

از کارهای بخش ایمنولوژی عمومی دانشکده پزشکی تهران

بررسی مقدماتی برای تهیه آنتی ژن غشائی

در تشخیص اکینو کوز

نوشته :

دکتر میر دامادی — دکتر سعادت زاده

روش های مختلف تشخیص کرمهای مهم مانند آزمایشهای ثبوت کمپلمان ، حساسیت پوستی کازونی، آگلوتیناسیون از کارهای روزانه يك آزمایشگاه بالینی بشمار میرود بویژه هنگامی که نتوان انگل را در مواد گرفته شده از بیمار یافت و یا نتوان از نشانه های خارجی مانند اکینو کوز بوجود آن پی برد بیشتر مورد نیاز قرار میگیرد.

در حال حاضر آزمایشهای سرم شناسی عبارت است از ثبوت کمپلمان ، حساسیت جلدی ، آگلوتیناسیون ، هماگلوتیناسیون با گویچه های سرخ دباغی شده [هماسی تانه (۱)]، پرسی پیتاسیون ، فلوکولاسیون ، ایمونو فلوئورسانس ، ایموبیلیزاسیون ، اینی بی سیون (۲) در محیط کشت که میتوان بطور غیر مستقیم تشخیص کرمهای انگلی را داد و قبل از پیدایش علائم بالینی و رادیولوژی وجود آنرا تأیید نمود . از واکنشهای آزمایشگاهی بالا ثبوت کمپلمان ، وینبرگ و حساسیت پوستی کازونی روش کلاسیک با ارزشی است که همیشه و همه جا قابل استفاده میباشد زیرا انجام سایر واکنشها گاه وسائل مفصلی میخواهد و تازه نتیجه رضایت بخشی هم بدست نمی دهد و برای کار معمولی آزمایشگاه بالینی مقدور نمیشد بنابراین در کارهای روزانه آزمایش وینبرگ و

(1) Hématie tannée .

(2) Inhibition .

کازونی همچنان واکنشهای بسیار مطمئن و آسان و عملی در هر آزمایشگاه میباشد اما خصوصیت آنتی ژن مصرفی بایستی مسلماً طوری باشد که غیر از موارد کیستهای مرده و یا نفوذ ناپذیر بتواند از نظر کیفیات بیوشیمیائی جوابهای دقیق با صحت و درستی و حساسیت کافی بدهد تا بخوبی امکان تشخیص بیولوژی انگل میسر شود. بنا بر این انواع آنتی ژنهای موجود در انگل و مواد حاصله از آن مورد تجربه کارشناسان مختلف قرار گرفت ولی نتوانستند نتایج صد در صد دقیق و درست بدست آورند و آنتی ژنی با همه مزایا تهیه نمایند.

بهین منظور بخش سرم شناسی دانشکده پزشکی تهران نیز مانند انستیتو پاستور پاریس بدنبال تحقیقاتی که نمود توانست از غشاء کیست هیداتیک بکمک حرکت با آژیتاتور همراه خرده شیشه و جیوه آنتی ژنی مناسب تهیه نماید که این آنتی ژن اولاً یک نواخت و ثابت و بمدت بیشتری قابل نگهداری است.

ثانیاً حد اکثر حساسیت اختصاصی بودن را داراست. ثالثاً بهنگام تجربه نتایج فوق العاده عالی نسبت به استانداردهای قدیم بدست میدهد بطوریکه در ۷۰ تا ۹۰٪ موارد ابتلاء مثبت نشان میدهد.

طرز تهیه آنتی ژن :

- ۱) غشاء داخلی کیست (۱) را بدقت جدا نموده نخست با آب معمولی سپس با آب مقطر استریل آنرا میشوئیم.
- ۲) غشاء تازه را توزین مینمائیم.
- ۳) غشاء تازه را بصورت قطعات ریزی در میآوریم.
- ۴) خرد شده را در یک شیشه دهان گشاد که بدنه کلفت داشته، دارای جیوه و خرده شیشه پاک بمقدار مناسب باشد میریزیم. (قبلاً جیوه را بسا اسید نیتریک خالص مجاور می کنند که ناخالصیهای آن بصورت نیترات درآید سپس با آب مقطر آنقدر می شوئیم تا اسید آن از میان برود آنگاه جیوه را در حرارت استریل مینمایند. خرده شیشه ها نیز باید نه خیلی درشت و نه خیلی ریز باشند و قطر تقریبی آنها در حدود چهار میلیمتر و کاملاً شسته و استریل شده باشند).

- ۵) غشاء تازه شش برابر و نیم سنگین تر از گرد خشک شده آن میباشد بنابراین بایستی ۶۵٪ قسمت از جدار تازه را بایک قسمت گرد خشک شده برابر دانست و آنرا بانه قسمت سرم فیزیولوژی استریل مخلوط کرد تا مخلوط $\frac{1}{10}$ آنتی ژن آماده شود یعنی برای صد قسمت غشاء تازه بحساب زیر $40 \times 138 = \frac{100 \times 9}{65}$ قسمت سرم فیزیولوژی استریل بدان بیفزایند.
- ۶) محصول را سه روز هر روز بمدت سی دقیقه در آژیتاتور کان قرار میدهیم و آنرا در فواصل نوبتها در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری مینمائیم تا مواد فعال که دارای خواص آنتی ژنی است با خیسازدن و حسرکت دادن بهتر استخراج شده و آزاد گردد.
- ۷) آنگاه ده دقیقه بمیزان ۲۰۰۰ دور آنرا در سانتریفوژور میچرخانیم و مایع رویه را که در واقع امولسیون آنتی ژنی $\frac{1}{10}$ است بدست می آوریم.
- ۸) برای نگهداری و حفاظت این امولسیون میتوان آنرا یا به نسبت پنج درهزار با فنول مخلوط کرد و در حرارت ۴ تا ۸ درجه سانتی گراد نهاد و یا در آمپولهای یکسانتی متر مکعبی تقسیم نمود و در ۱۵ درجه سانتی گراد قرار داد و در موقع نیاز بمصرف رسانید.
- ۹) اکنون باید این امولسیون را سنجش عیار کرد و مطابق عیار حاصل در آزمایش وینبرگ بمقدار ۰٫۱ سانتی متر مکعب بکار برد.
- ۱۰) از تجارب محققین نتیجه میشود که در آزمایش کازونی باید این امولسیون را به نسبت $\frac{1}{50}$ با سرم فیزیولوژی استریل $\text{PH} = 7$ رقیق نموده بمقدار ۰٫۱ تا ۰٫۲۵ سانتی متر مکعب درون پوستی تزریق نمود. نکته قابل توجه آنستکه غالباً با این آنتی ژن واکنش تیپ دیررس (۶ تا ۳۶ ساعت) و غیر عادی بصورت لکه اریتمی ۳-۶ سانتی متر روی پوست میباشد ولی ۸۰ تا ۹۰ درصد موارد نتایج مثبت میدهد.
- دیگر آنکه حتی المقدور بایستی آزمایش وینبرگ را قبل از کازونی انجام داد زیرا چند روز بعد از واکنش کازونی ممکنست وینبرگ بغلط مثبت شود و چنانچه مجبور شدیم از بیماریکه واکنش کازونی نخست منفی بوده مجدداً کنترل نمائیم و یا وینبرگ بعمل

آوریم میبایستی لااقل پانزده روز فاصله بدهیم .

روش آزمایش :

آزمایش ثبوت کمپلمان وینبرگ بر روش ام . سی . اف (۱) (روش چرخشی) مخصوص آزمایشگاه ایمنولوژی دانشکده پزشکی تهران انجام میپذیرد. خصوصیات مهم این روش عبارت است از :

(۱) سرم بیمار بمقدار کم (۲۰ سانتی متر مکعب) برای يك آزمایش کیفی و کمی که قبلا نیمساعت در ۵۶ درجه سانتی گراد حرارت دیده است بکار میرود .
(۲) کمپلمان و همولیزین برطبق عیار بدست آمده و گلبول بمقدار کم در آزمایش مصرف میشود .

(۳) بوسیله ده دقیقه چرخش (باروتا تور ۱۲۰ دور در دقیقه) در لوله های ته تخت که دارای يك گلوله بلوری است سرم و آنتی ژن بخوبی با هم مخلوط شده کمپلکس آنتی ژن - آنتی کر سریع و یکنواخت و بهتر تشکیل میشود .

(۴) افزایش کمپلمان در مرحله دوم چرخش (ده دقیقه دوم) و حرارت ۳۵ درجه سانتی گراد که برای این آزمایش انتخاب شده است در عین حال که از غیر فعال شدن کمپلمان بنحو احسن جلوگیری می کند موجب پیوست شدن آن بسر روی کمپلکس قبلی بآسانی میشود .

(۵) در چرخش سوم (ده دقیقه سوم) گلبول سرخ حساس شده گوسفند با همولیز یا عدم همولیز خود نتیجه منفی یا مثبت آزمایش را آشکار مینماید .

همچنانکه در (جدول ۱) شرح آزمایش کیفی و مقادیر آن بر حسب سانتی متر مکعب یاد داشت شده است حجم آزمایش کم و جمعا ۵۰ سانتی متر مکعب است و صرفه جوئی در وقت و تهیه جواب بیمار بمدت زمان کم که از مزایای این روش میباشد نیز نشان داده شده است .

طرز اجرای آزمایش کمی نیز همانند آزمایش کیفی است با این تفاوت که سرم بیمار را پیشاپیش به نسبت های مختلف مانند $\frac{1}{5}$ و $\frac{1}{10}$ و $\frac{1}{20}$ و . . . رقیق نموده آنگاه با هر يك از این محلول های مختلف آزمایش کیفی بعمل میآید .

جدول ۱

نوله‌ها	شاهد		
	۱	۲	۳
سرم حرارت دیده بیمار	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵
آنتی ژن مطابق عیار	۰/۱۰	۰/۰۵	—
آب فیزیولوژی	۰/۰۵	۰/۱۰	۰/۱۵
ده دقیقه حرکت در تاتور ۱۲۰ دور در دقیقه و گرمی ۳۵ درجه سانتی گراد			
محلول که پلمان یک واحد	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰
ده دقیقه حرکت در تاتور ۱۲۰ دور در دقیقه و گرمی ۳۵ درجه سانتی گراد			
محلول سرم همولیتیک یک واحد	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰
گلوبول سرخ ۰.۲٪ گوسفند	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۰
ده دقیقه حرکت در تاتور ۱۲۰ دور در دقیقه و گرمی ۳۵ درجه سانتی گراد			

مشاهدات : در مجموعه سرم گوسفند انیکه آزمایش کازونی آنها مثبت و با مشاهدات نعی مطابق داشته است آزمایشهای کیفی و کمی وینبرگ با دو آنتی ژن یکی غشاء کیست (استاندارد جدید) و دیگری آنتی ژن مایع هیداتیک (استاندارد قدیم) بروش ام.سی.اف انجام شده نتایجی بشرح ذیل بدست آمده است.

جدول ۲ - مقایسه وینبرگ در هفتاد و یک نمونه سرم گوسفند آلوده بکیست هیداتیک با آنتی ژن غشاء و مایع هیداتیک که از تاریخ ۱۳۴۱/۱۳/۲۹ تا ۱۳۴۱/۹/۱۳ آزمایش شده اند

مایع هیداتیک			غشاء			نوع آنتی ژن
منفی	مشکوک	مثبت	منفی	مشکوک	مثبت	نتیجه آزمایش
۱۵	۲۳	۲۳	۸	۱۰	۵۳	تعداد موارد
۲۱	۳۲	۴۶	۱۱	۱۴	۷۵	چند درصد

از بررسی نتایج آمار بخوبی میتوان بحساسیت آنتی ژنی غشاء پی برد.
 (با توجه باینکه آنتی ژن غشاء ر آزمایشها به نسبت $\frac{1}{4}$ و گاهی $\frac{1}{8}$ رقیق شده و آنتی ژن مایع هیداتیک خالص بکاررفته است).

جدول ۳ - مقایسه عبارات آنتی ژنی ضمامه با مایع هیپدا آتیک در چهار
نمونه سرم انسان و حیوان دچار بکیتس هیپدا تیک

نوع سرم	انسان		گوسفند شماره ۳		گوسفند شماره ۴		گوسفند شماره ۱	
دقت آنتی ژن	غشاء	مایع کیتس	غشاء	مایع کیتس	غشاء	مایع کیتس	غشاء	مایع کیتس
خالص	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
۱ ۵	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++
۱ ۱۰	++++	-	++++	-	++++	++++	++++	-
۱ ۲۰	++++	-	++++	-	++++	-	++++	-
۱ ۴۰	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
۱ ۸۰	-	-	-	-	+++	-	++	-
۱ ۱۶۰	-	-	-	-	-	-	-	-

نتایج بدست آمده و مندرج در دوجداول بالا شاهد بارز بر حساسیت و قدرت آنتی ژن غشائی است که حتی برقت $\frac{1}{4}$ و $\frac{1}{8}$ هم نتیجه مثبت داده در صورتیکه نتیجه صحیح در مورد مایع کیست حداکثر بین رقت $\frac{1}{5}$ و $\frac{1}{1}$ می باشد (جدول ۳). در مورد رقت سرم (جدول ۴) نیز آنتی ژن جدید تا $\frac{1}{32}$ نتیجه مثبت بدست داده ولی با آنتی ژن مایع با همین رقت منفی مانده است (با توجه به خالص بودن آنتی ژن مایع و رقت آنتی ژن غشاء)

جدول ۵ - نمای آزمایش وینبرگ در سرم اشخاص معمولی است. از تاریخ ۱۳۴۰/۱۱/۲۲ تا ۱۳۴۱/۱/۲۰ تعداد ۱۶۳ نمونه سرم که با آزمایشگاه سرم شناسی دانشکده پزشکی برای آزمایش و اسرمن رسیده است مورد آزمایش وینبرگ با آنتی ژن جدید همچنان قرار گرفته و نتایجی بشرح زیر داشته است :

تعداد سرمهای آزمایش شده	منفی	مثبت
۳۳	۳۲	۱
۲۵	۲۳	۲
۱۱	۱۰	۱
۵۰	۵۰	-
۴۴	۴۳	۱
جمع کل ۱۶۳	۱۵۸	۵

(چون نتیجه آزمایش و اسرمن پنج سرم فوق نیز مثبت بوده است ، در اینصورت مثبت بودن آزمایش وینبرگ بی ارزش می باشد .)

بررسی جدول بالا اختصاصی بودن آنتی ژن غشائی را در سرم اشخاص آلوده نشده نشان میدهد . نظیر این آزمایش در روی سرم گوسفندان سالم نیز انجام شده و بررسی آن نتیجه اخیرا تایید کرده است . (نتایج مجموع این آزمایشها در دفتر بخش سرم شناسی دانشکده پزشکی موجود است)

بحث : آزمایش سرور آکسیون وینبرگ هر چند مانند واکنش درون پوستی کازونی آزمایش پرارزشی برای تشخیص کیست هیداتیک است ولی در بعضی موارد با وجود آلودگی مسلم نتیجه منفی بدست میدهد و دو عامل زیر را میتوان سبب آن دانست :

۱ - ایجاد نشدن آنتی کور در بدن بعلت سالم بودن جدار کیست و در نتیجه ترشح

نشدن مواد آنتی ژنی آن .

۲ . عدم قدرت و ناخالص بودن آنتی ژنهایی که تاکنون بکار برده شده است .
عامل دوم بویژه باید مورد توجه بیشتری قرار گیرد ، زیرا آنتی ژن مایع کیست که از قدیم بکار میرفته بععل گوناگون نتایج مطلوب را در آزمایشها بدست نداده ، موجب پیدایش اشباهاتی میشده است .

ضمنا چون نسبت، واد مشکله مایع کیست نسبت بکیستهای مختلف تفاوت دارد و بسته بموضع کیست یا میزبان آن متغیر است ، قدرت آنتی ژنی آنها نیز متفاوت میباشد . هم چنین وجود فرمانهای پرتئولیتیک و گلی کولیتیک مرتبا موجب تجزیه آلبومین و قند موجود در مایع کیست شده و پس از چندی فاقد خاصیت آنتی ژنی میشود . دوعامل اخیر نیز در بدست دادن نتایج غلط موثر میباشد . روی همین اصل کارشناسان ممالک مختلف بدنبال تهیه آنتی ژن بهتری رفته در نتیجه از عصاره آبگین و یا اتری غشاء و همچنین از عصاره تنیا، مایع سیستی سرک آلبومین مایع هیداتیک ، آنتی ژن پلی ساکارید که از کرمهای مختلف بدست میآید و محلول گرد اسکولکس برای تهیه آنتی ژن استفاده کرده اند . ولی در عمل عصاره تنیا بعلت واکنش مثبتی که حتی بعد از شش ماه از افزادن تنیا باقی است و نیز قدرت ضد مکملی قوی که خود آنتی-ژن دارد برای آزمایش وینبرگ بکار نمیرود . مایع سیستی سرک نیز بعلت رآکسیون گروهی وجوابهای مثبت غیر اختصاصی که در آلودگی به سیستی سرک و یا تنیاهای روده و حتی سیفیلیس دارد چندان مورد استفاده نیست .

آنتی ژنهای پلی ساکارید هم در ضمن اینکه تهیه شان بسیار مشکل و مفصل و با اتلاف وقت زیادی همراه است ، اغلب نتایج اختصاصی نداشته و واکنشهای متقاطع با پلی ساکارید کرمهای دیگر بدست میدهد .

هم چنین تهیه آلبومین مایع هیداتیک و پودر اسکولکس با اشکالات فنی زیادی مواجه است و برای آزمایشگاههای معمولی غیر از اتلاف وقت ثمر دیگری ندارد .

از این جهت بخش سرم شناسی بروش انستیتو پاستور پاریس از جدار کیست برای تهیه آنتی ژن بطریقه بسیار ساده و عملی ذکر شده در پیش استفاده کرده که تهیه آن در همه جا و برای همه کس مقدور میباشد بویژه که در تجارب مختلف نتایج نیکوئی از آن بدست آمده است .

در اینجا بيمورد نیست یاد آوری شود نتایج گرفته شده از اسکولکس که بروش آنتی ژن غشاء تهیه شده بود چندان رضایت بخش نبوده ، چه بواسطه سستی جدار اسکولسگها با سانی متلاشی شده سبب آزاد شدن آلبومین شان در مایع میشوند و در نتیجه وسعت زیاد سطح آنتی ژنی پدیده ثبوت کمپلمان بطور شایسته انجام نگرفته نتایج بعدی آنتی ژن مشکوک و اغلب غیر واقع

بوده است. همین عمل در مورد مایع هیداتیک نیز صادق است که بعداً ذکر خواهد شد. اما آنتی ژنی که با غشاء کیست هیداتیک در بخش سرم شناسی دانشکده پزشکی تهیه میشود آنتی ژنی است قوی که :

اولا - با افزودن مواد ضد عفونی (فنول) از رشد میکرو بها و تغییر پر و تئینهای آن جلوگیری شده و از این جهت نگاهداری آن بر مراتب آسان تر است و مانند آنتی ژن مایع هیداتیک قابل فساد نیست و بویژه در اثر فرمناهای گلیکولیتیک و پروتئولیتیک قند و آلبومین آن تجزیه نشده و از بین نمیرود. بنا بر این دوام و خاصیت آنتی ژنی آن مدتها ثابت باقی میماند و بخصوص که

چون قدرت آنتی ژنی آن نیز شدید است ($\frac{1}{40}$ یا $\frac{1}{80}$) بایک مرتبه تهیه میتوان آنرا مدتها نگاهداری کرده و بکار برد. در صورتیکه حداکثر مدت نگهداری مایع هیداتیک آنهم در یخبندان در حدود شش ماه است و بعد از این مدت فاقد خاصیت آنتی ژنی خواهد شد.

ثانیا - روش تهیه آن نسبت بسایر آنتی ژنهایی که تا کنون پیشنهاد شده است بسیار ساده تر میباشد و در آزمایش وینبرگ آنتی ژن بصورت امولسیون سطح کمتر، در نتیجه حساسیت بیشتری برای ثبوت کمپلمان ایجاد میکند. در صورتیکه محلول کلویید این خاصیت را کمتر دارد.

ثالثا - آمارهای مطالعاتی و تجربی که ذکر شد حساسیت کافی و اختصاصی بودن این آنتی ژن را نسبت بمایع هیداتیک نشان داده و برعکس عقیده قدما که غشاء را فاقد خاصیت آنتی ژنی میدانستند، آنتی ژنی است مطلوب که در عمل با نتایج بهتر و اشتباهات کمتر جوانب های اختصاصی تری میدهد. در ضمن بر طبق آنچه که در بخش سرم شناسی مورد بررسی قرار گرفته است خوشبختانه این آنتی ژن دارای اثرات ضد کمپلمان هم نیست.

خلاصه : واکنش ثبوت کمپلمان وینبرگ و حساسیت پوستی کازونی بهترین تستهای ایمونولوژی برای تشخیص کیست هیداتیک میباشد ولی آنتی ژنهایی که تا کنون بکار برده شده اند بعلت نداشتن حساسیت کافی در بعضی موارد با وجود کیست محرز نفوذ پذیر نتیجه مساعد بدست نمیدادند. بنا بر این برای بدست آوردن تشخیص مطمئن و حذف مثبتهای نادرست لازم است آنتی ژنی را بکار برند که از نظر بیوشیمیایی درست بوده و حداکثر حساسیت را داشته باشد. بهمین منظور بخش سرم شناسی دانشکده پزشکی غشاء کیست هیداتیک را جدا نموده با خرده شیشه و جیوه تمیز بوسیله آزیتاتورکان حرکت داده، پس از چرخاندن در سانتریفوژور مایع رویه را بعنوان آنتی ژن هیداتیک بکار برده است و با آزمایشهای گوناگونی که در جدول پیش نگاشته شده است حساسیت کافی و اختصاصی بودن آن را نسبت به آنتی ژن

های دیگر بویژه مایع کیست هیداتیک بخوبی نشان داده مزایای آن را یاد آور شده است
 بخصوص که نگهداری این آنتیژن بر مراتب آسان تر و قدرت آن نیز پایدارتر است .

Bibliographie

- 1) Deschien, R. Melle Benex, J. et Melle Lambault, E. (1961) .
 Les conditions pratiques d' utilisation des antigènes parasitaires
 stabilisés dans le diagnostic immunologique de helminthiases.
 Ann. Inst. pasteur., 6, 951.
- 2) Thomas, Charles, C. (1956). «Manuel of Clinical Laboratory
 methods. », Forth edition seventh printing. P. 136. Publisher
 Springfield. Illinois.
- 3) Kolmer. Spaulding. Robinson. (1952). «Approved labor-
 atory technic.», P. 849.
 Fifth edition. Appleton Century Crofts. London.
- 4) Calmette, A. Boquet, A. Nègre, L. et Bretey, J. (1948) .
 «Manuel Technique de Microbiologie et de sérologie.», P. 614-
 616. 4ème edition. Masson et Cie. Paris.
- 5) Lafont, Agasse, E. (1929). «Les Applications Pratiques du
 Laboratoire à La Clinique. ». Quatrième édition. Masson et Cie.
 Paris.
- 6) Mirdamadi, H. (1959) . A rapid Method of Complement
 Fixation Test for Syphilis.

Acta Medica Iranica. III. Teheran.

(۷) حسین سعادت زاده اساس آزمایش وینبرگ و کازونی و بررسی نتایج آن در افراد
 سالم. شماره ۷ سال ۱۶ مجله دانشکده پزشکی تهران. صفحه ۵۵۰