بهترین شرایط برای واکنش ثبوت کمپلمان مخصوص تشخیص سیفیلیس

نگارش دکتر حسن میردامادی *

از سال ۱۹۰۵ که واکنش ثبوت کمپلمان برای تشخیص سیفیلیس توسط واسرمان نایسر و بروك بمیان آمد پنج تغییر و یا اصلاح بزرگ وبسیاری اصلاحات کوچك بوسیله عده‌ای از کارشناسان دیگر بر آن انجام گرفت ـ در آغاز شیره الکلی بافت‌های طبیعی بدن ومعمولا بافت قلبی بجای شیرهٔ آبکین جگر سیفلیسی بکار رفت. آنگاه کارشناسانی مانند برونینگ و کروئیك شانك ـ ماك کنزی وزاکس دریافتند که براثر 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 پیش‌از افزایش مجموعه حلاله(سیستم همولی‌تیك) بیشترین اندازه کمپلمان ربایش یافته باشد

اصلاح چهارم بسال ۱۹۴۱ توسط خانم پنك‌بورن بعمل آمد ونامبرده مادهٔ فسفولی‌پیدی را که کاردیولی‌تین نامیده شده کشف نمود . این ماده همینکه بمقدار متناسب با لسی‌تین خالص وکلسترل آمیخته شود ترکیب مخصوصی بدست میدهد که آنتی‌ژن کاردیولی پینی نام دارد وبا مقایسه با آنتی‌ژن‌های لیپیدی معمول نتایج اختصاصی بیشتری بدست میدهد بالاخره پنجمین ویا آخرین اصلاح بسال ۱۹۴۹ توسط نلسون و مایر انجام گردید و نامبردگان آنتی‌ژن واقعی سیفیلیس یعنی ترپونما پالیدارا جانشین آنتی‌ژنهای غیرحقیقی ویا هاپتن‌های لیپیدی ساختند وبدین سان پس از نیم قرن درحقیقت همان آنتی‌ژن اول را که واسرمان و همکارانش در آغاز بکاربرده بودند دوباره به

* استاد دانشکده پزشکی

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-12]

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

دراینجا باید یادآوری نمود که ارزش تشخیصی یك روش مخصوص آزمایشی ثبوت کمپلمان بیش ازهرچیز وابسته باختصاصی بودن نتایج آن یعنی بدست‌دادن جوابهای مثبت در حالات طبیعی وغیرطبیعی بجزسیفیلیس ودرهمان حال حساسیت یعنی نسبت مواردی ازسیفیلیس است که بکمك روش مخصوص مشخص میگردد .

بدیهی است همه روش‌های مختلف ثبوت کمپلمان همانند و بـر یك اساس استوار است و تنها برای استاندار نمودن مواد و لوازم وعوامل فیزیکی مؤثر و نتایج حاصل از ربایش است که اختلافاتی درطرز اجرای آنها بوجود آمده است البته بهترین ومناسب‌ترین شرایط و کیفیات برای واکنش دارای اهمیت بسیار است زیرا به‌نسبتی که کمپلمان بیشتری بر ترکیب آنتی‌ژن و پادتن موجود در سرم بیمار بپیوندد به‌همان نسبت نتایج حاصل آمده ازآن روش حساسیت بیشتری پیدا میکند .

اکنون بـاید بخاطر داشت که بغیر از آنتی‌ژن ورآژین سرم عواملی دیگر نیز برنتیجه آزمایش مؤثر شناخته شده کـه درآنمیان غلظت محیط ازحیث الکترولیت، میزان pH، مقـدار گرمی و مدتی که آزمایش باید درآن بماند ونیز چند عامل دیگر رابایددرنظر گرفت .

۱ـ غلظت محیط ازحیث الکترولیت

مناسب‌ترین غلظت نمکی برابر با ۰/۸۵ است که معمولا بکار میرود اما نباید فراموش کرد که عیار کمپلمان برحسب غلظت مولکولی محیط ازحیث نمك تفاوت میکند و در این باره هیدل برگر چنین میگوید « من اطمینان کامل دارم که این عامل (یعنی غلظت نمکی محیط) غالباً سبب اشتباه نتایج آزمایش درآزمایشگاههای مخصوص تشخیص‌های پزشکی می‌شود زیرا محلول نمکی بطور تقریب وبا ترازوهای غیرحساس ودقیق توزین میگردد وظاهراً دو نمونه‌ازمحلولهای نمکی‌دارای مقدار یکسانی‌ازاین ماده نیست» .

۲ـ واکنش محیط ازحیث pH

برحسب نظریه مایر مناسب‌ترین pH برای همولیز pH برابر با ۸ر٤ـ۶ر۷ است اما نتایج رضایتبخش همچنان با pH برابر با ۶ر۸ بدست می‌آید ودر میان این دو اندازه pH اختلافات کمی دیده میشود .

۳ـ میزان گرمی ومدت انکوباسیون

این موضوع مسلم است که هر اندازه مخلوط سرم وآنتی‌ژن وکمپلمان بیشتر درمجاورت

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-12]

یکدیگر بماند بهمان اندازه بمقدار معین آنتی‌ژن وپادتن که ترکیب‌یافته باشد کمپلمان‌بیشتری ربایش پیدا میکند و علاقمندی و وابستگی بربایش‌یافتن براین ترکیب بطورمحسوس با افزایش میزان گرمی بالاتر می‌رود عامل محدود کننده‌ای که درمیان این دوکیفیت یعنی مدت و حرارت وجود دارد عبارت از خراب‌شدن و از میان رفتن خودبخودی کمپلمان است کـه از صفر تا بیست درجه سانتی گراد بآهستگی صورت میگیرد و بتدریج افزون میگردد و درگـرمی ۴۰° بسیار سریع است. نباید فراموش کرد که بواسطه همین خراب‌شدن و نابودگـردیدن کمپلمان است که مدت انکوباسیون درگرمی ۳۷° را درحدود نیم ساعت تعیین نموده‌اند.

بدیهی است که واکنش ویا بهم پیوستن آنتی‌ژن‌های محلول و پادتن وابسته بآنها سریع انجام می‌یابد اما درمورد آنتی‌ژن‌های نامحلول مانند مخلوطهای میکربی ویا شیرابه‌های‌لیپیدی چنین‌بنظر میرسد که واکنش آهسته‌تراز آنتی‌ژنهای‌محلول‌صورت گیرد اما بوسیله حرکت دورانی پیوسته میتوان واکنش را سرعت داد.

۴ـ شرایط وکیفیاتی دیگر ـ اثر حرکت

ازآنجائیکه حرکت‌مخلوطی ازسرم‌وآنتی‌ژن سبب سرعت‌یافتن واکنش‌های‌پرسی‌پی‌تاسیون وآگلوتی‌ناسیون‌میشود هیچ دلیلی نیست قبول نکنیم که این عامل تأثیری بر واکنش ثبوت کمپلمان، که برحسب فرضیه هیدل‌برگر عبارت است از ترکیب‌وبهم پیوستن قسمتهای تـرکیب شونده کمپلمان با شبکه ویا چهارچوبه‌ای که از قرارگرفتن مولیکولهای پادتن و ذرات‌آنتی‌ژن بصورت متناوب پدیدار میگردد، نداشته باشد چنانکه معلوم است در مواردی که‌آنتی‌ژن وپادتن بهم پیوست شود مولکولهای کمپلمان نیز بدانها ربایش می‌یابد وترکیب ضعیفی که میان پادتن وکمپلمان وجود دارد پایدارتر می‌گردد بنابراین هرعامل مکانیکی که بتواند بهم پیوستن‌سریع ومرتب‌آنتی‌ژن وپادتن یعنی در واقع پیدایش شبکه را تسریع و مساعدت کند خود بخود سبب ربایش یافتن سریع ومرتب کمپلمان بشبکه حاصل از ترکیب‌پادتن وآنتی‌ژن میگردد.

در اینجا باید یادآوری کرد که‌آزمایش‌های بسیار سریعی که در سابق بوسیله تنی چنداز کارشناسان بمیان آمده بود فقط در مواردی نتایج مثبت می‌داد که سرمها دارای مقدار زیاد راژین سیفیلیس‌بود در صورتیکه با سرمهای دارای مقدار متوسط رآژین مدت درازتری برای ربایش کمپلمان لازم بود.

بهرجهت باید در نظر داشت که ناپایداری کمپلمان ایجاب میکند که این ماده رادرجریان آزمایش هرقدر ممکن باشد بحالت فعال نگاهدارند بنابراین حرکت‌آنهم حرکت شدیدی که در قدیم بکار میرفت نه‌تنها سبب کاهش فعالیت کمپلمان می‌گردید بلکه در همان حال سبب جداشدن

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-12]

آنتی ژن ازپادتن نیزمی شد در صورتیکه هر گاه درآغاز مخلوط آنتی ژن وپادتن راباآهستگی حرکت دورانی‌دهندآنگاه کمپلمان را بدانها بیفزایند ودوباره درگرمی معتدل مخلوط راحرکت دهند بهترین کیفیات و شرایط برای برخورد آنتی‌ژن وپادتن وربایش کمپلمان فراهم آمده وبدین سان پادتن یکفواخت وسریع بآنتی‌ژن چسبیده ، کمپلمان نیز بدان ترکیب می‌پیوندد بی‌آنکه در این‌میان‌از فعالیت‌اصلی‌خودبیفتد.

از این گذشته ظاهراً در موردآنتی‌ژن‌های‌لیپیدی اینگونه مخلوطها اجزاء فعاله کمپلمان را بشکل غیرقابل بازگشت بخودجذب‌میکنند وبدین‌سان سبب‌پیدایش واسرمان‌های مثبت‌نادرست میگردند.

در این‌جا باید یادآوری نمود که افزایش کمپلمان در هنگام نخستین‌آزمایش غیرلازم‌است زیرا چنانکه می‌دانیم کمپلمان بآنتی‌ژن تنها ترکیب نمی‌شود ونسبت بپادتن نیز علاقه ندارد اما بترکیب حاصل از برخورد آنتی‌ژن وپادتن علاقه بسیار دارد بنابراین دو هنگام آزمایش ثبوت کمپلمان با مزایائی ممکن است بسه هنگام تقسیم شود:

درهنگام اول آنتی‌ژن وسرم رابا یکدیگردرآمیخته وبوسیله حرکت دورانی‌آهسته‌ترکیب آنهاراتسریع‌میکنند. درهنگام‌دوم کمپلمان‌رابه‌مخلوط آنتی‌ژن‌وسرم‌میافزایندوزمان کوتاهی‌مخلوط را درگرمی معتدل حرکت دورانی‌می‌دهندتا بدینسان کمپلمان که‌نه براثر گرمی‌ومدت۳۷° بمدت کوتاه نیم ساعت ونه براثر بحالت محلول ماندن در جریان یکشب در ۶° از فعالیت اصلیش چیزی کاسته‌نشده است مجموعه آنتی‌ژن وپادتن‌می‌پیوندند. ـ در هنگام سوم مجموعه حلال یعنی سرم همولی‌تیك و خون گوسفند افزوده میشود و باز هم مخلوط رابمدت کوتاه درگرمی معتدل می‌چرخانند ودر این صورت هرگاه بواسطه نبودن پادتن در سرم مورد آزمایش کمپلمان آزاد مانده ومورد مصرف پیدا نکرده باشد درحالیکه فعالیت‌اصلی خود را هنوز هم ازدست نداده است به‌گویچه‌های‌سرخ‌حساس‌شده‌چنانکه‌درسابق‌بتفصیل‌نگاشته شده‌است‌اثرنموده‌وآنها رامنحل میسازد.

در اینجا باید یادآوری‌نمود که تنی‌چند ازکارشناسان بتازگی دریافته‌اند که‌درآزمایشهای نلسون‌مایر وایمن‌فلوئورسان حرکت دورانی دارای این مزیت است که مدت لازم برای‌بحرکت کردن ترپونم وهمچنین ترکیب شدن‌پادتن فلوئورسان‌رابر آنتی‌ژن کوتاهتر میکند.

براساس همین اصول وکیفیات است که بسال ۱۹۵۲ در این بخش‌آزمایش ثبوت کمپلمان برای تشخیص سیفلیس‌معمول گردیده‌است که‌روش اجرای‌آن درمقالات سابق‌مشروحاً ذکرشده‌است

مواد‌ولوازم‌کار:

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

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-12]

۲ـ از مخلوطی از کاردیولی پین‌ولسی‌تین وکلسترول با عیار ۱/۸۰ بعنوان آنتی‌ژن استفاده میشده است.

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

٤ـ بعنوان سیستم مشخص و معین آنتی‌ژن و پادتن سرم ضد سفیده تخم مرغ حاصل از خرگوش و محلول $\frac{۱}{۱۰۰}$ سفیده تخم مرغ بکار میرفته است

نخستین ردیف آزمایشها:

عیار کمپلمان با استفاده از یك آنتی‌ژن ویك‌حجم‌کلی وسه‌روش مختلف‌انکوباسیون

کمپلمان	۱۴ ساعت وسردی ۴ درجه	نیم‌ساعت درگرمی ۳۷درجه	ده‌دقیقه‌درگرمی‌در۳۵درجه
اولین نمونه	۱٦ واحد	۱٦ واحد	۳۲ واحد
دومین نمونه	۳۲ «	۳۲ «	٤۸ «
سومین نمونه	۲٤ «	۲٤ «	۳۲ «

دومین ردیف آزمایش‌ها :

چند درصد موارد مثبت‌های نادرست واسرمان:با استفاده از ٥۱٤ سرم انسان و ٦ سرم حیوان وسه روش مختلف انکوباسیون.

	۱۴ ساعت درسردی ٦درجه	نیمساعت درگرمی۳۷۰ ۳۷ درجه	ده دقیقه‌حرکت‌دورانی‌در ۳۵درجه
مثبت	٥٦	٥٦	٥٦
منفی	٤٦۰	٤٦۲	٤٦٤
مثبت‌نادرست	٤	۲	۰
وچنددرصد	(۰/۰ر۷٦)	(۰/۰ر۳۸)	(۰/۰)

ناگفته نماند که از ٦سرم حیوان(دوسرم گوسفند وچهارسرم خرگوش) در مورد نتیجه مثبت نادرست ، سرم گوسفند در آزمایش‌های انکوباسیون ٦۰بدست آمده است .

نتیجه: درآزمایش‌ثبوت کمپلمان هرگاه بجای نیم ساعت قرار دادن سرم وآنتی‌ژن و کمپلمان درگرمی ۳۷° ویا نگاهداشتن این مخلوط بمدت یك شب در برودت ٦°آن را بمدت کوتاه درگرمی معتدل بچرخانند نتیجهٔ بهتری بدست میآید .

همچنین بهتر این است که‌آزمایش بجای دو هنگام معمول در سه هنگام ، اول مخلوط نمودن آنتی‌ژن‌وسرم ـ دوم‌افزایش کمپلمان ـ سوم‌افزایش خون گوسفند حساس‌شده بانجام برسد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-12]

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 Diagnosisof 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 Pnd 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

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-12]