

### آزمایش ایمونوفلوئورسانس با خون خشک شده در توکسوپلاسموز (x)

دکتر غلامرضا نظری - دکتر بهروز نیک بین

با همکاری فنی نسرین شفیق زاده

خون و سرم از شهرستانها به تهران اشکال فراوان دارد با این جهت پزشکان ناچار بعضی بیماران خود را روانه تهران میکنند و بیماران دیگر همچنان بدون تشخیص میمانند .

علاوه بر آن در مورد اجرای برنامه های بیماریابی و پژوهشهای اپیدمیولوژیک توکسوپلاسموز چون گرفتن خون از تمام اهالی با سرنگ و جدا کردن سرم و ارسال آن به تهران جهت آزمایش غیر ممکن میباشد از این رو در باره استفاده از آزمایش ایمونوفلوئورسانس با خون خشک شده در توکسوپلاسموز به تحقیق پرداختیم و نتایج بسیار جالب و عملی آنرا در این مقاله ذکر میکنیم .

برای انجام این بررسی بیمارانی را که بمرکز تحقیقات ایمونوفلوئورسانس مراجعه میکردند و پس از انجام آزمایش ثابت میشد مبتلا به توکسوپلاسموز هستند مجددا بطرز زیر مورد آزمایش قرار میدادیم :

- ۱ - با سرنگ از ورید آنها خون میگرفتیم و سرم را جدا نموده و در چهار لوله ریخته و در یخچال در (۲۰-) قرار میدادیم .
- ۲ - واکسینواستیل را در انگشت بیمار فرو کرده و چند قطره خون بر روی کاغذ شلایشرشول ۵۸۷ ( رندل بقطر ۱۵ میلی متر ) با دو روش زیر میگرفتیم ( چهار رندل برای هر بیمار )  
الف - با پیپت های بسیار باریک دقیقا ۰.۳٪ یا ۰.۵ میلی لیتر

از سال ۱۳۴۵ که مرکز تحقیقات ایمونوفلوئورسانس در این گروه تاسیس گردید تا کنون پژوهشهای وسیعی باروش ایمونوفلوئورسانس در تریپونما توز ، توکسوپلاسموز ، بروسلوز ، بیماریهای اتوایمن ، بیلازیوز ، جذام ، وبا ، تعیین گروه Rh , Abo جنین با سلولهای آنتیجوس بگمل آوردیم در نتیجه ۱۲ پایان نامه نوشته شد و پنج مقاله ( ۴-۵-۶-۷-۸ ) بچاپ رسید و نتایج قسمتی از - پژوهشهای مزبور در سه کنفره ( ۳ و ۲ و ۱ ) مطرح گردید . اینک قسمتی از تحقیقات در توکسوپلاسموز را بر روی خون خشک شده شرح میدهیم :

در سالهای اخیر با انجام روش ایمونوفلوئورسانس و بررسیهای وسیع در این مرکز ثابت شد که توکسوپلاسموز نه فقط در ایران وجود دارد بلکه فوراً آن مایه شگفتی است . شکل حاد آن بویژه آدنویاتی اغلب چنان باعث اشتباه در تشخیص کلینیکی میگردد که بیماران وحشت زده از بیماریهای بدخیم و نا امید از زندگی باین مرکز مراجعه میکنند و وقتی با انجام آزمایش ثابت میشود مبتلا به توکسوپلاسموز هستند با خوشحالی بزندگی خود بر میگرددند از بررسی شرح حال بیماران و محل سکونت آنها بر ما مسلم شد که این بیماری در سطح کشور فراوان است ولی چون ارسال

وزن میکنیم دیگر احتیاج بذرات خون خشک شده که در داخل کیسه پلاستیک ریخته است نمیباشد .

در هر دو حالت فوق لوله محتوی آب نمک و رندل را مدت ۲۴ ساعت در یخچال ( ۴ درجه) قرار میدادیم و سپس محلول فوق را که  $\frac{1}{400}$  میباشد برای آزمایش بکار میبردیم .

برای انجام آزمایش با سرم یک لوله سرم را که در یخچال (۲۰-) قرار داده بودیم بنسبت  $\frac{1}{400}$  آب نمک تا میونه رقیق میکردیم با این دو محلول یعنی در یک ردیف سرم  $\frac{1}{400}$  و در یک ردیف دیگر محلول  $\frac{1}{400}$  خون رندل را به نسبت های زیر رقیق میکردیم ....  $\frac{1}{3200}$   $\frac{1}{1600}$   $\frac{1}{800}$   $\frac{1}{400}$  و یا هر یک از محلولهای مزبور آزمایش ایمنوفلوئورسانسین بروش غیر مستقیم (ساندویچ) با آنتی گلبولین فلورسان بعمل میآوردیم - آنتی ژن توکسوپلاسم زنده سوش<sup>RH</sup> میباشد که داخل صفاق سوری تزریق کرده و ۴۸ ساعت بعد از ترشحات پریتونیت - توکسوپلاسمیک یونکسیون نموده و بر روی لام گسترش میدهیم لامها را با حرارت و یا استن فیکسه کرده جهت آزمایش بکار میبریم .

- برای تحقیق در روشهای فوق از بیمارانی که بتیترهای مختلف داشتند (از  $\frac{1}{800}$  تا  $\frac{1}{12800}$ ) ۴ لوله سرم و ۴ رندل خون خشک شده تهیه میگردیم . در موقع آزمایش هر بار یک لوله سرم را از یخچال (۲۰-) و یک رندل از کیسه پلاستیکی خارج کرده و محلولها را آماده میکردیم و آزمایش ایمنوفلوئورسانسین بر روی آنها بموازات هم انجام میدادیم چند هفته یا چند ماه بعد لولههای دیگر و رندلهای دیگر را مورد آزمایش قرار میدادیم بقسمیکه بعضی از رندلها و سرمها را تا ۲۴۶ روز بعد مورد آزمایش قرار دادیم .

از بررسی روشهای فوق نتایج جالب زیر بدست آمد . اینک محصن نمونه آزمایش مربوط به پنج بیمار را در جدول زیر شرح داده و سپس نتایج نهائی را ذکر مینمائیم .

دو بیمار  $\frac{1}{12800}$  یک بیمار  $\frac{1}{6400}$  یک بیمار  $\frac{1}{3200}$  و یک بیمار  $\frac{1}{800}$  مثبت بوده است .

ارقامی که در جدول بکار رفته است از این قرار است .

++++ = ۴                      ++ = ۲  
+++ = ۳                        + = ۱

○ = منفی

خون گرفته و رندل را بآن آغشته میگردیم .  
در این روش احتیاج بدانستن وزن رندل نیست .

ب - در این روش رندل را قبلا وزن میگردیم و سپس مستقیما آنرا بخون انگشت بیمار آغشته میگردیم .

- در هر دو صورت در وسط رندل سنجاقی فرو میگردیم و رندل را نیم ساعت در مقابل هوا قرار میدادیم تا کاملا خشک شود سپس سنجاق را از رندل جدا کرده و رندل را داخل کیسه کوچک پلاستیکی قرار میدادیم و بر روی آن نام بیمار و تاریخ گرفتن خون را مینوشتیم . آنوقت آنرا در هوای آزاد حتی در تابستان در ۴۲ ولی دور از آفتاب میگذاشتیم .

- برای انجام آزمایش با خون خشک شده لازم بود آنرا در آب نمک تا میونه قرار دهیم . قبلا مطالعات وسیعی ( با خون تازه روی رندل ) و ( خون خشک شده روی رندل ) بعمل آوردیم . وجداولی تهیه کردیم بقسمیکه از روی آن تعیین میشود با خون هر رندل چه مقدار آب نمک تا میونه باید بکار برد تا محلول اولیه  $\frac{1}{400}$  بدست آید .

مثلا برای رندل بوزن ۱۱/۵ میلی گرم که ۳۰ میلی گرم خون تازه جذب میکند و خون خشک آن ۲/۵ میلی گرم میشود مقدار آب نمک تا میونه  $\frac{3}{30}$  میلی لیتر باید باشد تا محلول  $\frac{1}{400}$  سرم بدست بدهد .

- اگر رندلی بکار میبردیم که خون را با پیپت دقیق گرفته بودیم چون مقدار خون دقیقا معلوم بود آب نمک تا میونه لازم را طبق جدول در لوله ریخته و رندل را در آن میگذاشتیم و در اینجا یادآور میشویم که اگر این رندل مدت طولانی بعد از گرفتن خون مورد آزمایش قرار گیرد چون خون خشک شده ممکن است از روی آن بداخل پاکت پلاستیکی بریزد در موقع انجام آزمایش تمام ذرات خون خشک داخل پلاستیک راهم باید در لوله محتوی آب نمک تا میونه ریخت تا محلول صحیح بدست آید .  
- اگر رندلی بکار میبردیم که خون را با پیپت نگرفته و در نتیجه مقدار خون نامعلوم بود چون قبلا وزن رندل را میدانستیم وزن رندل با خون خشک شده را با ترازوی دقیق تعیین میگردیم و در نتیجه اختلاف وزن مربوط بمقدار خون بوده است با معلوم کردن وزن خون رندل را در لوله محتوی آب نمک بمقداریکه در جدول تعیین شده بود میگذاشتیم .

اینجا یادآور میشویم چون رندل با خون خشک شده را

از (++) = ۲ ببالا را مثبت محسوب می‌داریم .

در ستون دوم دست چپ جدول مقصود از ( روز ) یعنی تعداد روزهای پس از خونگیری که آزمایش انجام گرفته‌است .

نام	روز	ایمنوفلوئورسانس با سرم برقتهای زیر								ایمنوفلوئورسانس باخون خشک شده بررندل برقتهای زیر							
م - ا	۲	۴	۴	۴	۴	۳	۲	۲	۴	۴	۴	۳	۳	۲	۲		
	۳۰	۴	۴	۴	۴	۳	۲	۲	۴	۴	۴	۳	۲	۲	۲		
	۷۴	۴	۴	۴	۳	۲	۲	۲	۴	۴	۳	۳	۲	۲	۲		
	۱۵۰	۴	۳	۳	۲	۲	۰	۰	۴	۴	۳	۲	۱	۰	۰		
ن - ق	۲	۴	۴	۴	۳	۳	۳	۲	۴	۴	۴	۳	۳	۲	۲		
	۳۸	۴	۴	۳	۳	۳	۲	۲	۴	۴	۴	۴	۳	۲	۲		
	۷۹	۴	۴	۳	۳	۳	۲	۲	۴	۴	۴	۳	۳	۲	۲		
س - ع	۲	۴	۴	۴	۳	۳	۲	۱	۴	۴	۴	۴	۳	۲	۰		
	۳۷	۴	۴	۴	۴	۳	۲	۰	۴	۴	۴	۴	۳	۲	۰		
	۱۴۴	۴	۴	۴	۴	۳	۱	۰	۴	۴	۴	۳	۱	۰	۰		
	۲۳۸	۳	۳	۳	۲	۱	۰	۰	۳	۳	۲	۱	۰	۰	۰		
م - ب	۲	۴	۴	۴	۴	۳	۱	۰	۴	۴	۴	۳	۳	۱	۰		
	۳۷	۴	۴	۴	۴	۳	۲	۰	۴	۴	۴	۴	۳	۲	۰		
	۱۴۴	۴	۴	۴	۴	۳	۱	۰	۴	۴	۴	۳	۱	۰	۰		
	۲۳۸	۳	۳	۳	۲	۱	۰	۰	۳	۳	۲	۲	۱	۰	۰		
م - ج	۵	۴	۴	۴	۴	۳	۱	۰	۴	۴	۴	۳	۳	۱	۰		
	۳۵	۴	۴	۴	۴	۳	۰	۰	۴	۴	۳	۲	۲	۰	۰		
	۷۶	۴	۴	۴	۳	۳	۰	۰	۴	۳	۲	۲	۲	۰	۰		
	۲۴۶	۳	۳	۳	۲	۰	۰	۰	۳	۲	۰	۰	۰	۰	۰		
ش - ق	۳	۴	۳	۳	۰	۰	۰	۰	۴	۳	۲	۰	۰	۰	۰		
	۳۸	۴	۳	۳	۰	۰	۰	۰	۴	۳	۲	۰	۰	۰	۰		
	۷۹	۳	۲	۲	۰	۰	۰	۰	۳	۲	۲	۰	۰	۰	۰		

از بررسی نتایج آزمایشها و مقایسه روشهای فوق نتیجه میگیریم تا ۸۰ روز تیترا سرم در یخچال و خون خشک شده بر روی رندل در هوای آزاد مانند روزهای اول بوده و بهیچوجه تغییری در آنها دیده نمیشود. بعد از این مدت ممکن است تیترا کمی پائین بیاید مثلاً پس از ۱۴۴ روز در سرم یک لوله و در خون خشک شده دو لوله کمتر میشود.

ولی از ۱۵۰ روز به بعد تیترا در سرم و خون خشک شده باز بیشتر پائین میآید البته در سرم کمتر و در خون خشک شده بیشتر. بقسمیکه پس از ۲۴۶ روز پائین آمدن تیترا مخصوصاً در رندل خیلی شدید میگردد. معذالک  $\frac{1}{400}$  مثبت باقی میماند. چون رقم قابل قبول برای تشخیص توکسوپلاسموز  $\frac{1}{400}$  میباشد و هشت ماه پس از گرفتن خون بر روی رندل آزمایش با خون خشک شده هنوز تا این رقم مثبت نشان میدهد. اینجهت برای بیماریابی میتوان تا هشت ماه بعد رندل را بکار برد.

ولی چون تیترا تا ۸۰ روز بدون تغییر است و تا ۱۴۶ روز کمی پائین میآید بنابراین استفاده از خون خشک شده تا حدود چهار ماه برای آزمایش کانتیتاتیو و تعیین تیترا جهت تعقیب سیر بیماری و درمان بیماران کاملاً عملی است. با توجه به مطالب فوق واضح میگردد که خون خشک شده بر روی رندل را با موسیله (شخصی یا پست) میتوان به آزمایشگاه فرستاد و تا (چهار ماه) از لحاظ بررسی درمان و تا (۸ ماه)

از لحاظ تشخیص بیماری از آن استفاده نمود. در خاتمه آزمایش باهریک از روشهای خونگیری فوق را بطرز زیر پیشنهاد میکنیم:

۱- بیمارانیکه با آزمایشگاه مجهز بسوائل آزمایش ایمونوفلوئورسانس مراجعه میکنند باید خون را از ورید آنها گرفته و سرم را جدا کرده آزمایش نمود.

۲- در نوزادان و بیماران چاق که گرفتن خون باندازه کافی از ورید آنها اشکال دارد یا در کودکانیکه از دادن خون از ورید امتناع مینمایند باید خون را از سرانگشت با پیپت دقیق گرفت و رندل را بآن آغشته نمود. در اینصورت چون آزمایش در مدت کوتاهی پس از خون گرفتن انجام میگردد احتیاج بدقت مخصوص نیست ولی اگر پس از مدت طولانی آزمایش نمایند باید دقت کرد که ذرات خون خشک را که از رندل بداخل کیسه پلاستیک ریخته در لوله محتوی رندل و آب نمک تا میونه وارد کرد و بعد آزمایش نمود.

۳- برای بیماریابی در سطح کشور باید خون را بر روی رندل وزن شده (بدون پیپت) گرفت زیرا گرفتن خون با پیپت های دقیق بعلت زیاد بودن تعداد مراجعین و عدم دقت در شرایط خونگیری در دهات عملی نیست.

- از شهرستانها همکاران محترم برای استفاده از این روش میتوانند با مرکز تحقیقات ایمونوفلوئورسانس این گروه ارتباط برقرار نمایند تا ترتیب ارسال رندل داده شود.

#### References:

- 1- NAZARI G.R. Expose au 8 eme cong. Int. de Medicine tropica le et paludisme 1071-1968.
- 2- NAZARI, G.R. RAFII, CH. - NIKBINE, B. Ninth Int. Cong. on tropical Medicine and Malaria, 259 - 1973, Athens.
- 3- NAZARI. G.R. - ARAMECHE. B. The Middle East Dermatological Association, First Conference, 45-1974, Cairo.
- 4- NAZARI, G.R. - VAEZADE F. - W.H.O./VDT. 364 - 1369

- ۵- دکتر غلامرضا نظری - مجله طب عمومی سال ششم اسفند ۱۳۴۵ صفحات ۱۳۸-۱۴۷
- ۶- دکتر غلامرضا نظری - و همکاران مجله طب عمومی سال هشتم شماره دوم - ۱۳۴۷ ۶۷ - ۷۴ "
- ۷- دکتر غلامرضا نظری - دکتر بزرگ آرامش و همکاران مجله طب عمومی سال هشتم شماره سوم - ۱۳۴۷ ۱۳۸-۱۴۱ "
- ۸- دکتر غلامرضا نظری - دکتر روح اله پاکروان و همکاران مجله طب عمومی سال هشتم شماره چهارم - ۱۳۴۸ ۲۱۳-۲۱۵ "
- ۹- دکتر غلامرضا نظری - دکتر شهناز رفیعی مجله دانشکده پزشکی تهران سال سی ام شماره هشتم ۲۴۹-۲۵۶ "