند.

- میکروب در اثر خوردن آب آلوده به مدفوع یا ادرار انسان عفونی، وارد بدن می‌شود و چون این میکروب به همین وسیله نیز از بدن بیمار خارج می‌شود، می تواند توسط دست ناقلینی که در تهیه و توزیع میوه ها و سایر غذاها دخالت دارند، آب و غذا را آلوده کند. منبع دیگر عفونت، خوردن صدف و حلزون آبهای آلوده است.

آزمایش تشخیص تب تیفوئید

- این بیماری شروعی تدریجی داشته و با تب پلکانی تا ۴۱°C، سردرد و حالت گیجی، ضعف، بی اشتهایی، کندی نبض، بزرگی طحال، سرفه بدون خلط، یبوست و یا اسهال همراه می باشد.
- در نوزادان و شیرخواران شروع بیماری ممکن است ناگهانی بوده و اسهال بیش از یبوست شایع است.
- درحدود ۱٪ موارد درمان نشده، احتمال خونریزی گوارشی یا سوراخ شدن روده کوچک وجود دارد. از جمله عوارض مهم دیگر عبارتند از: توکسمی (وجود سم در خون) و میو کاردیت (التهاب عضله قلب).
- سالمونلاها را می‌توان قبل از مثبت شدن تست ویدال از خون، مدفوع و ادرار جدا نمود. با بالارفتن تیتر آنتی‌بادی، کشت میکروب منفی می‌شود.

آزمایش تشخیص تب تیفوئید

- در هفته اول بیماری، تست ویدال در ۵۲٪ از بیماران مبتلا به حصبه و در هفته چهارم در ۹۰ تا ۹۵٪ بیماران، این تست مثبت می‌شود.

- اولین بار، آزمایش کلاسیک ویدال در سال ۱۸۹۶ توسط ویدال دانشمند فرانسوی ابداع شد. در این آزمایش از سالمونلا به عنوال آنتی‌ژن استفاده و فقط آنتی‌بادی ضد تاژک اندازه گیری می شد. سپس، فلیکس توانست آنتی‌ژن های سوماتیک که در بیماربزایی آن نقش دارند را در سالمونلاها شناسایی نماید.

- آنتی‌ژن Vi (Virulence-associated Capsular Antigen) نیز یک آنتی‌ژن سطحی پلی ساکاریدی و در اطراف آنتی‌ژن "O" است که در سالمونلا تیفی و پاراتیفی C یافت می‌شود. آنتی‌بادی ضد این آنتی‌ژن دیرتر از آنتی‌بادی های ضد "O" و " H" در خون بیمار یافت شده و به سرعت نیز ناپدید می‌شوند.

-

آزمایش تشخیص تب تیفوئید

- تیتر آگلوتینین "O" به ندرت از ۱:۴۰۰ بالاتر می‌رود و پس از بهبودی در عرض ۳ تا حداکثر ۶ ماه به صفر می رسد، ولی تیتر آگلوتینین "H" از ۱:۱۰۰۰ نیز بالاتر رفته و سال ها پس از بهبودی مثبت می ماند.

- آگلوتینین "Vi" در اواخر هفته دوم و بعد از آگلوتینین"H"در سرم بیمار ظاهر شده و تیتر آن حداکثر از ۱:۲۵ تا ۱:۵۰ بالاتر نمی‌رود و پس از بهبودی سریعا در سرم ناپدید می‌شود.

- در حاملین سالم تیتر آگلوتینین Vi بیش از H و O می‌باشد که با کشت مکرر مدفوع و جدا کردن میکروب می‌توان آنها را شناسایی و درمان کرد.

آزمایش تشخیص تب تیفوئید

- گاهی آگلوتینین های مادری از کلاس IgG که از جفت عبور می‌کنند، سبب مثبت شدن anti-H در سرم نوزادان کمتر از ۶ ماه شود. در صورت مثبت شدن anti-O که ازکلاس IgM است، نوزاد به سالمونلوز مبتلاست و anti-H به تنهایی ارزش ندارد.

- در بعضی از بیماران مبتلا به خودایمنی مانند آرتریت روماتوئید، آزمایش ویدال ممکن است مثبت شود. سالمونلا ها با بعضی از باکتری ها از جمله بروسلاها، پاستورلاها، ویبریون ها و بعضی از انتروباکتریاسه ها، ساختمان آنتی‌ژنی مشترک در قسمت آنتی‌ژن سوماتیک O دارند.

- تست ویدال به دو صورت اسلایدی و لوله ای انجام می‌شود که روش لوله ای بسیار دقیق تر و با ارزش تر است. روش غربالگری روی لام، جهت جدا نمودن نمونه های مثبت به کار می‌رود.

آزمایش تشخیص تب تیفوئید

- آنتی‌ژن های سوماتیک O را با حروف بزرگ A، B، C و D و آنتی‌ژن های فلاژل H را با حروف کوچک a، b، c و d نشان می دهند. برای مثال D و d به ترتیب نشان دهنده آنتی‌ژن های O و H سالمونلا تیفی می‌باشند.
- معمولا در بیماری های حصبه و شبه حصبه اگلوتینین های "O" از روز ۸ و آگلوتینین های "H" از روز ۱۰ تا ۱۲ به تدریج در خون ظاهر می‌شوند.
- در ابتدای بیماری تیتر آگلوتینین "O" بیشتر از "H" می‌باشد، ولی پس از چند روز تیتر آگلوتینین "H" به سرعت بالا رفته و از "O" بیشتر می‌شود.
- حداقل تیتر قابل قبول و با ارزش آگلوتینین ها در آزمایش ویدال در کشورهای مختلف متفاوت است. در ایران اگر تیتر آنتی‌بادی بیمار در برابر آنتی‌ژن سوماتیک "O" حداقل ۱:۸۰ و در برابر آنتی‌ژن فلاژل "H" حداقل ۱:۴۰ باشد، بیمار مشکوک به تب روده ای می‌باشد.

آزمایش تشخیص تب تیفوئید

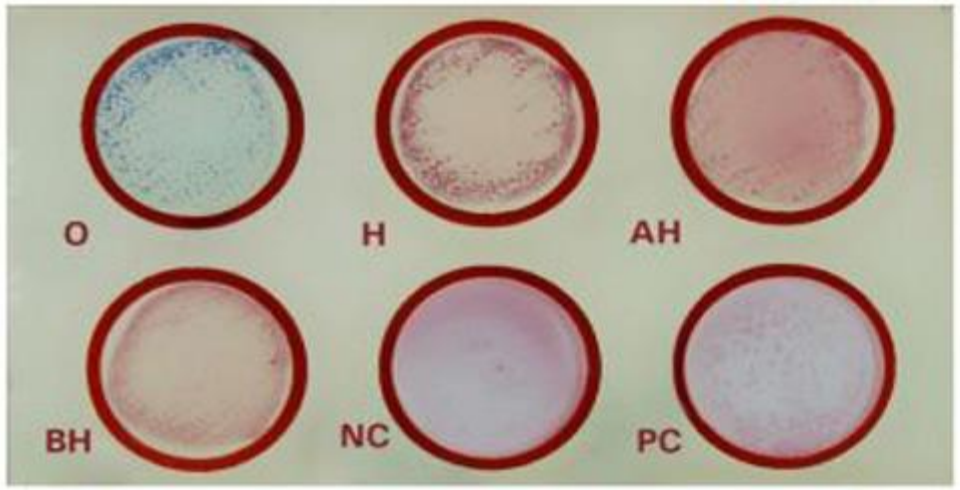
- در صورتی که تیتر آگلوتینین "O" حدود ۱:۱۶۰ و آگلوتینین "H" به میزان۱:۸۰ یا بیشتر باشد، بیمار با توجه به علائم بالینی و وضعیت اپیدمیولوژی به تب روده ای مبتلاست. لازم به ذکر است که تیتر آگلوتیناسیون "H" به تنهایی فاقد ارزش تشخیصی است، در حالی که آگلوتیناسیون قابل قبول "O" می‌تواند دلیل بر بیماری باشد.

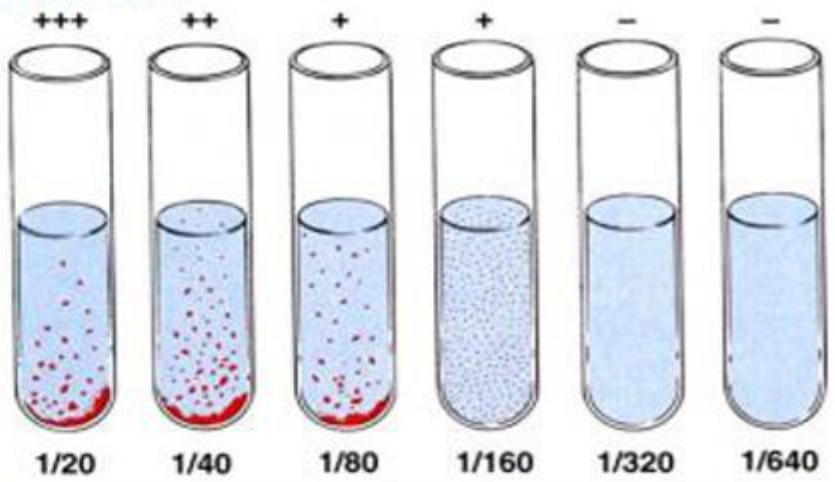
- تیتر آگلوتینین "O" به ندرت از ۱:۴۰۰ بالاتر می‌رود و پس از بهبودی در عرض ۳ تا ۶ ماه به صفر می رسد، ولی تیتر آگلوتینین "H" از ۱:۱۰۰۰ نیز بالاتر رفته و سال ها پس از بهبودی مثبت می ماند.

- آگلوتینین "Vi" در اواخر هفته دوم و بعد از آگلوتینین"H"در سرم بیمار ظاهر شده و تیتر آن حداکثر از ۱:۲۵ تا ۱:۵۰ بالاتر نمی‌رود و پس از بهبودی سریعا در سرم ناپدید می‌شود. در حاملین سالم تیتر آگلوتینین Vi بیش از H و O می‌باشد که با کشت مکرر مدفوع و جدا کردن میکروب می‌توان آنها را شناسایی و درمان کرد.



Widal Test FOR WOMEN





روش انجام آگلوتیناسیون سریع (Rapid Plate Agglutination Test)

- روش غربالگری روی لام، جهت جدا نمودن نمونه های مثبت به کار می‌رود. اگر در روش اسلایدی نمونه ای مثبت کاذب یا منفی کاذب شود، باید آزمایش را با روش لوله ای تکرار نمود تا تیتر دقیق آنتی‌بادی مشخص شود.

۱- در حفره های یک لام شیشه تمیز یک قطره از سرم بیمار ریخته می شود.

۲- یک قطره از آنتی‌ژن مورد نظر به آنها اضافه و توسط اپلیکاتور چوبی بخوبی مخلوط می‌شود.

۳- شاهد آزمایش یک قطره آنتی‌ژن در خانه هفتم است.

۴- لام به آرامی تکان داده می‌شود و آزمایش را بعد از یک دقیقه تفسیر می‌گردد.

تفسیر: ۱۰۰٪ اگلوتیناسیون با علامت (++++)، ۷۵٪ اگلوتیناسیون با علامت (+++)، ۵۰٪ اگلوتیناسیون با علامت (++)، ۲۵٪ اگلوتیناسیون با علامت (+) و اگلوتیناسیون منفی با علامت (-) مشخص می‌شود.

آزمایش تشخیص بیماری سیفلیس

سیفلیس

- سیفلیس یک بیماری مقاربتی است که عامل آن اسپیروکت ترپونما پالیدوم می‌باشد. انسان تنها میزبان طبیعی این باکتری است.
- ترپونما پالیدوم در محیط کشت در آزمایشگاه رشد نمی‌کند و فقط با تزریق به بیضه خرگوش رشد و تکثیر می‌نماید.
- انتقال بیماری، در ۹۰ درصد موارد از راه تماس جنسی می‌باشد، اما میکروب از اپی تلیوم آسیب دیده پوست یا مخاط نیز باعث آلودگی می‌شود.
- این باکتری از ماه چهارم بارداری به بعد از جفت به جنین سرایت و موجب سقط آن می‌شود. در صورتی که جنین در اواخر بارداری یا هنگام زایمان آلوده شود، نوزاد بیمار می‌شود.

آزمایش های سرولوژیک تشخیص بیماری سیفلیس

واکنش ایمنی هومورال در سیفلیس منجر به تولید سه نوع آنتی‌بادی می‌شود:

۱- آنتی‌بادی غیراختصاصی رآژین سیفلیسی

۲- آنتی‌بادی غیراختصاصی ضد میکروب های گروه ترپونما

۳- آنتی‌بادی اختصاصی ضد ترپونما پالیدوم

آنتی‌بادی غیراختصاصی رآژین سیفلیسی

- در بیماران مبتلا به سیفلیس، نوعی آنتی‌بادی تولید می‌شود که به فسفولیپیدهای بسیاری از بافت ها مانند کاردیولیپین قلب گاو متصل می‌شود.
- این آنتی‌بادی، رآژین، آنتی لیپوئیدال یا واسرمن نام دارد و از کلاس IgM و گاهی IgG می‌باشد. این آنتی‌بادی ضد غشا میتوکندری سلول ها می‌باشد که در نتیجه ضایعات بافتی در بیماری های سیستمیک بوجود می‌آید. بنابراین، ممکن است در بیماری های غیر ترپونمایی تولید شود.
- دو آزمایش VDRL (Veneral Disease Research Laboratory) و RPR (Rapid Plasma Reagin) در تشخیص آنتی‌بادی های رآژینی و غربالگری کاربرد دارند.
- در این تست ها، آنتی‌بادی غیراختصاصی رآژین که در مقابل چربی های ناشی از تخریب سلول ها در مرحله اول بیماری ایجاد می‌شود، بررسی می‌گردد. آنتی‌ژن مورد استفاده جهت تشخیص این آنتی‌بادی، کاردیولیپین مشتق از قلب گاو می‌باشد.

آنتی‌بادی غیراختصاصی رآژین سیفلیسی

- اساس تست VDRL، فلوکولاسیون آنتی‌ژن کاردیولیپین توسط آنتی‌بادی های سرم بیمار است. در این تست، سرم بیمار به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶°C جهت غیرفعال نمودن کمپلمان قرار می‌گیرد.

- ولی در تست RPR نیاز به غیرفعال نمودن کمپلمان نبوده و در این تست، ذرات زغال به آنتی‌ژن متصل می‌باشند که واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی با چشم غیرمسلح بر روی لام زمینه سفید قابل مشاهده است.

- آزمایش های سرولوژی در بیماری های غیر ترپونمایی نیز بطور کاذب مثبت می‌شوند که به آن مثبت کاذب بیولوژیک (BFP: Biological False Positive) گفته می‌شود و فقط در یافتن بیماران مشکوک به سیفلیس ارزش دارند.

آنتی‌بادی غیراختصاصی رآژین سیفلیسی

مثبت های کاذب بیولوژیک دو گروه هستند:

۱- حاد یا موقتی: بیماری ها و مواردی مانند عونت های تب دار، واکسیناسیون، حاملگی، مصرف داروهای بیهوشی و خون بند ناف نوزاد که آزمایش تشخیص آنتی‌بادی رآژین به مدت کوتاه در آنها مثبت می‌شود.

۲- مزمن یا طولانی: بیماری هایی که بیش از شش ماه آزمایش های رآژینی در آنها مثبت می ماند. این موارد در زنان بیشتر از مردان و در بیماری های خودایمن، بیماری های عفونی مزمن و سرطان ها مثبت می‌شود.

در بیماری های SLE، آنمی همولیتیک، تیروئیدیت، تب روماتیسمی و RA آزمایش تشخیص آنتی‌بادی رآژین ممکن است مثبت شود. گاهی قبل از ظهور علائم بالینی بیماری های خودایمن این آزمایش ها مثبت می‌شوند.

در بیماری های کلاژن عروقی، سارکوئیدوز، پری آرتریت نودوزا، جذام توبرکولوئیدی، مالاریا، سل، سرطان ها مانند بیماری هوچکین، آنتی‌بادی رآژین به طور مزمن مثبت می‌شود.

آنتی‌بادی غیراختصاصی ضد میکروب های گروه ترپونما

- این آنتی‌بادی ها از کلاس IgG هستند و ضد آنتی‌ژن های مشترک ترپونما پالیدوم و ترپونماهای غیر بیماریزا تولید می‌شوند.
- این آنتی‌بادی توسط آزمایش Kolmer یا ثبوت مکمل پروتئین رایتر (RPCFT: Reiter Protein Complement Fixation Test) شناسایی می‌شوند.
- در این آزمایش، سوش رایتر که در محیط های مصنوعی کشت داده می‌شود به عنوان آنتی‌ژن بکار برده می‌شود.
- این آزمایش برای تشخیص سیفلیس اختصاصی نمی‌باشد ولی منفی بودن آن ارزش دارد. آزمایش کلمر در ۱٪ افراد سالم مثبت می‌شود.

آنتی‌بادی اختصاصی یا بی حرکت کننده ضد ترپونما پالیدوم

- این آنتی‌بادی از کلاس IgG و فقط ضد ترپونما پالیدوم است. در آزمایش TPI (Treponema pallidum Immobilizion Test) سوش Nicholas ترپونما پالیدوم زنده در مجاورت سرم بیمار و کمپلمان قرار می‌گیرد.
- اگر سرم بیمار دارای آنتی‌بادی اختصاصی ضد ترپونما پالیدوم باشد در مجاورت کمپلمان میکروب را بی حرکت می‌کند که توسط میکروسکوپ زمینه تاریک بررسی می‌شود.
- آزمایش های FTA-ABS (Fluorescent treponemal antibody absorption)، T pallidum immune adherence assay، Microhemagglutination و ELISA نیز جهت تشخیص این آنتی‌بادی ها کاربرد دارند.
- آزمایش FTA-ABS از سایر آزمایش ها متداول تر است. این آزمایش در بیماری های لوپوس اریتماتوز سیستمیک، دیگر بیماری های ترپونمایی مانند Yaws، Pinta و Bejal یا در اثر دارو مثبت می‌شود.

علائم بالینی بیماری سیفلیس

- **مرحله اولیه:** دوره نهفتگی بیماری ۱۰ تا ۹۰ روز است. در محل ورود میکروب یک زخم به نام شانکر سفت ایجاد می‌شود. غدد لنفاوی نزدیک شانکر بدلیل مهاجرت ترپونما متورم، بزرگ و سفت می‌شوند (خیارک یا Bubo). این زخم ها پس از ۱ تا ۵ هفته خودبخود بهبود می یابند.

- **مرحله ثانویه:** ۶ هفته تا ۶ ماه پس از ورود میکروب به بدن شروع و ممکن است تا چند سال ادامه یابد. در این مرحله بثورات پوستی و مخاطی، بی اشتهایی، تب، پلی آدنوپاتی، آلوپسی و لکه های مخاط دهان مشاهده می‌شود. پس از کاهش علائم، مدتی طول می کشد تا مرحله سوم آغاز شود (سیفلیس نهفته). در این مرحله، هیچ علامت بالینی مشاهده نمی‌شود و ممکن است ۱ تا ۴۰ سال طول بکشد.

- **مرحله سوم:** حدود ۲ تا ۳۰ سال بعد از ورود ترپونما در یک سوم از بیماران مبتلا به سیفلیس رخ می‌دهد. این بیماران به نوروسیفلیس، ضایعات قلبی- عروقی و تومور Gumma (در اثر واکنش های ایمنی سلولی در برابر ترپونما در مغز، کبد، استخوان و پوست بروز می‌نماید) مبتلا می‌شوند. در این مرحله بیماری مسری نیست.

- **در تمامی مراحل عفونت از مادر به جنین منتقل می‌شود.**

آزمایش های مورد استفاده جهت تشخیص سیفلیس اولیه

- **تشخیص سیفلیس اولیه:** در ابتدای بیماری که واکنش های سرولوژی هنوز منفی می‌باشد، بهترین روش، نمونه برداری مستقیم از ترشحات شانکر و جستجوی باکتری با میکروسکوپ زمینه تاریک (Darkfield) است. همچنین، می‌توان نمونه های مشکوک را توسط آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی ضد ترپونما پالیدوم نشاندار با مواد فلورسانس مانند FITC رنگ آمیزی و توسط میکروسکوپ ایمونوفلورسنت بررسی نمود. این روش اختصاصی به روش میکروسکوپ زمینه تاریک برتری دارد.

- در این مرحله، آزمایش FTA-ABS زودتر از VDRL مثبت می‌شود. اگر آزمایش سرولوژی در این مرحله منفی شود باید جهت تشخیص قطعی، چند هفته بعد تکرار شود. آزمایش سرولوژی حدود ۱ تا ۳ هفته از ظهور شانکر، مثبت شده و تا درمان کامل و مدتی پس از آن مثبت می مانند. در ۴ هفته اول بیماری تیتر آنتی‌بادی رآژین بسرعت افزایش می‌یابد و حدود ۶ ماه ثابت می ماند.

آزمایش های مورد استفاده جهت تشخیص سیفلیس ثانویه و مرحله سوم

- **تشخیص سیفلیس ثانویه:** در این مرحله آسپیراسیون غدد لنفاوی متورم یا نمونه برداری از زخم های مرطوب انجام و توسط میکروسکوپ زمینه تاریک بررسی می‌شود. در ۹۹٪ موارد تست های سرولوژی مثبت هستند. ممکن است در این مرحله بدلیل بالا بودن مقدار آنتی‌بادی در سرم، پدیده منطقه ای پروزون رخ دهد و آزمایش منفی کاذب شود. در سیفلیس نهفته، ممکن است آزمایش های سرولوژی تطابق نداشته باشند.

- **تشخیص سیفلیس مرحله سوم:** بهترین آزمایش در این مرحله FTA-ABSمی‌باشد. در این مرحله از مایع نخاعی آزمایش کمی VDRL انجام می‌شود. آزمایش تشخیص آنتی‌بادی رآژینی در این مرحله بیماری به طور کاذب منفی می‌گردد.

آزمایش های مورد استفاده جهت تشخیص سیفلیس مادرزادی

- سیفلیس مادرزادی در نتیجه عبور ترپونما پالیدوم از خون مادر از طریق جفت و عروق بند ناف به جنین اتفاق می افتد.اگر فاصله ابتلای مادر و بارداری نزدیک بهم باشد، احتمال سالم ماندن نوزاد بسیار کم است.

- در صورت ابتلای مادر در اواخر بارداری، نوزاد سالم خواهد بود. اگر مادر بیش از ۴ سال مبتلا باشد و درمان نشده باشد، نوزاد احتمالا سالم بدنیا می‌آید. درمان مناسب مادر در ۱۸ هفته اول بارداری، مانع ابتلای جنین می‌شود، زیرا باکتری تا هفته ۱۹ بارداری قادر به عبور از جفت نیست.

- علائم بالینی سیفلیس مادرزادی کراتیت، التهاب قرنیه، تغییر شکل استخوان های صورت و اندام ها، کری عصبی، اختلالات دندانی و ضایعات مراکز عصبی بصورت گوم یا فیبروز التهابی می‌باشد.

- در صورت وجود ضایعه در نوزاد، آسان ترین روش، مشاهده نمونه با میکروسکوپ زمینه تاریک است. در صورت عدم وجود ضایعه، آزمایش VDRL انجام می‌شود. بهترین روش تشخیص بیماری FTA-ABS می‌باشد. در برخی از نوزادان مبتلا به سیفلیس مادرزادی، علاو بر IgM ضد ترپونما پالیدوم، فاکتور روماتوئید از کلاس IgM نیز وجود دارد.

اساس تست RPR

- آنتی‌ژن RPR یک سوسپانسیون حاوی کاردیولیپین، کلسترول، لستین و ذرات بسیار ریز زغال است. این آنتی‌ژن توسط آنتی‌بادی ضد لیپیدی به نام آنتی‌بادی رآژینی یا واسرمن شناسایی می‌شود.

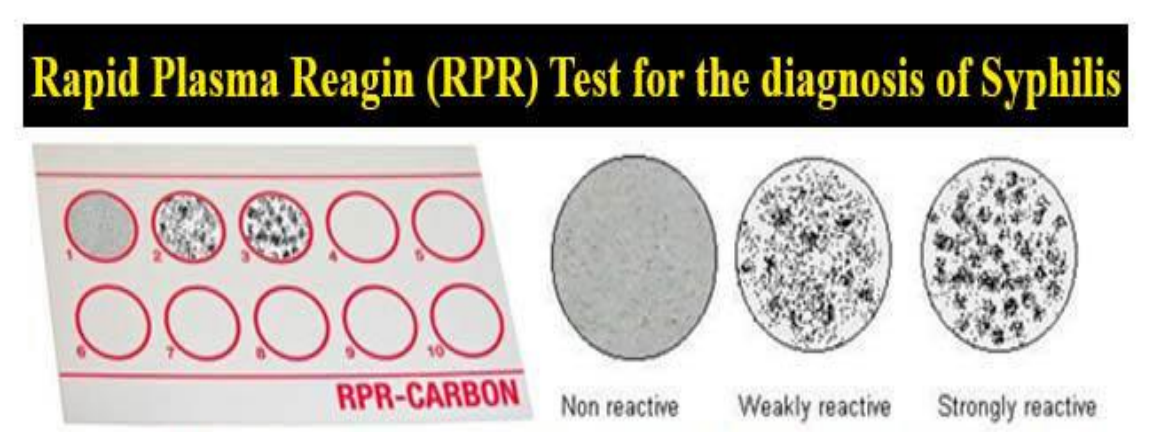
- رآژین در بیماران سیفلیسی و گاهی در سرم بیماران مبتلا به دیگر بیماری های حاد یا مزمن یافت می‌شود. اگر نمونه ای حاوی رآژین باشد، فلوکولاسیون آنتی‌ژن رخ می‌دهد و کلامپ های سیاه به اندازه های مختلف بر مبنای میزان آنتی‌ژن بوجود می‌آید.

- در نمونه فاقد رآژین واکنشی پدید نمی‌آید و سوسپانسیون یکنواخت خاکستری رنگ می ماند. ویال حاوی آنتی‌ژن را قبل از مصرف به آرامی تکان داده می‌شود.

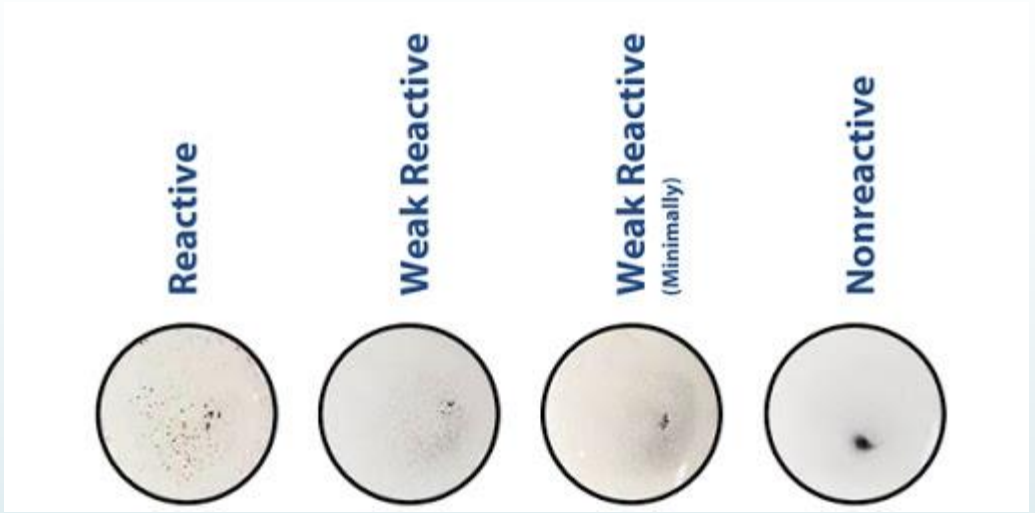
مراحل انجام آزمایش به روش کیفی

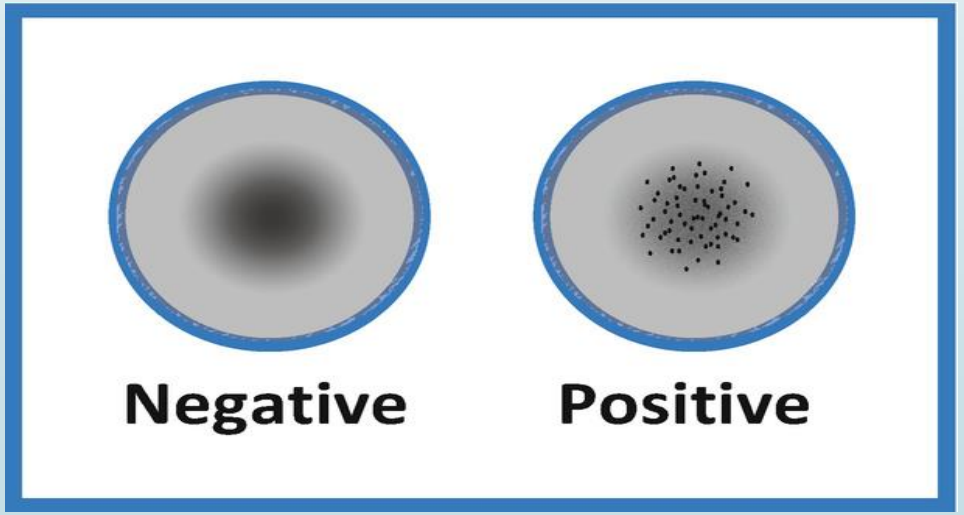
نمونه ها باید از بیمار در حالت ناشتا گرفته شود. سرم های لیپمیک ممکن است واکنش کاذب نشان دهند. با نمونه دارای همولیز، آلودگی یا شیری و کدر آزمایش انجام نمی‌شود. می‌توان سرم را ۳۰ دقیقه در ۵۶°C قرار داد. نمونه را می‌توان تا ۴۸ ساعت در ۸°C-۲ نگهداری کرد.

۱- سوسپانسیون آنتی‌ژن RPR و کنترل ها به دمای اتاق رساند می‌شود. قبل از انجام آزمایش، بهتر است ابتدا آنتی‌ژن با کنترل های مثبت و منفی آزمایش شود.
۲- یک قطره از نمونه در یک خانه اسلاید زمینه سفید قرار داده می‌شود.
۳- ویال حاوی آنتی‌ژن RPR به آرامی تکان داده می‌شود و یک قطره از آن به سرم اضافه و مخلوط می‌شود.




TC
RPR REAGENT SET
CONTENTS
CAT NO RPR-100
SIZE 100 TESTS
MFG FOR: TECO DIAGNOSTICS
RPR CARD TEST
18 mm CIRCLE
LAB NO
NO DE LAB
1
2
3
4
5
10
JANUARY 1997


Reactive
Weak Reactive
Weak Reactive
(Minimally)
Nonreactive


Negative
Positive

تفسیر تست RPR

۱- فعال یا مثبت (Reactive): بصورت کلامپ های واضح سیاه رنگ که به درجه های مختلف از ضعیف، متوسط تا شدید دیده می‌شود.

۲-غیر فعال یا منفی (NotReactive): در سطح اسلاید سوسپانسیون خاکستری یکنواخت دیده می‌شود.

۳- هر نوع فلوکولاسیون خفیف اما مشخص نیز باید به عنوان فعال یا مثبت گزارش شود.

۴- نتایج مثبت می‌تواند دلیلی بر عفونت فعلی یا گذشته با ترپونمای پاتوژن باشد.

۵- نتایج منفی همراه با عدم وجود علائم بالینی سیفلیس، ممکن است دلیلی بر عفونت درمان شده یا عدم وجود عفونت باشد.

تفسیر نتیجه منفی آزمایش تشخیص آنتی‌بادی رآژین سیفلیسی

۱- فرد به سیفلیس مبتلا نمی‌باشد.

۲- در ابتدای بیماری، تیتر آنتی‌بادی پایین و غیر قابل تشخیص می‌باشد.

۳- در نتیجه معالجه ناقص یا علل دیگر، آزمایش بطور موقت منفی شده است.

۴- بیمار در مرحله نهفته یا غیرفعال است.

۵- بیمار مبتلا به سیفلیس است اما بدلیل کمبود یا نقص ایمنی قادر به تولید آنتی‌بادی نمی‌باشد.

۶- به علت خطای آزمایشگاه یا آنتی‌ژن فاسد و ... آزمایش منفی شده است.

تفسیر نتیجه مثبت ضعیف آزمایش تشخیص آنتی‌بادی رآژین سیفلیسی

۱- در ابتدای بیماری و عفونت می‌باشد.

۲- بعد از درمان است.

۳- مثبت کاذب بیولوژیکی می‌باشد.

۴- به علت خطای آزمایشگاه یا آنتی‌ژن فاسد و ... آزمایش مثبت ضعیف شده است.

تفسیر نتیجه مثبت آزمایش تشخیص آنتی‌بادی رآژین سیفلیسی

۱- بیماری مبتلا به سیفلیس می‌باشد.
۲- مثبت کاذب بیولوژیکی می‌باشد.
۳- به علت خطای آزمایشگاه است.

تست منفی یا غیر فعال RPR، عفونت نهفته سیفلیس را رد نمی‌کند. نتایج منفی ممکن است در مرحله ابتدایی سیفلیس اولیه، سیفلیس ثانویه به علت پدیده پروزون و در بعضی موارد سیفلیس تاخیری مشاهده گردد.

نتایج مثبت تست RPR جهت تایید وجود بیماری سیفلیس باید با یک تست ترپونمال نیز تایید شوند، مگر بیمارانی که علائم و نشانه های تشخیصی بیماری سیفلیس را دارا هستند.