

# نامه دانشکده پزشکی تهران

شماره دهم از سال بیست و یکم تیر ماه ۱۳۴۳

از کارهای بخش گوش و گلو و بینی بیمارستان امیراعلم

## یک مورد امپرفوراسیون کوآنال در ایران

پرفسور جمشید اعلم (\*\*)

دکتر مقصودی (\*\*\*)

امپرفوراسیون کوآنال یا بسته بودن سوراخ خلفی بینی بیماری فوق العاده نادری است که در کشور ما شاید این اولین باری است که مشاهده شده است. طبق آماری که در بیمارستان تروسو (۱) منتشر شده است در آن بیمارستان تاکنون جمعا ۲۷ مورد از این بیماری مشاهده شده است که ۱۸ مورد آن یک طرفی ( ۱۴ مورد طرف راست و ۴ مورد طرف چپ ) و ۹ مورد دوطرفی بوده است و در جنس مؤنث دوبرار بیش از جنس مذکر دیده شده است.

امپرفوراسیونهای یک طرفی دوبرار بیش از امپرفوراسیونهای دوطرفی است و همچنین امپرفوراسیونهای یک طرفی اغلب در طرف راست مشاهده میشوند تا طرف چپ. علل امپرفوراسیون کوآنال نامعلوم اند و اغلب همراه با ناهنجاریهای دیگر دیده میشوند.

در کلینیک این بیماری به کیفیات مختلفی مشاهده میشود که بطور شماتیک دو حالت زیر در آن شرح داده میشود.

۱- بسته بودن دوطرفی سوراخهای بینی در نزد نوزادان در روزهای اول زندگی تنفس نوزادان از راه دهان فوق العاده مشکل بوده بنابراین بسته بودن سوراخ خلفی بینی آنهم در هر دو طرف با یک زحمت فوق العاده زیادی همراه خواهد بود.

- تنگی نفس همراه با نیراژ عضلات گردنی که کاملا اختصاصی است.  
- بازدم نوزاد مشکل میگردد که در اینحال نوزاد گونه هایش را باد میکند.

— ریتم تنفسی نامرتب همراه با مکت و تند غیر مؤثر که بچه سیانوزه و مضطرب میشود و مرتب گریه میکند این وضع تا عادت بچه به تنفس از راه دهانی ادامه پیدا میکند .

— دیسفاژی که بزودی بچه را لاغر میکند .

— درمعاینه بینی — پره‌های بینی بیحرکت‌اند و درسوراخهای بینی مخصوصا درمجاور دهلیز ترشح مخاطی چسبنده مشاهده میشود .

— درآزمایش با آئینه گلاتزل لکه‌های بخاری دیده نمیشود که دلیل بر بسته بودن سوراخ خلفی بینی است و هوای بازدمی بهیچوجه داخل سوراخهای بینی نمیشود .

چون زندگی بچه دائما درخطر است پس از تشخیص قطعی فوری باید اقدام بعمل کرد زیرا برونکوپنومونی و سیانوز و حوادث سنکویی پدیده‌هائی هستند که سبب مرگ بچه خواهند شد باوجود این مقاومت و عادت در نزد شیرخوران بینهایت زیاد است .

۲ — بسته بودن يك طرفی سوراخهای خلفی بینی در نزد کودکان و بزرگسالان  
علائم آن عبارتند از :

— انسداد بینی

— ترشح چرکی يك طرفه بینی

— نارسائی تنفسی و برونشیت های مکرر و فراوان

— در امتحان سوراخ بینی ( اغلب طرف راست ) مملو از ترشحات مخاطی

چسبنده است که بزحمت جدا میشود .

— اغلب بعد از تقطیر آدرنالین دیدن امپرفوراسیون مقدور میگردد . مخصوصا

در نزد بزرگسالان در رینوسکپی خلفی دیدن امپرفوراسیون خیلی آسانتر است . البته

با آئینه گلاتزل و امتحان با استیله بسته بودن سوراخ خلفی بینی را نشان خواهد داد .

همچنین لوله کائوچوکی و مواد رنگی و چکاندن دارو در بینی وارد حلق نمیشود و

در رینوسکپی خلفی پرده دقیقا در سوراخ کوآنال قرار نگرفته است . بلکه کمی بطرف

قوس نازال متمایل گشته است . این پرده اغلب بیضی شکل بوده و گودی داشته و از

مخاطی نزدیک ب رنگ زرد پوشیده شده است و مخاط مجاور بصورت طبیعی است .

و باوژتا سیونهای هیپرتروفیک همراه است .

— اغلب پرده صماخی بیمار ر تراکته است

معرفی بیمار ؟

آقای ن — س ۲۶ ساله اهل همدان دانشجو بعلم زیر مراجعه کرده است :

— انسداد بینی درطرف راست نارسائی تنفسی و تنگی نفس بخصوص هنگام

خواب .

و اگر چنانچه از نوع هموزیگوت باشد ایجاد تالاسمی خطرناک را مینماید در حالی که نوع هتروزیگوت باعث تالاسمی خفیف تر و کم خطرتر میگردد .  
 نوع دیگر هموگلوبینوپاتیها عبارت از آنمی فالسی فورم (داسی شکل) است که اشکال در تشکیل هموگلوبین A نیست بلکه بجای آن هموگلوبین دیگری که هموگلوبین S میباشد تولید شده است . عیب این هموگلوبین اینستکه موقعیکه اکسیژن کم باشد قابلیت انحلال آن کم میگردد و بشکل کریستالهائی در میآید که شکل گلوبول را تغییر داده و شکل داس در میآورد البته این پیش آمد فقط در نوع هموزیگوت دیده میشود و همراه با این پیش آمد طول عمر گلوبولهای قرمز نیز کم میشود نوع دیگر هموگلوبین غیر عادی عبارت از هموگلوبین C است که جانشین هموگلوبین A میشود و در اشخاص هتروزیگوت که علاوه بر هموگلوبین S یا هموگلوبین C دارای مقدار زیادی هموگلوبین A باشند هیچ نوع کم خونی دیده نمیشود .

در آنمی های هیپوکرم محتوی گلوبولهای قرمز گاهی بیش از گنجایش حجم گلوبول میباشد ، بنابراین مانند پاکتی است که بیش از گنجایش در آن میوه جا داده شده باشد . و اشکال مختلف باد کرده با سطح ناهموار در گلوبولها دیده میشود که با کم خونی داسی شکل متفاوت است و این تغییرات نیز در نوع هموزیگوت دیده میشود .

اما راجع به الکتروفورز هموگلوبین دو نوع هموگلوبین D, S دارای نوار مشابهی در الکتروفورز میباشد که جدا کردن آنها مشکل است و بطوری که میدانیم هموگلوبین S بعبه کم خونی فالسی فورم میشود در صورتیکه هموگلوبین D سبب کم خونی نمیشود . هموگلوبین N و P را فقط در سطح کروماتوگرافی میشود از هم جدا کرد و نیز هموگلوبین O و N که عبارت از یکنوع متهموگلوبین است زیرا محل پیدایش آن در قسمت هم میباشد نه در قسمت گلوبین توزیع هموگلوبینها بدین طریق است که هموگلوبین S بیشتر در آفریقا و جنوب هندوستان دیده میشود و هموگلوبین D بیشتر در پنجاب دیده میشود . هموگلوبین E در برمه و تایلند یعنی جنوب شرقی آسیا دیده میشود و از نظر ناحیه دارای هموگلوبین E میباشد بایستی از یک نژاد باشند در جزیره سیلان اغلب مردم مردم شناسی دارای اهمیت بسیار است . در جنوب هندوستان و سیلان چون مردم هردو دارای هموگلوبین میباشد که مربوط به نژاد مغول است در صورتیکه بالاتر از جزیره سیلان یعنی جنوب هندوستان ژن هموگلوبین S دیده میشود که مربوط به آنمی فالسیفورم میباشد و تصور میرود که هموگلوبین S از همین ناحیه به آفریقا رفته باشد هموگلوبین G آلفا فقط در جنوب چین دیده میشود و هموگلوبین B فقط در کنگو دیده میشود و تنها هموگلوبین غیر طبیعی که در انگلستان دیده میشود هموگلوبین نورفولک Norfolk میباشد تاریخچه پیدایش این هموگلوبین باین ترتیب بود که یکی از پزشکان سنگاپور که در باره هموگلوبین های سر بازهای انگلیسی مطالعه میکرد بمن اطلاع داد که یکنوع هموگلوبین G نزد یکی از سر بازان انگلیسی دیده است و چون این هموگلوبین مخصوص جنوب

چین میباشد بتصور اینکه اشتباه کرده است مجددا خون را آزمایش نموده و معلوم شد که این هموگلوبین شبیه به هموگلوبین  $\beta$  است و چون آن سرباز از ناحیه نورفلک انگلستان بود این هموگلوبین باین نام خوانده شده و در انگلستان در حدود یک درصد مردم دارای هموگلوبین غیر طبیعی هستند .

بوسیله الکتروفورز و کروماتوگرافی هموگلوبین مشاهده شده است که  $\epsilon$  رشته پلیپپتید در هر هموگلوبین موجود میباشد که دو بدو شبیه یکدیگر هستند و نیز هموگلوبین سایر پستانداران را مطالعه کرده و دیده اند که هموگلوبین آنها شبیه به هموگلوبین A در انسان میباشد و از نقطه نظر این پلیپپتیدها که از اسیدهای آمینه مختلف تشکیل شده اند اختلاف بین هموگلوبین F و A فقط در ساختمان یک نوع اسید آمینه آنها است میوگلوبولین فقط دارای یک رشته پلیپپتید و یک ملکول هم میباشد در هموگلوبین انسان چهار رشته پلیپپتید مجزا شده است که با نامی آلفا و بتا و گاما و دلتا مشخص شده اند بدین ترتیب که در هموگلوبین A دو رشته آلفا و دو رشته بتا و در هموگلوبین F دو آلفا و دو گاما در هموگلوبین A<sub>2</sub> دو رشته آلفا و دو رشته دلتا موجود میباشد بطوریکه ملاحظه میشود هر ۳ نوع هموگلوبین دارای دو رشته آلفا مشترک میباشد و اختلاف آنها بنا بر این در دورشته دیگر میباشد در هموگلوبین A<sub>2</sub> بین دو هیستیدین دو رشته آلفا ملکول هم قرار گرفته است که در عملی اکسیداسیون هموگلوبین موثر میباشد و اختلاف هموگلوبینهای مختلف از همین جا ناشی میگردد .

گاهی بجای  $\epsilon$  نوع پلیپپتید مختلف یک رشته پلیپپتید وجود دارد که چهار مرتبه تکرار میشود مانند هموگلوبین Bort که از چهار رشته گاما تشکیل شده است . بین رشته پلیپپتید آلفا و گاما ۳۹ درصد اسید آمینهها شبیه یکدیگرند در صورتیکه آلفا و بتا ۴۲ درصد و بتا و گاما ۷۱ درصد، بتا و دلتا ۹۰ درصد اسید آمینهها شبیه یکدیگرند و از این تشابه چنین نتیجه گرفته میشود که اولین ژن قدیمی عبارت از ژن آلفا بوده و سایر ژنها از آن جدا شده اند یکی از اشکال غیر طبیعی هموگلوبین اینستکه یکی از اسیدهای آمینه در رشته آلفایا بتا باشد فعلا در هموگلوبین H بجای دو عدد آلفا دو عدد بتا قرار گرفته یعنی در حقیقت چهار عدد بتا دارد مانند هموگلوبین Bort که بجای دو آلفا دو عدد گاما موجود میباشد و این نوع هموگلوبین را ترامر نامند و علت تسمیه این هموگلوبین به Bort آنستکه اینجانب آنرا در بیمارستان سن بارت لندن کشف کرده ام . مهمترین انواع مختلف هموگلوبین های غیر عادی که شناخته شده عبارتند از هموگلوبین S و C و D و G (چین) و G (در فیلا دلفیا) و I و Norfolk (انگلستان) و N (بوستون) و M (ساسکاتون) مطالعات در باره انواع مختلف هموگلوبین های غیر عادی هنوز هم ادامه دارد و هر روز یک نوع هموگلوبین کشف و یک بیماری بر انواع هموگلوبینوپاتیها اضافه میشود .



نمونه های فلورسنت آنتی بادی



1200 ×

*Salmonella atlanta*



بنفش که طول موج کم و فرکانس زیاد دارد) بوسیله تحریک یا فعال شدن جذب نموده و بصورت یک روشنائی (در زمان کمتر  $10^{-4}$  ثانیه) بانور مرئی منتشر سازد.

مفهوم کلمه فلورسانت را میتوان بصورت زیر تشریح نمود.

موقعی که یک مولکول انرژی روشنائی را جذب میکند پس از جذب ممکن است بصورتهای مختلفی آنرا منتشر نموده و یا پس دهد - گاهی بصورت حرارت - زمانی بصورت انرژیهای عکس العملهای شیمیائی و یا آنکه بصورت نور و روشنائی آنرا بر میگردداند - و این شکل آخری است که مورد نظر ما می باشد .

موقعی ما میگوئیم که یک جسم روشن Luminescence است که آن جسم نور و روشنائی را منتشر نماید و نسبت به نوع منبع نورانی باسامی Electero-luminescence (منبع الکتریکی) و Chemo-luminescence (منبع شیمیائی) مینامند و چنانچه این روشنائی حالت انعکاس پس از جذب یک انرژی نوری داشته باشد Photo-Luminescence نامیده خواهد شد و در حالت اخیر است که زمان نور جذب شده با زمان نور منعکس و منتشر شده اختلاف و تفاوت دارد و این اختلاف و تفاوت زمان اگر بیش از  $10^{-4}$  ثانیه باشد آن جسم فسفرسانس خواهد بود و چنانچه این اختلاف و تفاوت کوتاهتر از زمان  $10^{-4}$  ثانیه باشد آن جسم Fluorescence خواهد بود.

## میکروسکپ فلورسانت

میکروسکپ فلورسانت از قسمت های زیر تشکیل شده است :

۱- منبع نور - که از یک لامپ جیوه ای Mercury که حداکثر دارای فشار جیوه ۲۰۰ میلیمتر میباشد استفاده مینماید .

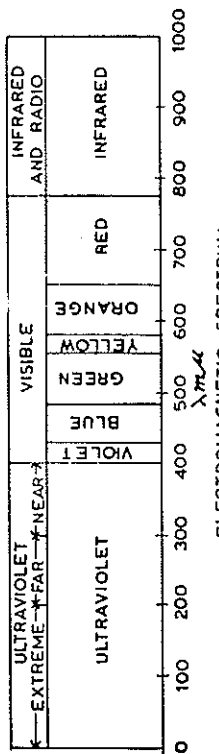
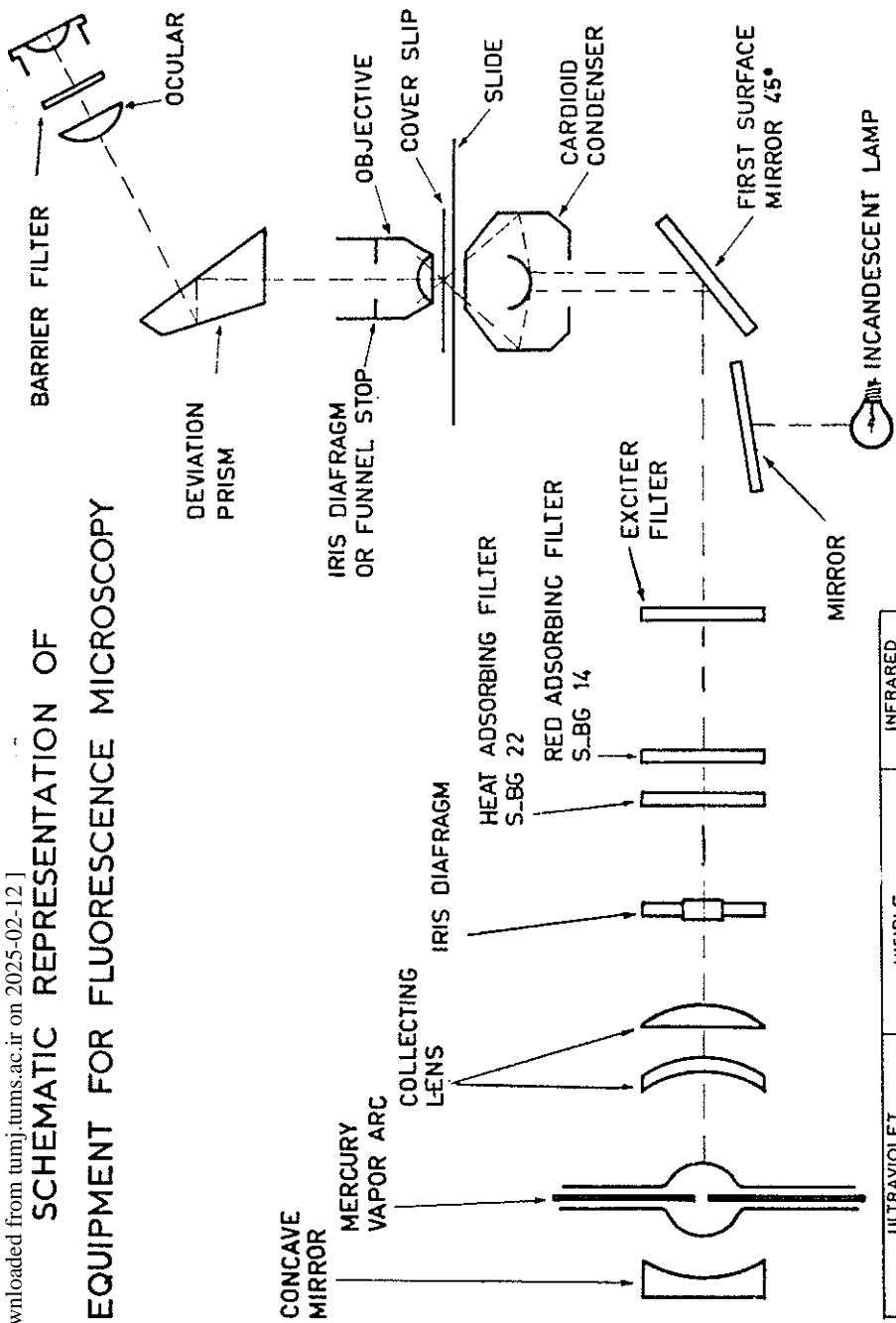
۲- فیلترها - که عامل اصلی جذب کننده طول موجهای حرارتی heat creating waves و قسمتی از طول موجهای تحریکی Wave length exciting میباشد و بطور معمول دارای سه سری فیلتر میباشد .

**در فیلترهای سری اول** heat creating waves طول موجهای بالا که حرارتی است جذب میگردد .

**در فیلترهای سری دوم** طول موجهای بیشتر از طول موجهای exciting جذب میشود و پس از این فیلترها فقط طول موجهای تحریک کننده باقی میماند و بوسیله این طول موجها است که جسم فلورسانت رنگ شده تحریک میگردد .

**در فیلترهای سری سوم** پس از آنکه موجهای تحریک کننده سبب تحریک ماده فلورسانت شد وارد لوله objectif میکروسکپ میشود و در این جا یک فیلتر وجود دارد که تمام طول موجهای تحریک کننده را جذب میکند و فقط نور فلورسانس حاصل را به چشم میرساند.

# SCHEMATIC REPRESENTATION OF EQUIPMENT FOR FLUORESCENCE MICROSCOPY





که در pollen ها یافت میشوند .  
 میتوان آنتی ژن را از نسج (مانند نسج حاوی لیشمانیا- نسج حاوی تریپونم)  
 یا از کشت (مانند کشت میکروپهاکشت لیشمانیا- کشت قارچ- کشت ویروسها-  
 کشت پروتوزوئرها) بدست آورد .  
 گاهی محلول آنتی ژن را مصرف میکنند و برخی از کارشناسان معتقدند  
 که مقطع نسجی حاوی آنتی ژن یا فروتی های تهیه شده از آنتی ژن بر محلولهای  
 آنتی ژنی ترجیح دارد .

همیشه باید آنتی ژن تهیه شده از مواد فوق را پس از Fixation استفاده  
 نمود (fixation ها نسبت به انواع آنتی ژن ها متفاوت است) .  
 ورود آنتی ژن در بدن سبب راکسیونهایی میشود که میتوان بنام راکسیونهای  
 Immunisation نامید و این آنتی ژن ها قدرت آنها دارند که سبب ایجاد آنتی  
 بادی ها گردند .

باید توجه داشت که چون آنتی ژن ها از مواد و فاکتورهائی تشکیل شده اند  
 بنابراین میتوانند سبب ایجاد آنتی بادی هائی گردند که در بین آنها يك یا چند ماده  
 یا فاکتور آنتی بادی اختصاصی مربوط به آنتی ژن میباشد در صورتیکه بقیه مواد  
 متشکله آنتی ژن سبب ایجاد آنتی بادی های عمومی مربوط به آنتی ژن میگردند .

**آنتی بادی** - بطوریکه قبلا گفتیم ورود آنتی ژن در بدن سبب ایجاد آنتی  
 بادی هائی میشود و چون این فاکتورهای آنتی بادی در پروتئین گلوبولین سروم  
 خون وجود دارد بدینجهت از گلوبولین سروم خون بیشتر استفاده میشود از  
 اینرو باید آنها بوسائلی از سروم جدا نمود و بعدا بوسیله مواد فلورسانت آنها  
 رنگ نمود و مورد استفاده قرارداد .

باید دانست چون در آزمایش همیشه مقدار کمی سروم مشکوک به بیماری  
 در دسترس است - معمولا برای تشخیص بیماری از روش indirect استفاده  
 میکنند که در آن احتیاجی به رنگ آمیزی سروم بیمار با ماده فلورسانت نباشد  
 بلکه از سروم anti-human globuline رنگ شده با ماده فلورسانت استفاده  
 مینمایند و فقط در صورتی از سروم رنگ شده با ماده فلورسانت استفاده می-  
 نمایند که منظور تشخیص نوع آنتی ژن باشد (روش direct) .

#### Preparation of labeled globuline

اگرچه میتوان از تمام سروم برای رنگ آمیزی فلورسانت استفاده نمود  
 ولی بدو دلیل کمتر قابل استفاده میباشد یکی آنکه ماده رنگی فلورسانت به مقدار  
 زیادی به مواد پروتئین غیر فاکتور اصلی آنتی بادی میچسبد ( بطوریکه میدانیم  
 antibody ساخته شده است از تعداد زیادی پروتئین ها که بین آنها  
 globuline حامل عامل اصلی antibody است) . دوم آنکه این

مواد پروتئین غیر اصلی که در سرم وجود دارد در اثر رنگ آمیزی با مواد فلورسانت سبب ایجاد مواد رنگ شده non-specific می‌گردد .  
 در بعضی آزمایش‌ها باید توجه داشت که تهیه گلوبولین باید با خیلی دقت و خلوص بیشتری انجام گردد بدینجهت هر اندازه گلوبولین خالص‌تر تهیه شود نتیجه آزمایش صحیح‌تر و راحت‌تر خواهد بود (بعلت عدم ایجاد مواد non-specific روش تهیه :

بطور خلاصه در زیر شرح داده میشود .

۱- رسوب دادن  $\gamma$  globuline سرم (که حامل عامل اصلی antibody است) بوسیله محلول اشباع شده سولفات دامونیوم (saturated Amonium sulfate) (برخی از کارشناسان بوسیله half saturated Amonium sulfate یعنی  $\frac{1}{4}$  مقدار سولفات دامونیوم برای يك محلول اشباع شده آن مصرف میکنند) باید دانست که در این عمل  $\gamma$  globuline سرم خون بدست می‌آید.

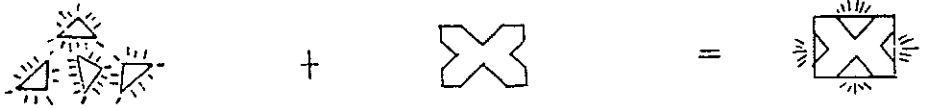
۲- رسوب رادر کمی آب مقطر حل نموده و در کیسه‌ای سلولزی که برای دیالیز بکار میرود ریخته و آنرا در محلول سرم فیزیولوژی برای دیالیز غوطه‌ور می‌سازند. (دستگاهی که برای اینکار بکار میرود يك دستگاه متحرك است و تقریباً در مدت ۲۴ ساعت عمل دیالیز انجام میشود) .

۳- پس از آن مقدار پروتئین مواد  $\gamma$  globuline را بوسیله دستگاه اسپکتوفوتومتریک و Biuret Reagent اندازه‌گیری میکنند.

۴- پس از اندازه‌گیری مقدار پروتئین از  $\gamma$  globuline به نسبت‌های مختلفه از ماده فلورسانت اضافه مینمایند (برای isothiocyanate فلورسئین- به نسبت هر يك میلی‌گرم پروتئین ۰/۰۵ میلی‌گرم اضافه میکنند). باید توجه داشت که ماده رنگی فلورسانت را میبایستی کاملاً در جای خشک نگهداری نمود).

۵- پس از آنکه  $\gamma$  globuline را با ماده فلورسانت مخلوط نمودیم آن را در يك ظرف ریخته و در يك دستگاه الکتریکی که مرتب حرکت میکند در  $+4^{\circ}\text{C}$  حرارت بمدت يك شب میگذارند تا کاملاً ماده رنگی به گلوبولین بچسبد. (باید دانست که رنگهای فلورسانت میبایستی ثابت stable و همچنین قابلیت چسبندگی به پروتئین را داشته و تغییر در ساختمان شیمیائی پروتئین ندهد) .

تعداد زیادی از رنگهای فلورسانت وجود دارد که در اغلب روش‌ها گاهی



Labeled antibody

unlabeled antigen

labeled product

**Inhibition test —B**

از این روش بیشتر در تشخیص بیماریهای میکروبی و همچنین پروتو-  
زئوئوزی استفاده میشود .

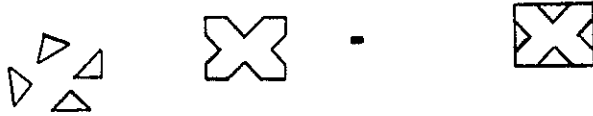
این روش روی زمینه اثرآنتی بادی و آنتی ژن بنا نهاده شده است-  
بدین معنی که آنتی بادی مخصوص به یک آنتی ژن سبب میشود که آنرا پرنماید و  
جائی برای تاثیر آنتی بادی اختصاصی دیگری باقی نگذارد . برای واضح شدن  
مثال زیر را ذکر میکنیم .

اگر یک فروتی از استرپتوکوک (آنتی ژن) را تحت تاثیر آنتی بادی مخصوص  
خودش که فلورسانت نشده است unlabeled antibody قرار دهیم معلوم  
است که باکتریهای روی فروتی بوسیله آنتی بادی پر شده و اشباع میشوند حال  
اگر همین فروتی اشباع شده را تحت تاثیر آنتی بادی مخصوص خودش که  
فلورسانت شده است labeled antibody قرار دهیم چون تمام باکتریها  
(آنتی ژن) بوسیله آنتی بادی اولیه پر شده اند دیگر جائی برای تاثیر آنتی بادی دومی  
باقی نماند بدینجهت فروتی non-fluorescent دیده میشود .

Step I

+

+



Unlabeled antibody

Antigen

Unlabeled product

Step II



Labeled antibody

unlabeled  
product

unlabeled  
product

آزمایش Inhibition از نقطه نظر تشخیص يك آنتی بادی اختصاصی مربوط بیک آنتی ژن بسیار با ارزش است چونکه نشان میدهد آیا دریک سروم غیر معلوم unknown آنتی بادی اختصاصی مربوط بیک آنتی ژن وجود دارد یا نه ؟

میتوان این آزمایش را در دو مرحله انجام داد بدین معنی که آنتی ژن (فروتنی تهیه شده از آنتی ژن) را دفعه اول تحت تاثیر يك آنتی بادی مربوط و مشخص به آنتی ژن که غیر فلورسانت است قرارداد و بعد تحت تاثیر آنتی بادی فلورسانت گذاشت و یا آنکه هر دو مرحله را دریک مرحله آزمایش مخلوط نمود و انجام داد بدین معنی که فروتنی تهیه شده از آنتی ژن را در تحت تاثیر مخلوطی از دو سروم (یکی آنتی سروم غیر فلورسانت شده و دیگری آنتی سروم فلورسانت شده) گذاشت .

در آزمایش Inhibition باید عیار آنتی سروم های اختصاصی مربوط به آنتی ژن unlabeled antibody, labeled antibody با مقدار آنتی ژن که راکسیون میدهد قبلا تعیین شده باشد و به نسبت متعادل با هم مخلوط شوند که بتوان دانست چه مقدار از هر یک باید مخلوط شود - چون اگر مثلا آنتی سروم فلورسانت شده دارای مقدار بیشتری فاکتور آنتی بادی از دیگری باشد سبب میشود که آنتی ژن را فلورسانت نماید ، بالنتیجه جواب صحیح نخواهد داد - ضمنا باید درجه inhibition هم قبلا اندازه گیری شده باشد بدین صورت که با مقایسه اثر آنتی سروم فلورسانت شده و غیر فلورسانت شده روی آنتی ژن درجه inhibition روی مقدار فلورسانس که در میکروسکپ می بینیم اندازه گیری شده باشد .

در جدول يك میتوان خلاصه مطالب بالا را دید .

Control	Test
Antigen X	Antigen X
+	+
Unlabeled N.S.	Unlabeled antiserum X
+	+
Labeled antiserum X	Labeled antiserum X
Fluorescent	Non fluorescent

اگر در جدول بالا که یکی برای کنترل و دیگری برای آزمایش است دقت شود - دیده خواهد شد که اگر بخواهیم یک آزمایش تشخیص برای یک بیماری از روش inhibition استفاده کنیم کافی است که در ستون Test بجای unlabeled antiserum X سروم بیمار مشکوک مورد آزمایش را بگذاریم. اگر نتیجه Non fluorescent بود معلوم است که جواب مثبت است اگر نتیجه فلورسانت بود معلوم است که جواب منفی است.

Indirect test - C در تشخیص بیماریها بکار میرود.

این روش یک طریقه تغییر پیدا کرده روش Coombs میباشد.

در این روش میتوان یک آنتی بادی unknown را بوسیله آنتی ژن known یا برعکس تشخیص داد و این روش بدین صورت است که:

۱- یک فروتی از آنتی ژن تهیه میکنند.

۲- سروم خرگوش ضد گلوبولین انسان را با روش Prooms تهیه مینمایند.

۳- سروم خرگوش ضد انسان را با ماده فلورسئین ایزوسیانات فلورسانت مینمایند.

حال اگر یک سروم unknown از بیمار داشته باشیم و بخواهیم با آنتی ژن known آزمایش کنیم بدین صورت عمل میکنیم.

به فروتی از آنتی ژن unlabeled antigen از سروم unknown اضافه میکنیم (در صورتیکه سروم حاوی آنتی بادی مربوطه باشد به آنتی ژن میچسبد) (unlabeled antibody) پس از آن زیادی سروم را با عمل شستن از بین میبریم و بعد به این لام (مجموعه آنتی ژن و آنتی بادی چسبیده فوق) از سروم خرگوش ضد انسان فلورسانت شده اضافه مینمائیم بالنتیجه سروم خرگوش ضد انسان به سروم چسبیده به آنتی ژن میچسبد و پرپاراسیون فلورسانت نشان میدهد و جواب مثبت است.

در صورت عکس اگر در سروم خون بیمار آنتی بادی مربوطه به آنتی ژن وجود نداشته باشد بالنتیجه به آنتی ژن نمیچسبد و با عمل شستن سروم از بین میرود و وقتی که سروم خرگوش ضد انسان فلورسانت شده اضافه شود چون سروم انسانی وجود ندارد بان نمیچسبد و پرپاراسیون فلورسانت دیده نمیشود یعنی جواب منفی است.

در عمل سروم مورد آزمایش unknown و همچنین سروم خرگوش ضد انسانی را قبلا با غلظت های از  $\frac{1}{4}$  تا  $\frac{1}{512}$  یا رقیق تر تهیه و استفاده می کنند.



+



=



unlabeled antibody

unlabeled antigen

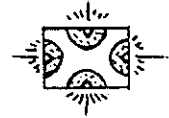
unlabeled



+



=



labeled antibody  
anti-human globuline

Unlabeled product

labeled product

طرز عمل که برای تشخیص بیماریها بکار میرود :

۱- سرم خون بیمار را تهیه میکنند .

۲- از سرم خون بیمار بغلظت‌های مختلفه از  $\frac{1}{4}$  تا  $\frac{1}{512}$  یا رقیق‌تر

در buffer saline تهیه مینمایند .

۳- سرم طبیعی خون انسان سالم را با روش prooms بخرگوش تزریق مینمایند و سرم خون خرگوش را میگیرند (این سرم دارای آنتی بادی ضد انسانی است) .

۴- گلوبولین سرم خرگوش ضد سرم انسان را با فلورسئین isocyanate رنگ میکنند .

۵- دوفرتی از آنتی‌ژن مربوط به بیماری مورد آزمایش را تهیه مینمایند. (در این روش همیشه دوفرتی یکی برای آزمایش دیگری برای control بکار میرود) .

۱- به فرتوی اول آنتی‌ژن که fixe است يك قطره از سرم خون بیمار مورد آزمایش [یا محلولهای  $\frac{1}{4}$  تا  $\frac{1}{512}$  یا رقیق‌تر (به تعداد محلولها فرتوی آنتی‌ژن فیکسه شده استفاده مینمایند) اضافه میکنند (طبق روش تهیه smear برای آزمایش) ] .

۲- پس از آن لام را بوسیله buffer saline PH: 7.1 میشویند تا زیادی سرم خون بیمار که در عمل وارد نشده است از بین برود. (باید دانست که عمل شستن فوق‌نسیب میشود که اگر در سرم بیمار آنتی‌بادی مربوط به آنتی‌ژن وجود داشته باشد بدن میچسبد و زیادی آن با شستن از بین میرود و چنانچه آنتی‌بادی مربوط به آنتی‌ژن وجود نداشته باشد بالنتیجه تمام سرم چون آزاد است با شستن از بین میرود.)

۳- به لام شسته شده فوق يك قطره از سروم خرگوش ضد انسان فلورسانت شده (با محلولهای تهیه شده از  $\frac{1}{4}$  تا  $\frac{1}{512}$  یا رقیق تر) اضافه میکنند ومدتی برای عمل این سروم ضد انسانی یا سروم انسانی فیکسه شده روی آنتی ژن صبر مینمایند .

پس از آن لام را طبق روش ذکر شده آماده نموده وبوسیله میکروسکپ فلورسانت آزمایش مینمایند .

اگر فلورسانت بود جواب مثبت و در صورت عکس جواب منفی است. فروتی دوم راکه همیشه برای control است مانند فروتی اول با سروم خون انسان سالم تهیه مینمایند (چون در خون انسان سالم آنتی کور مربوطه نیست مسلماً پرپاراسیون تهیه شده non-fluorescent خواهد بود. همانطور که قبلا گفته شد میتوان از روش indirect test برای تشخیص unknown آنتی بادی (در صورتیکه known (آنتی ژن بکار رود) و همچنین unknown آنتی ژن (در صورتیکه known آنتی بادی بکار رود) استفاده نمود.

ما طرز اجرای آن را برای هر مورد روی يك تابلونشان میدهیم:

### (تابلو ۲ و ۳)

#### Complement staining - D

این روش شبیه طریقه Indirect میباشد - فقط اختلاف آن در این است که بعضی آنتی سروم ضدانسان فلورسانت شده که در indirect test بکار میبردیم - در این جا آنتی سروم فلورسانت شده يك حیوان دیگری راکه برضد يك حیوان دیگر تهیه شده است بکار میبریم .

این طریقه را میتوان هم بر روی unknown سروم (جهت تشخیص بیماریها) وهم برای unknown آنتی ژن بکار برد ومزیت آن بر indirect test آنست که با يك conjugate که از يك حیوان درست شده است میتوان برای هر نوع آنتی سرومی که از هر نوع حیوان (یا انسان) باشد استفاده برد.

در این طریقه سروم مورد آزمایش را بوسیله حرارت ۵۶ درجه inactivé مینمایند (در نتیجه complement آن از بین میرود) و بعد این سروم inactivé با complement که از سروم حیوان دیگر (Guinea-pig) میگیرند میتوانند روی آنتی ژن فیکسه شود ( در صورتیکه سروم مورد آزمایش دارای - آنتی بادی باشد) - در عمل دوم conjugate فلورسانت شده برضد کمپلمان (Guinea-pig) را اثر میدهند بدینجهت میتوانند روی مجموعه آنتی ژن و آنتی بادی و کمپلمان که در عمل اول بهم چسبیده اند بچسبند و بالتیجه فلورسانت دیده شود .

آزمایش

Control



آنتی سرم انسانی

(یعنی سرمیکه دارای آنتی بادی معلوم مربوط به آنتی ژن میباشند)

فروتنی فیکسه شده از آنتی ژن غیرمعلوم

پس از مدتی که عکس العمل انجام شد آنرا میخوانند

Fluorescent

اگر آنتی ژن غیرمعلوم فسوفت مربوط به آنتی سرم باشند



آنتی سرم انسانی

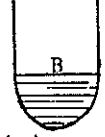
(یعنی سرمی که دارای آنتی بادی معلوم مربوط به آنتی ژن میباشد)

فروتنی فیکسه شده از آنتی ژن غیرمعلوم

پس از مدتی که عکس العمل انجام شد آنرا میخوانند

Fluorescent

اگر آنتی ژن غیرمعلوم فوق مربوط آنتی سرم باشند



سرم معمولی انسان

فروتنی فیکسه شده از آنتی ژن غیرمعلوم

پس از مدتی که عکس العمل انجام شد آنرا میخوانند

Non-fluorescent

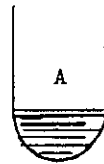
خرگوش ضد انسان فلورسانت شده (اضافه نمائید)

پس از مدتی که عکس العمل انجام شد



آزمایش

Control



سرم مورد آزمایش  
با غلظت های مختلفه

سرم معمولی انسان  
با غلظت های مختلفه

آنتی سرم انسانی  
با غلظت های مختلف

(یعنی سرم مثبت که دارای آنتی بادی مربوط به آنتی ژن است)

فروتنی از آنتی ژن فیکسه شده

فروتنی از آنتی ژن فیکسه شده

فروتنی از آنتی ژن فیکسه شده

پس از مدتی که عکس العمل انجام شد

پس از مدتی که عکس العمل انجام شد

پس از مدتی که عکس العمل انجام شد

سرم خرگوش ضد انسان فلورسانت شده اضافه میکنند

سرم خرگوش ضد انسان فلورسانت شده اضافه میکنند

سرم خرگوش ضد انسان فلورسانت شده اضافه میکنند

پس از مدتی که عکس العمل انجام شد آزمایش مینمایند

پس از مدتی که عکس العمل انجام شد آزمایش مینمایند

پس از مدتی که عکس العمل انجام شد آزمایش مینمایند

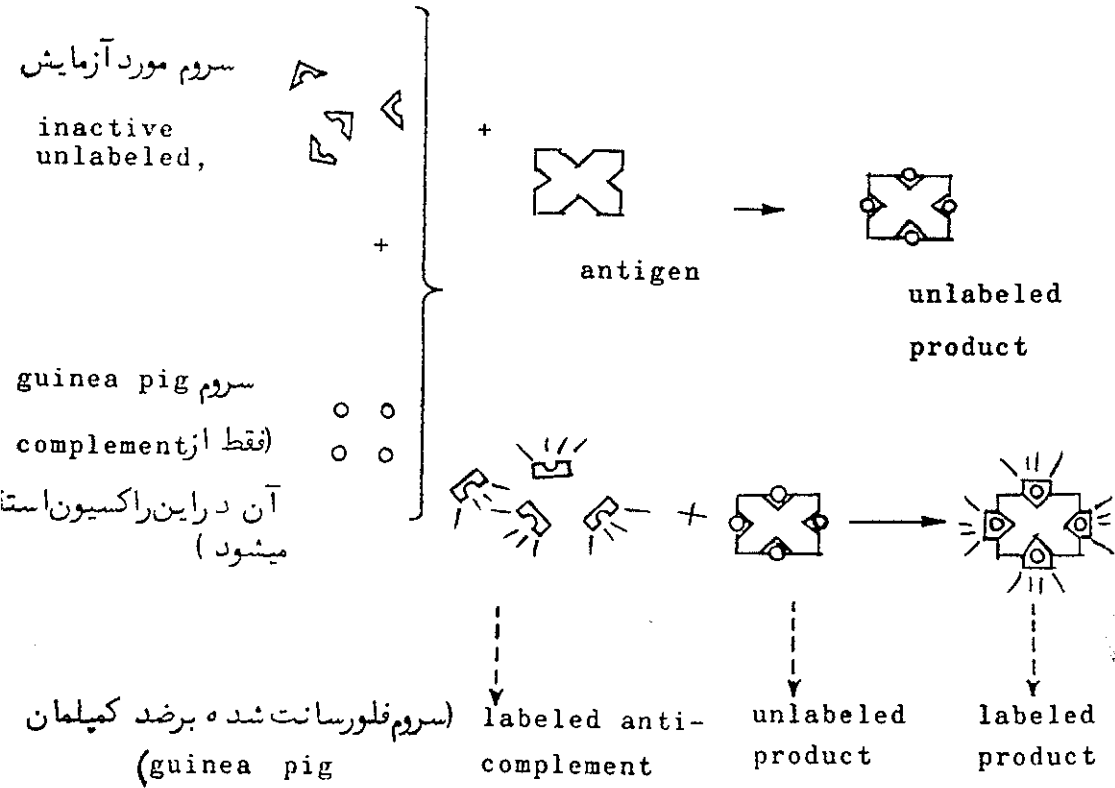
Fluorescent

Non-fluorescent

fluorescent

اگر در سرم مورد آزمایش آنتی بادی مربوطه وجود داشته باشد

حال در زیر بطور شماتیک این دو مرحله را نشان می‌دهیم



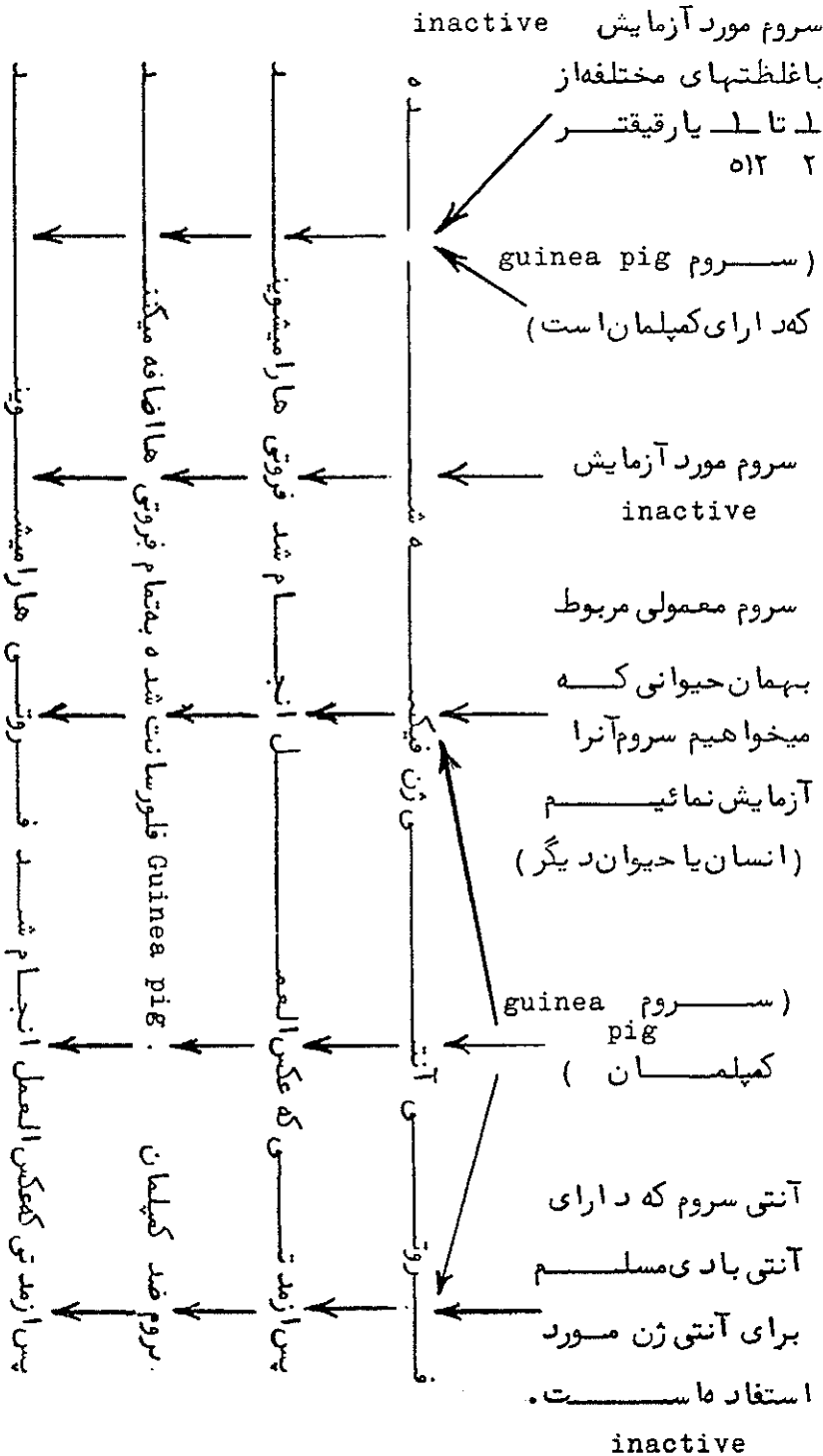
بطوریکه در شمای فوق دیده میشود:

a- در عمل اول سروم مورد آزمایش را که دارای آنتی‌بادی مربوط به آنتی‌ژن است inactive مینمایند (بدون کمپلمان) و با کمپلمانی که از سروم Guinea pig وارد عمل میکنند میتوانند سبب چسبیدن آنتی‌بادی به آنتی‌ژن گردند ولی چون هر دو فلورسانت نیستند نتیجه این عکس‌العمل non-fluorescent خواهد بود.

در عمل دوم روی این مجموعه non-fluorescent از سروم فلورسانت شده ضد کمپلمان Guinea pig (که بوسیله تزریق سروم- Guinea pig (complement) حیوان دیگر تهیه نموده و آنرا فلورسانت کرده‌اند) میریزند بالتجربه این سروم فلورسانت شده روی مجموعه non-fluorescent می‌چسبد و حاصل عکس‌العمل فلورسانت خواهد بود.

حال طرز اجرای complement staining را در تابلو چهار برای یک unknown

سروم (جهت تشخیص بیماری) نشان می‌دهیم.



آنتی سروم مثبت

اگر در سروم مورد آزمایش آنتی بادی مربوط به آنتی ژن وجود داشته باشد.

Fluorescent

چون در اینجا کمپلمان در اثر inactivation از بین رفته است و بالنتیجه سروم مورد آزمایش inactive نمیتواند با آنتی ژن بچسبد در اثر شستن از بین رفته است .

non fluores.

چون دارای آنتی بادی مربوط با آنتی ژن نیست .

non fluores.

چون دارای آنتی بادی مربوط به آنتی ژن نیست با شستن اول (سروم guinea pig کمپلمان) از بین میرود .

non fluores

در اینجا سروم دارای آنتی بادی مسلم مربوط با آنتی ژن بوده و با کمپلانی که از سروم guinea pig می گیرد . روی آنتی ژن میچسبد و بعد با سروم ضد کمپلمان guinea pig فلورسانت شده فلورسانت میگردد.

fluorescent.

در این روش مزایا و نقصان‌هایی وجود دارد که باید آنها را در نظر داشت. یکی از مزایای این روش آنست که میتوان از غلظت‌های مختلفه سرم مورد آزمایش (بخصوص در آزمایش ریکتزیا) استفاده نمود - و از نقص‌هایی که این روش دارد وجود عوامل non - specific است که برای از بین بردن آن اشکالات فراوانی وجود دارد و بدینجهت برای این نقیصه از روش‌های direct, indirect در بعضی موارد کمتر قابل ارزش است - گویانکه میتوان بوسیله آزمایش‌های قبلی که از سرم Guinea pig اختصاصا انجام میشود تا حدی این نقیصه را جبران نمود و بهتر است که قبلا سرم Guinea pig و همچنین سرم معمولی را بوسیله آزمایش کنترل نواقص non - specific آنرا دانست.

1. BLOBL, L., & REITH, D.T. (1960). Serologic studies of purified staphylococcal coagulase with special reference to fluorescence microscopy. *J. Immunol.*, 85, 244-249.

2. BURKE, F. (1961). The fluorescent antibody method in medical and biological research. *Natl. Med.*, 114, 0-24, 249-250.

3. BORCK, F., & SILVINGSTIN, A.M. (1960). A new fluorescent label for antibody proteins. *Arch. Biochem.*, 87, 293-297.

4. MOHL, L.J., & DEKLE, F. (1959). Immunofluorescence applicable as diagnostic in syphilis. *Path. Biol.*, 7, 2317-2324.

5. BUCKLEY, S.M., WHITNEY, E., & RAPP, F. (1955). Identification by fluorescent antibody of developmental forms of psittacine virus in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 90, 226-230.

6. BURGHOUTEN, W., & LACMAN, D. (1960). Identification of *Rickettsia rickettsii* in the wood tick, *Dermacentor andersoni*, by means of fluorescent antibody. *J. Infect. Dis.*, 107, 241-244.

7. BURKHOLDER, P.H., LITTELL, A.W., & KEIN, P.G. (1961). Sectioning at room temperature of unfixed tissue fractions in a celastin matrix, for immunohisto logic procedures. *Stain Technol.*, 36, 85-91.

8. COIT, H.D.J. (1959). Auto-immunity as a cause of disease (leading Article). *Lancet*, 2, 247-248.

9. BURROWS, K.D. (1957). *Eschenbach bartmanni*. *Amer. J. Hyg.*, 65, 172-185.

10. FARWELL, E.K., & GOLDMAN, M. (1957). Staining *Typhlozoma gondii* with fluorescently labelled antibody. III. The reaction in frozen and paraffin sections. *Am. J. Clin. Path.*, 32, 159-164.

11. FARWELL, E.K., & GOLDMAN, M. (1958). Results of fluorescence inhibition and dye tests for typhlozoma in human and animal sera, presented at Am. Soc. Trop. Med. & Hyg., Indianapolis, Ind.

12. CHAMBERLAIN, C.S., MCINTYRE, M.G., & NAYLOR, R.C. (1958). Fluorescent protein tracers: A trial of new fluorochromes and the development of an alternative to fluorescein. *Immunology*, 1, 315-327.

13. CHERRY, W.D., & PRINCEAN, ELIZABETH M. (1959). Staining bacterial smears with fluorescent antibody. V. The rapid identification of *Bacillus anthracis* in culture and in human and murine tissues. *Zentralbl. Bakt.*, 1 Abt. Orig. 175, 582-594.

14. COONS, A.H. (1956). Histochemistry with labelled antibody. International Bureau of Cytology, V. 9, edited by G.M. Bourne & J.P. Danielli, Academic Press, Inc., New-York.

15. COONS, A.H. (1958). Fluorescent antibody methods. In *General Cytological Methods*, V. 11, edited by J.P. Danielli. Academic Press Inc. New-York.

16. COONS, A.H., CUMMER, H.J., & JONES, R.N. (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 47, 200-202.

17. COONS, A.H., CARVER, H.J., JONES, R.N., & BERLINER, E. (1942). The demonstration of pneumococcal antigen in tissue by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.*, 45, 159-170.

18. COONS, A.H., & KAPLAN, M.M. (1950). Localization of antigen in tissue cells. III. Improvement in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.*, 91, 1-13.

19. CULLEN, H.J., & JONES, R.N. (1941). The conjugation of horse serum albumin with isocyanate of certain polynuclear aromatic hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.*, 63, 1661-1669.

20. CULLEN, H.J., & JONES, R.N. (1941). Conjugates synthesized from various proteins and the isocyanates of certain aromatic hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.*, 63, 1670-1673.

21. CARTER, C.H. (1959). Staining of coagulase-positive staphylococci with fluorescent antibodies. *J. Bact.*, 77, 670-671.

22. CARVER, H.K., & GOLDMAN, M. (1957). Staining of *Typhlozoma gondii* in frozen sections, using fluorescein-labelled antibody. *J. Paras.*, 43(Suppl.), 38.

23. CHAMBERLAIN, P.A., SLADE, J.P.A. (1960). Identification of bacteria by specific antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate. *J. Hyg.*, 50, 147-156.

24. COCHRAN, C.F., & WEICH, W.D. (1958). The cutaneous reaction to soluble antigen-antibody complexes. A comparison with the Arthus phenomenon. *J. Exp. Med.*, 108, 591-604.

25. COHEN, F., PAGE, R.H., & STURTEVANT, C.S. (1961). Immunofluorescence in diagnostic bacteriology. III. The identification of enteropathogenic *E. coli* serotype in fecal smears. *A.M.A.J. Dis. Child.*, 102, 82-90.

26. COHEN, J., ZIEGLER, V.A., & EVANS, M.M. (1960). Identification of blood group antigens and other cell polymers by the fluorescent antibody method. *Blood*, 15, 984-990.

27. COHEN, S., CHITA, C., SINGH, J.J., & POPPER, H. (1960). Immunocytochemical study of gamma globulin in liver in hepatic and posthectic cirrhosis. *J. Exp. Med.*, 111, 285-294.

28. COLLMAN, M.N. (1961). In vivo antibody binding sites in hymenolepis nana as demonstrated by direct and indirect immunofluorescent staining. *J. Parasit.*, 47, 34.

29. COONS, A.H. (1951). Fluorescent antibodies as histochemical tools. *Fed. Proc.*, 10, 538-559.

30. COONS, A.H. (1958). Fluorescent antibody methods. *General cytological methods*. Ed. Danielli, J.P. Academic Press, New-York, 399-422.

31. COONS, A.H., ANSTER, J.C., CHENYEN, P.N., & MURRAY, E.S. (1950). Localization of antigen in tissue cells. IV. Antigens of rickettsiae and mumps virus. *J. Exp. Med.*, 91, 31-36.

32. DEACON, W.E., FALCONER, M.F., & HARRIS, A.J. (1951). A fluorescent test for treponemal antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 76, 477-480.

33. DEACON, W.E., FALCONER, M.F., FREEMAN, ELIZABETH M., & HARRIS, A.J. (1959). Identification of *Neisseria gonorrhoeae* by means of fluorescent antibodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 101, 322-323.

34. DEACON, W.E., & FREEMAN, E.M. (1960). Fluorescent treponemal antibody studies. *J. Invest. Derm.*, 34, 249-253.

35. DEACON, W.E., FREEMAN, E.M., & HARRIS, A.J. (1960). Fluorescent treponemal antibody test. Modification based on quantitation (TTA-200). *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 103, 827-829.

36. DEACON, W.E., FALCONER, M.F., FREEMAN, E.M., HARRIS, A.J., & BINCH, W.L. (1960). Fluorescent antibody tests for detection of the gonococcus in women. *Publ. Hlth. Rep.*, 75, 123-129.

37. DE GROOT, C.J., MUTTIGER, J.P., SMITH, C.W., & ROGGAN, M.D. (1960). Demonstration of yellow fever virus in human cell culture by immunofluorescence. *Virology*, 12, 317-320.

38. DOWDLE, W.R., & HANSEN, F.A. (1959). Labeling of antibodies with fluorescent ox dyes. *J. Bact.*, 77, 669-670.

39. D'ONOFRI, E.V. (1958). Observations on the absorption spectra of fluorescein, derivatives and conjugates. *Arch. Biochem.*, 77, 1-8.

40. FIEB, H.H., BHATTAN, B.N., R.W., & MUESCHEL, L.H. (1961). Evaluation of the fluorescent treponemal antibody (FTA) test for syphilis. *Amer. J. Clin. Path.*, 36, 105-115.

41. FINKELSTEIN, H.A., & LA BREC, E. A. (1959). Rapid identification of chlamydiae with fluorescent antibody. *J. Bact.*, 75, 886-891.

42. FORTMILLER, F.K., & MANN, R.C. (1961). Purification fluorescent conjugates. *Comparative Chemistry and Biophysics*. Nature, 192, 1073-1074.

43. FISHER, L.P., & CURETT, H.J. (1959). The conjugation of amino-acid with isocyanate of the anthracene and 1,2-Benzanthracene series. *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 3502-3506.

44. PIPE, E.H., JR., & MUESCHEL, L.H. (1959). Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 101, 340-343.

45. GOLDMAN, M. (1953). Cytological differentiation of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia coli* by means of fluorescent antibody. *Am. J. Hyg.*, 58, 310-324.

46. GOLDMAN, M. (1954). Use of fluorescent-tagged antibody to identify cultures of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia coli*. *Am. J. Hyg.*, 59, 318-325.

47. GOLDMAN, M. (1957). Staining *Typhlozoma gondii* with fluorescein-labelled antibody. I. The reaction in smears of peripheral smears. *J. Exp. Med.*, 105, 548-556.

48. GOLDMAN, M. (1957). Staining *Typhlozoma gondii* with fluorescein-labelled antibody II. A new serological test for antibodies to *Typhlozoma* based upon inhibition of specific staining. *J. Exp. Med.*, 105, 557-573.

49. GOLDMAN, M. (1959). Microfluorescence analysis of an antigenic difference between *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia coli*. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 102, 157-159.

50. GOLDMAN, M., & KIDWELL, C.C. (1958). Staining of complement and sedimentation of fluorescent antibody procedures. *J. Immunol.*, 80, 122-131.

51. GOLDWASSER, H.A., & RUPPARD, C.E. (1959). Fluorescent antibody methods in the differentiation of murine and epidemic typhus sera. Specificity changes resulting from serologic sensitization. *J. Immunol.*, 82, 375-380.

52. GONNALL, G.G., SANDWICH, D.J., & DAVID, N.H. (1949). Determination of serum protein by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177, 751-766.

53. GOLDMAN, M. (1960). Antigenic analysis of *Eschenbach bartmanni* by means of fluorescent antibody. I. Instrumentation for microfluorescence of stained slides. *Exp. Parasit.*, 2, 37.

54. JACOB, E., & GARDNER, H.L. (1957). Freezing fluorescent immunologic for simplified preparation of fluorescent antibody. *Science*, 126, 839-840.

55. GOLDMAN, M., & CARVER, R.K. (1961). Microfluorescence of cells stained with fluorescent antibody. *Exp. Cell Res.*, 23, 255-257.

56. GOLDMAN, M., CARVER, R.K., & GOLDMAN, M.V. (1960). Antigenic analysis of *Eschenbach bartmanni* by means of fluorescent antibody. II. K<sub>1</sub> histolysates and E. bartmanni. *Exp. Parasit.*, 10, 366-368.

57. ZEIDLERBERG, M., REDDALL, F.R., & 800 800. C.H. (1953). Quantitative studies on the precipitin reaction. Antibody production in rabbits injected with an antigen protein. *J. Exp. Med.*, 98, 137-152.

58. RILL, A.C.S., BEATT, HELEN V., & COONS, A.H. (1950). Localization of antigen in tissue cells. V. Epitaxial preparation of Friedlander bacillus, type B, in the mouse. *J. Exp. Med.*, 92, 32-41.

Downloaded from tum.tufts.edu on 2025-02-12

59. MURAMOTO, R., ENOJI, K., & FRESHMANN, D. (1958). Tetranethyl rhodamine as immunohistochemical fluorescent label in the study of chronic thyroiditis. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **97**, 631-634.

60. FOPKINS, B.J., & WOODALL, A. (1953). Phenyl isocyanate protein compounds and their immunological reactions. *J. Neurobiol.*, **22**, 740-753.

61. BARRIS, A., BOSHAKE, E.M., DEACON, W.R., & BUCHAN, W.L. (1960). Comparison of the fluorescent antibody test with other tests for syphilis in cerebrospinal fluid. *Brit. J. Venereol. Dis.*, **36**, 178-180.

62. HOPKINS, B.J., & WOODALL, A. (1957). Phenyl isocyanate protein derivatives and their immunological properties. III. The amino-oxid derivatives and serological inhibition tests. *Biorheol.*, **1**, 28, 228-236.

63. INGRAM, R.L., STEEN, L.D., & LUTCHER, J.R. (1964). Staining of malarial parasites by the fluorescent antibody technique. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **106**, 52-54.

64. JACKSON, G.J. (1959). Fluorescent antibody studies of *Trichinella spiralis* infections. *J. Infect. Dis.*, **105**, 97-117.

65. JACKSON, G.J., & LEWART, B.W. (1957). Immune precipitates on nematode parasite studies in vitro with fluorescent and unlabeled serum. *J. Parasitol.*, **5**, (Part 2) 43.

66. RAFLAN, M.H. (1950). Localization of streptococcal antigens in tissues. I. Histologic studies on the persistence of M proteins types 1, 5, 12, and 19, in the tissues of the mouse. *J. Exp. Med.*, **107**, 341-352.

67. RAFLAN, M.H., COONS, A.W., & DEANON, W. (1950). Localization of antigens in tissue cells. III. Cellular distribution of pneumococcal polysaccharides types II and III in the mouse. *J. Exp. Med.*, **91**, 15-30.

68. KALIN, I.O. (1950). Contributions to the immunology and serology of schistosomiasis. *Rice Institute pamphlet*, **57**, 151-183.

69. KATZMAN, L., & RAFLAN, M. (1961). Fluorescently-labeled specific *Histoplasma capsulatum* antigens for fluorescent antibody procedures. *Acta. Proc.*, **123**.

70. LIE, CHINEN (1957). Studies on primary atypical pneumonia. I. localization, isolation, and cultivation of a virus in chick embryos. *J. Exp. Med.*, **106**, 455-466.

71. LA BREC, E.R., FOWLER, S.R., & SCHNEIDER, A. (1959). Serological identification of *Shigella flexneri* by means of fluorescent antibody. *J. Bact.*, **78**, 384-391.

72. MONTGOMERY, M.O., CHALMICK, C.B., & MAIRN, R.C. (1958). Fluorescent antisera in the detection of serological variations of *Trichomonas vaginalis*. *Brit. J. Ven. Dis.*, **34**, 1-3.

73. MARRACK, J. (1934). Nature of antibodies. *Nature*, **133**, 292-293.

74. MATHIAS, J.D. Jr, EVELAND, W.C., and SMITH, C.M. (1958). Superiority of fluorescein isothiocyanate (R112) for fluorescent antibody technique with a modification of its application. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **98**, 898-900.

75. MOODY, M.D., HILLIS, T. C. & UPDEGRAFF, C.L. (1954). Staining bacterial smears with fluorescent antibody. IV. Grouping streptococci with fluorescent antibody. *J. Bact.*, **75**, 553-560.

76. MOODY, M.D. & WINTER, C.C. (1956). Rapid identification of pastorella pastis with fluorescent antibody. III. Staining Pasteurella pastis in tissue impression smears. *J. Infect. Dis.*, **104**, 288-294.

77. MOODY, M.D., GOLDMAN, M., & THOMSON, B.M. (1956). Staining bacterial smears with fluorescent antibody. I. General methods for *Malleomonas pseudomallei*. *J. Bact.*, **72**, 357-361.

78. MONTGOMERY, CH., SUTALAND, S., & KNOX, J.M. (1960). Observations concerning fluorescent treponemal antibody test for syphilis. *J. Invest. Derm.*, **35**, 95-101.

79. NELSON, J.D., & WHITAKER, J.A. (1960). Diagnosis of enteropathogenic *E. coli* infections by fluorescein-labeled antibodies. *J. Pediatr.*, **57**, 681-688.

80. NICHOLSON, C.H. (1958). The practical use of the microscope. C.C. THOMAS, Springfield, Illinois.

81. OLSEN, S., & MCCORMICK, G.E. (1940). Experiences with the fluorescent treponemal antibody test for syphilis (FTA test). *A.M.A. Arch. Derm.*, **11**, 95-65.

82. ORTEGA, L.G., WELLS, R.C. (1957). Cellular sites of formation of gamma globulin. *J. Exp. Med.*, **106**, 627-639.

83. PRICE, G.R., & SCHWARTZ, S. (1956). Fluorescence microscopy, physical Techniques in Biological Research, V. 3, edited by G. Oster and A.W. Pollinger. Academic Press, Inc. New-York.

84. PRINGSHEIM, F. (1949). Fluorescence and phosphorescence. Interscience, New-York.

85. PRINGSHEIM, F., & VOGLER, M. (1943). Luminescence of liquids and solids and its Practical Application. Interscience, New-York.

86. PROOM, H. (1947). The preparation of precipitating sera for the identification of animal species. *J. Path. Bact.*, **55**, 419-426.

87. RIGGS, J.L., LOR, M.C., & EVELAND, W.C. (1960). A simple fractionation method for preparation of fluorescein-labeled gamma-globulin. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **105**, 655-6.

88. RIGGS, J.L., SWINARD, H.J., MICALLETT, J., LOR, M.C., & MICALP, T.G. (1959). Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *Am. J. Path.*, **34**, 1081-1097.

89. RYAN, L.H., WILLIAMS, J., & ANDERSON, A.I. (1960). Fluorescent antibody test for serodiagnosis of schistosomiasis in humans. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **105**, 289-291.

90. SCHILLER, A., SCHEDEL, R.W., & BISS, C.L. (1953). Fluorescein-conjugated basic albumin. Physical and biological properties. *J. Gen. Physiol.*, **36**, 489-506.

91. SCHMIDT, W.J. (1952). Group A streptococci polysaccharide studies on its preparation, chemical composition, and cellular localization after intravenous injection into mice. *J. Exp. Med.*, **95**, 105-117.

92. SHEDDEN, J.H. (1953). Leptospiral antigen demonstrated by the fluorescent antibody technique on human muscle tissue of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **84**, 165-167.

93. THOMSON, B.M., EMERY, W.H., & EDWARDS, P.A. (1959). Staining bacterial smears with fluorescent antibody. VI. Identification of *Salmonella* in fecal specimens. *J. Bact.*, **77**, 470-486.

94. THOMSON, B.M., EMERY, W.H., & EDWARDS, P.A. (1959). Rapid identification of an *Escherichia coli* with polyvalent antibody globulins labeled with fluorescein. In *Bact. Proc. Baltimore*. Med. Society of American Bacteriologists, **7**, 90.

95. THOMSON, B.M., EMERY, W.H., & MOODY, M.D. (1957). Staining bacterial smears with fluorescent antibody. III. Antigenic analysis of *Salmonella typhimurium* by means of fluorescent antibody and agglutination reactions. *J. Bact.*, **74**, 525-532.

96. THOMSON, B.M., MOODY, M.D., & GOLDMAN, M. (1956). Staining bacterial smears with fluorescent antibodies. II. Rapid detection of varying numbers of *Malleomonas pseudomallei* in constant-rate materials and material animals. *J. Bact.*, **72**, 362-367.

97. VOGLER, M., & FAULK, J.F. (1950). Indirect staining reaction with fluorescent antibody for detection of antibodies to pathogenic fungi. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **98**, 174-179.

98. WHITAKER, J., PAGE, R.H., STUBBING, C.S., & STELLER, W.W. (1958). Rapid identification of enteropathogenic *Escherichia coli* 1027: 80 by the fluorescent antibody technique. *Am. J. Dis. Child.*, **95**, 1-8.

99. WINTER, C.C., & MOODY, M.D. (1959). Rapid identification of pastorella pastis with fluorescent antibody. II. Production of specific antisera with whole cell pastorella pastis antigen. *J. Infect. Dis.*, **104**, 274-280.

100. WINTER, C.C., & MOODY, M.D. (1959). Rapid identification of *Pasteurella pastis* in smear smears. *J. Infect. Dis.*, **104**, 281-287.