

## بهترین شرایط برای واکنش ثبوت کمپلمان در خصوص تشخیص سینفیالیسی

نگارش دکتر حسن میردامادی \*

از سال ۱۹۰۵ که واکنش ثبوت کمپلمان برای تشخیص سینفیالیسی توسط واسرمان نابرس و بروک بمیان آمد پنج تغییر و یا اصلاح بزرگ و بسیاری اصلاحات کوچک بوسیله عده‌ای از کارشناسان دیگر بر آن انجام گرفت. در آغاز شیره الکلی بافت‌های طبیعی بدن و معمولاً بافت قلبی بجای شیره آبکین جگر سیفالیسی بکار رفت. آنگاه کارشناسانی مانند برونینک و کروئیک شانگ - ماک کزنی وزاکس دریافتند که بر اثر افزایش کلسترول بشیره الکلی بافت قلبی آنتی‌ژن حساسیت قابل ملاحظه‌ای پیدا میکند. دیگران بجای آنکه مخلوط سرم و آنتی‌ژن و کمپلمان را چنانکه معمول بود مدتی کوتاه در گرمی ۳۷° بگذارند مخلوط را بمدت درازتری در سردی ۶° قرار دادند برای آنکه تا پیش از افزایش مجموعه حلاله (سیستم همولی تیک) بیشترین اندازه کمپلمان را بایش یافته باشد اصلاح چهارم بسال ۱۹۴۱ توسط خانم پنک بورن بعمل آمد و نامبرده ماده فسغولی پیدی را که کاردولی تین نامیده شده کشف نمود. این ماده همینکه بمقدار متناسب با لسی تین خالص و کلسترول آمیخته شود ترکیب مخصوصی بدست میدهد که آنتی‌ژن کاردولی پینی نام دارد و با مقایسه با آنتی‌ژن‌های لیپیدی معمول نتایج اختصاصی بیشتری بدست میدهد بالاخره پنجمین و یا آخرین اصلاح بسال ۱۹۴۹ توسط نلسون و سایر انجام گردید و نامبرندگان آنتی‌ژن واقعی سینفیالیسی یعنی نیرو نما پایدارا جانشین آنتی‌ژنهای غیر حقیقی و یا هاپتن‌های لیپیدی ساختند و بدین سان پس از نیم قرن در حقیقت همان آنتی‌ژن اول را که واسرمان و همکارانش در آغاز بکار برده بودند دوباره به

\* استاد دانشکده پزشکی

صورت بهتری بکار بردند چهار سال بعد دالساندرو و دارد و نی‌نی از تریونم رایتر که برخلاف تریونم سیفیلیس قابل کشت و پرورش در محیط‌های ساختگی و غذائی است آنتی‌ژنی از پروتئینهای تصفیه شده وخالص آن ساختند.

در اینجا باید یادآوری نمود که ارزش تشخیصی يك روش مخصوص آزمایشی ثبوت کمپلمان بیش از هر چیز وابسته باختصاصی بودن نتایج آن یعنی بدست دادن جوابهای مثبت در حالات طبیعی و غیر طبیعی بجز سیفیلیس و در همان حال حساسیت یعنی نسبت مواردی از سیفیلیس است که بکمک روش مخصوص مشخص میگردد .

بدیهی است همه روش‌های مختلف ثبوت کمپلمان همانند و بر يك اساس استوار است و تنها برای استاندارد نمودن مواد و لوازم و عوامل فیزیکی مؤثر و نتایج حاصل از ریایش است که اختلافاتی در طرز اجرای آنها بوجود آمده است البته بهترین و مناسب‌ترین شرایط و کیفیات برای واکنش دارای اهمیت بسیار است زیرا به نسبتی که کمپلمان بیشتری بر ترکیب آنتی‌ژن و پادتن موجود در سرم بیمار بییوندد به همان نسبت نتایج حاصل آمده از آن روش حساسیت بیشتری پیدا میکند . اکنون باید بخصایر داشت که بغیر از آنتی‌ژن و آنتی‌ژن سرم عواملی دیگر نیز بر نتیجه آزمایش مؤثر شناخته شده که در آنتی‌ژن غلظت محیط از حیث الکترولیت، میزان pH، مقدار گرمی و مدتی که آزمایش باید در آن بماند و نیز چند عامل دیگر را باید در نظر گرفت .

### ۱- غلظت محیط از حیث الکترولیت

مناسب‌ترین غلظت نمکی برابر با ۰/۸۵ است که معمولاً بکار میرود اما نباید فراموش کرد که عیار کمپلمان بر حسب غلظت مولکولی محیط از حیث نمک تفاوت میکند و در این باره هیدلبرگر چنین میگوید « من اطمینان کامل دارم که این عامل (یعنی غلظت نمکی محیط) غالباً سبب اشتباه نتایج آزمایش در آزمایشگاههای مخصوص تشخیص‌های پزشکی می‌شود زیرا محلول نمکی بطور تقریب و با ترازوهای غیر حساس و دقیق توزین میگردد و ظاهراً دو نمونه از محلولهای نمکی دارای مقدار یکسانی از این ماده نیست» .

### ۲- واکنش محیط از حیث pH

بر حسب نظریه مایر مناسب‌ترین pH برای همولیز pH برابر با ۷٫۶-۸٫۴ است اما نتایج رضایتبخش همچنان با pH برابر با ۶٫۸ بدست می‌آید و در میان این دو اندازه pH اختلافات کمی دیده میشود .

### ۳- میزان گرمی و مدت انکوباسیون

این موضوع مسلم است که هر اندازه مخلوط سرم و آنتی‌ژن و کمپلمان بیشتر در مجاورت

یکدیگر بماند بهمان اندازه بمقدار معین آنتی ژن و پادتن که ترکیب یافته باشد کمپلمان بیشتری ربایش پیدا میکند و علاقمندی و وابستگی برایش یافتن براین ترکیب بطور محسوس با افزایش میزان گرمی بالاتر می رود عامل محدود کننده ای که در میان این دو کیفیت یعنی مدت و حرارت وجود دارد عبارت از خراب شدن و از میان رفتن خود بخودی کمپلمان است که از صفر تا بیست درجه سانتی گراد با هستگی صورت میگیرد و بتدریج افزون میگردد و در گرمی  $40^{\circ}$  بسیار سریع است. نباید فراموش کرد که بواسطه همین خراب شدن و نابود گردیدن کمپلمان است که مدت آنکو باسیون در گرمی  $37^{\circ}$  را در حدود نیم ساعت تعیین نموده اند.

بدیهی است که واکنش و یا بهم پیوستن آنتی ژن های محلول و پادتن وابسته بآنها سریع انجام می یابد اما در مورد آنتی ژن های نامحلول مانند مخلوط های میکربی و یا شپرابده های لیپیدی چنین نظر میرسد که واکنش آهسته تر از آنتی ژن های محلول صورت گیرد اما بوسیله حرکت دورانی پیوسته میتوان واکنش را سرعت داد.

#### ۴- شرایط و کیفیاتی دیگر - اثر حرکت

از آنجائیکه حرکت مخلوطی از سرم و آنتی ژن سبب سرعت یافتن واکنش های پرسی پی تاسیون و آگلوتی تاسیون میشود هیچ دلیلی نیست قبول نکنیم که این عامل تأثیری بر واکنش ثبوت کمپلمان و که بر حسب فرضیه هیدلبرگر عبارت است از ترکیب و بهم پیوستن قسمتهای ترکیب شونده کمپلمان با شبکه و یا چهارچوبه ای که از قرار گرفتن مولیکولهای پادتن و ذرات آنتی ژن بصورت متناوب پدیدار میگردد نداشته باشد چنانکه معلوم است در مواردی که آنتی ژن و پادتن بهم پیوست شود مولکولهای کمپلمان نیز بدانها ربایش می یابد و ترکیب ضعیفی که میان پادتن و کمپلمان وجود دارد پایدارتر می گردد بنابراین هر عامل مکانیکی که بتواند بهم پیوستن سریع و مرتب آنتی ژن و پادتن یعنی در واقع پیدایش شبکه را تسریع و مساعدت کند خود بخود سبب ربایش یافتن سریع و مرتب کمپلمان بشبکه حاصل از ترکیب پادتن و آنتی ژن میگردد.

در اینجا باید یادآوری کرد که آزمایش های بسیار سریعی که در سابق بوسیله تنی چند از کارشناسان بیان آمده بود فقط در مواردی نتایج مثبت می داد که سرماها دارای مقدار زیاد رازین سیفیلیس بود در صورتیکه با سرماهای دارای مقدار متوسط رازین مدت درازتری برای ربایش کمپلمان لازم بود.

بهر جهت باید در نظر داشت که ناپایداری کمپلمان ایجاب میکند که این ماده را در جریان آزمایش هر قدر ممکن باشد بحالت فعال نگاهدارند بنابراین حرکت آنها حرکت شدیدی که در قدیم بکار میرفت نه تنها سبب کاهش فعالیت کمپلمان می گردید بلکه در همان حال سبب جدا شدن

آنتی ژن از یادتن نیز می شد در صورتیکه هر گاه در آغاز مخلوط آنتی ژن و پادتن را با هستگی حرکت دورانی دهند آنگاه کمپلمان را بدانها بیفزایند و دوباره در گرمی معتدل مخلوط را حرکت دهند بهترین کیفیات و شرایط برای برخورد آنتی ژن و پادتن و ربایش کمپلمان فراهم آمده و بدین سان پادتن یکفواخت و سریع با آنتی ژن چسبیده، کمپلمان نیز بدان ترکیب می پیوندد بی آنکه در این میان از فعالیت اصلی خود بیفتد.

از این گذشته ظاهراً در مورد آنتی ژن های لیمییدی اینگونه مخلوطها اجزاء فعاله کمپلمان را بشکل غیر قابل بازگشت بخود جذب میکنند و بدین سان سبب پیدایش واسرمان های مثبت نادرست میگردند.

در این جا باید یادآوری نمود که افزایش کمپلمان در هنگام نخستین آزمایش غیر لازم است زیرا چنانکه می دانیم کمپلمان با آنتی ژن تنها ترکیب نمی شود و نسبت پیادتن نیز علاقه ندارد اما بشرکیب حاصل از برخورد آنتی ژن و پادتن علاقه بسیار دارد بنابراین دو هنگام آزمایش ثبوت کمپلمان با مزایائی ممکن است سه هنگام تقسیم شود:

در هنگام اول آنتی ژن و سرم را با یکدیگر درآمیخته و بوسیله حرکت دورانی آهسته ترکیب آنها را سریع میکنند. در هنگام دوم کمپلمان را به مخلوط آنتی ژن و سرم میافزایند و زمان کوتاهی مخلوط را در گرمی معتدل حرکت دورانی می دهند تا بدینسان کمپلمان که نه برای گرمی و مدت ۳۷° بمدت کوتاه نیم ساعت و نه برای بحالت محلول ماندن در جریان یکشب در ۶° از فعالیت اصلیش چیزی کاسته نشده است مجموعه آنتی ژن و پادتن می پیوندند. - در هنگام سوم مجموعه حلال یعنی سرم همولی تیک و خون گوسفند افزوده میشود و باز هم مخلوط را بمدت کوتاه در گرمی معتدل می چرخانند و در این صورت هر گاه بواسطه نبودن پادتن در سرم مورد آزمایش کمپلمان آزاد مانده و مورد مصرف پیدا نکرده باشد درحالیکه فعالیت اصلی خود را هنوز هم از دست نداده است به گویچه های سرخ حساس شده چنانکه در سابق بتفصیل نگاشته شد، است اثر نموده و آنها را منحل میسازد. در اینجا باید یادآوری نمود که نتایج چند از کارشناسان بتازگی دریافتند که در آزمایشهای نلسون مایر و ایمن فلوئورسان حرکت دورانی دارای این مزیت است که مدت لازم برای بیحرکت کردن تریونم و همچنین ترکیب شدن پادتن فلوئورسان را بر آنتی ژن کوتاهتر میکند.

بر اساس همین اصول و کیفیات است که بسال ۱۹۵۲ در این بخش آزمایش ثبوت کمپلمان برای تشخیص سیفلیس معمول گردیده است که روش اجرای آن در مقالات سابقه مشروحاً ذکر شده است

#### مواد و لوازم کار:

۱- مخلوطی از سرم سه خو کچه هندی که پیوسته در سردی منهای چهارده درجه نگاهداری میشده بعنوان کمپلمان بکار می رفته است.

۲- از مخلوطی از کاردیولی پین و لسی تین و کستروپ با عیار  $1/80$  بعنوان آنتی ژن استفاده میشده است.

۳- سرم بیماران سیفیلیسی و اشخاص غیر سیفیلیسی در جریان این تجربیات بکار برده میشده است.

۴- بعنوان سیستم مشخص و معین آنتی ژن و یادتن سرم ضد سفیده تخم مرغ حاصل از خرگوش و مخلول  $\frac{1}{100}$  سفیده تخم مرغ بکار میرفته است  
نخستین ردیف آزمایشها:

عیار کمپلمان با استفاده از يك آنتی ژن و يك حجم کلی و سه روش مختلف انکوباسیون

کپلمان	۱۴ ساعت سردی	نیم ساعت در گرمی	۵۵ دقیقه در گرمی در ۳۵ درجه
اولین نمونه	۱۶ واحد	۱۶ واحد	۳۲ واحد
دومین نمونه	۳۲	۳۲	۴۸
سومین نمونه	۲۴	۲۴	۳۲

دومین ردیف آزمایشها:

چند درصد موارد مثبت های نادرست واسرمان: با استفاده از  $0.14$  سرم انسان و  $6$  سرم حیوان و سه روش مختلف انکوباسیون.

مثبت	۱۴ ساعت در سردی	نیم ساعت در گرمی	۵۵ دقیقه حرکت دورانی در ۳۵ درجه
مثبت	۵۶	۵۶	۵۶
منفی	۴۶۰	۴۶۲	۴۶۴
مثبت نادرست	۴	۲	۰
و چند درصد	(.۷۶٪)	(.۳۸٪)	(.۰٪)

نا گفته نماند که از  $6$  سرم حیوان (دوسرم گوسفند و چهارسرم خرگوش) در مورد نتیجه مثبت نادرست ، سرم گوسفند در آزمایش های انکوباسیون  $6^{\circ}$  بدست آمده است .

**نتیجه:** در آزمایش ثبوت کمپلمان هر گاه بجای نیم ساعت قرار دادن سرم و آنتی ژن و کمپلمان در گرمی  $37^{\circ}$  و با نگاه داشتن این مخلوط بمدت يك شب در برودت  $6^{\circ}$  آن را بمدت کوتاه در گرمی معتدل بچرخانند نتیجهٔ بهتری بدست می آید .

همچنین بهتر این است که آزمایش بجای دو هنگام معمول در سه هنگام ، اول مخلوط نمودن آنتی ژن و سرم - دوم افزایش کمپلمان - سوم افزایش خون گوسفند حساس شده بانجام برسد.

## Bibliographie

1. Boyd W. C. Fundamentals of Immunology Interscience Publishers U.S.A. 1956.
  2. Eagle, H. J. Expt l. Med. 52 747, 1930
  3. Eagle, H. J. The Laboratory Diagnosis of Syphilis. Mosby, Saint-Louis, U. S. A, 1937 .
  4. Gastinel, P. Elements d'Immunologie Generale. Masson et cie., Editeurs, Paris, 1955 .
  5. Heidelberger, M. Lectures in Immuno-Chemistry. Academic Press, Now York. U. S. A., 1956.
  6. Hombria, A. Acta Dermatosyphiligr. 23, 683 - 685, 1931.
  7. Kabat, B. A. & Mayer, M. M. Experimental Immuno-Chemistry. Charles C. Thomas, Publishers. Springfield, Illinois, U. S. A., I -48
  8. Kadish, E. Med. Klin. S 1920, 1926.
  9. Mirdamadi, H. Revue de la Faculté de Médecine de Téhéran Vol. 3, No. 2, 1954 .
  - 10: Mirdamadi, H. & Nazari, G. Acta Medica Iranica . Vol. 1 No. 1, 1957 .
  11. Postella, O. Annual Report of the Division of Laboratories and Research. U. S. A. Albany, 1950 .
  12. Alner L. Becker J., Immunology. 1960, 3, 307.
- B - Talifero W.H. and Humphrey , 1961  
Advances in Immunology , Academic Press New York and London