

بهترین شرایط برای واکنش ثبوت کمپلمان درخصوص تشخیص سیفیلیس

نگارش دکتر حسن میردامادی *

از سال ۱۹۰۵ که واکنش ثبوت کمپلمان برای تشخیص سیفیلیس توسط واسرمان نابسر 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 آبگین جگر سیفیلسی بکار رفت. آنگاه کارشناسانی مانند بر و نینک و کروئیک شانک - ماک کنزی و زاکس 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 فسفولی پیدی را که کاردیولی‌ژن نامیده شده کشف نمود. این ماده همینکه بمقدار متناسب با لسی‌ژن خالص و کلسترول آمیخته شود ترکیب مخصوصی بدست میدهد که آنتی‌ژن کاردیولی 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 هایر انجام گردید و نامبرندگان آنتی‌ژن واقعی سیفیلس یعنی نیرو نمایی‌دارا 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 نیی از تریونم رایتر که برخلاف تریونم سیفیلیس قابل کشت و پرورش در محیط‌های ساختگی و غذائی است آنتی ژنی از پروتئینهای تصفیه شده و خالص 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 بكمك 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 رایش 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 آنتی ژن و پادتن موجود در سرم بیمار پیوندد به همان نسبت نتایج حاصل آمده از آن روش حساسیت بیشتری پیدا میکند. اکنون باید بخاطر داشت که بغیر از آنتی ژن و رآژین سرم عواملی دیگر نیز بر نتیجه آزمایش مؤثر شناخته شده که در آن میان غلظت محیط از حیث الکترولیت، میزان pH، نفوذناپذیری 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 ۷٫۴-۷٫۶ 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 آنتی ژن 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 درمیان 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° بسیار سریع است. نباید فراموش کرد که بواسطه همین خراب شدن و نابود گردیدن کمپلمان است که مدت آنکو باسیون در گرمی 37° 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 شپرابه 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 بمیان آمده بود فقط در مواردی نتایج مثبت می داد که سرمها دارای مقدار زیاد رازین سیفیلیس بود در صورتیکه با سرمهای 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 آهسته 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 پادتن نیز می‌شد 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 یکفوخت و سریع با آنتی ژن چسبیده، کمپلمان نیز بدان ترکیب می‌پیوندد بی آنکه در این میان از فعالیت اصلی خود بیفتد.

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

در این جا باید یادآوری نمود که افزایش کمپلمان در هنگام نخستین آزمایش غیر لازم است زیرا چنانکه می‌دانیم کمپلمان با آنتی ژن تنها ترکیب نمی‌شود و نسبت پیادتن نیز علاقه ندارد اما بر کرب 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 می‌دهند 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 می‌پیوندند. - در هنگام سوم مجموعه حلال یعنی سرم همولی تیک و خون گوسفند افزوده میشود و باز هم مخلوط را بمدت کوتاه در گرمی معتدل می‌چرخانند و در این صورت هر گاه بواسطه نبودن پادتن در سرم مورد آزمایش کمپلمان آزاد مانده و مورد مصرف پیدا نکرده باشد در حالیکه فعالیت اصلی خود را هنوز هم از دست نداده است به گویچه‌های سرخ حساس شده چنانکه در سابق بتفصیل نگاشته شد، است اثر نموده و آنها را منحل می‌سازد. در اینجا باید یادآوری نمود که تنی چند از کارشناسان بتازکی دریافته‌اند 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 سابق مشروحاً ذکر شده است.

مواد و لوازم کار:

۱- مخلوطی از سرم سه خوکچه هندی که پیوسته در سردی منهای چهارده درجه نگاهداری میشده بعنوان کمپلمان بکار می‌رفته است.

۲- از مخلوطی از کاردیولی پینولسی نین و کستروپ با عیار ۱/۸۰ 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 پادتن سرم ضد سفیده تخم مرغ حاصل از خرگوش و محلول $\frac{1}{100}$ سفیده تخم مرغ بکار میرفته است
نخستین ردیف آزمایشها:

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

کمپلمان	۱۴ ساعت سردی	نیم ساعت در گرمی	۵۵ دقیقه در گرمی در ۳۵ درجه
اولین نمونه	۴ درجه	۳۷ درجه	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 ۵۱۴ سرم انسان و ۶ سرم حیوان وسه روش مختلف انکوباسیون.

	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
وچند درصد	(۰.۷۶٪)	(۰.۳۸٪)	(۰٪)

نا گفته نماند که از ۶ سرم حیوان (دوسرم گوسفند و چهارسرم خرگوش) در مورد نتیجه مثبت نادرست ، سرم گوسفند در آزمایش های انکوباسیون ۶۰ بدست آمده است .

نتیجه: در آزمایش ثبوت کمپلمان هرگاه بجای نیم ساعت قرار دادن سرم و آنتی ژن و کمپلمان در گرمی ۳۷ و با نگاه داشتن این مخلوط بمدت يك شب در برودت ۶۰ آن را بمدت کوتاه در گرمی معتدل بچرخانند نتیجه 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