مقدمه

سرولوژی (Serology) از دو واژه سرم (Serum) و لوژی (Logy) به معنای شناختن و شناسایی تشکیل یافته است. به عبارت دیگر، سرولوژی به کلیه آزمایشات و مطالعاتی که بر روی سرم انسان و یا حیوانات خونگرم دیگر انجام می گیرد، اطلاق می شود. امروزه آزمایشهای سرولوژی بالینی، یکی از روشهای سریع و آسان در تشخیص بیماریها می باشد. اساس همه آزمایشهای سرولوژی، واکنش آنتی بادی اختصاصی (Specific antibody) به آنتی ژن مربوطه می باشد. آنتی ژن مورد نظر می تواند باکتری، ویروس، گلبول قرمز، پروتئین، هورمون و یا چیزهای دیگر باشد. اتصال آنتی بادی به آنتی ژن یک واکنش اختصاصی، دو طرفه و برگشت پذیر می باشد، زیرا در اتصال آنتی بادی به آنتی ژن، پیوندهای ضعیف (پیوندهای هیدروفوب، هیدروژنی، یونی و واندروالس) مشارکت دارند.برای یادآوری ابتدا مختصری از واژه ها ونکات کلیدی را یاد آوری می کنیم.

ایمنوگلوبولین ها (آنتی بادی ها)

ایمنوگلوبولین ها متشکل از چهار زنجیره پپتیدی هستند که عبارت از دو زنجیره سنگین و دو زنجیره سبک یکسان می باشد. این زنجیره ها توسط پیوند های دی سولفیدی بین زنجیره ای به یکدیگر متصل می شوند. هر کدام از این زنجیره ها از یک قسمت ثابت و یک قسمت متغییر تشکیل می شوند. و هر زنجیره دارای قسمت های به هم پیچیده ای به نام Domain می باشد که حالتی کروی (گلوبولار) دارد. دومن های قسمت متغیر زنجیره ها به آنتی ژن وصل می شوند. دومن های قسمت ثابت زنجیره های سنگین (قسمت Fc) دارای اعمال بیولوژیکی از قبیل عبور از جفت، قدرت فعال نمودن کمپلمان و اتصال به سلول های ایمنی می باشد. در بدن یک انسان پنج نوع اصلی از زنجیره های سنگین داریم که ایجاد پنج کلاس ایمونو گلوبولینی می کنند، IgG فراوان ترین ایمنوگلوبولین می باشد این نوع ایمنوگلوبولین کمپلمان را فعال کرده و به سلول های ایمنی متصل می گردد و نیز توانائی عبور از جفت را دارا می باشد.

IgA بیشتر بصورت منومر در پلاسما وجود دارد ولی در ترشحات سروزی و مخاطی بصورت دایمر یافت می شود و بیشترین نقش را در دفاع از سطوح مخاطی خارجی ایفا می کند.

IgM یک مولکول پنتامری است که بیشتر در داخل عروق یافت می شود و اولین آنتی بادی است که در جریان پاسخ ایمنی تولید می گردد. به علت ظرفیت زیاد، این آنتی بادی یک آگلوتیناتور بسیار موثر برای باکتری ها و دیگر آنتی ژن های ذره ای می باشد.

IgD بیشتر بر روی لنفوسیت های B بالغ مستقر بوده و احتمالاً به عنوان رسپتور عمل می کند.

IgE به طور محکم به ماستوسیت ها متصل می شود. در این حالت برخورد آن با آنتی ژن باعث تخلیه گرانول های ماستوسیت ها می شود. IgE در عفونت های انگلی نقش مهمی دارد و مسئول بروز علائم آلرژی نیز می باشد.

بر اساس اختلافات زنجیره های سنگین بعضی از کلاس های آنتی بادی ها را می توان به زیر کلاس هایی تقسیم بندی نمود.

آنتی ژن

آنتی ژن ماده ای است که وقتی وارد بدن شود بدن آن را به عنوان ماده بیگانه بشناسد و متعاقب این شناسایی یا علیه آن آنتی ژن واکنش نشان دهد (مثلاً تولید آنتی بادی) یا اینکه یک حالت بی پاسخی (تولرانس) پدید آید.

آنتی ژن های سبک (با وزن مولکولی کمتر از 5000 دالتون) به ندرت باعث آنتی بادی سازی می شوند و هاپتن (Hapten) نامیده می شوند. هاپتن ها با اینکه باعث آنتی بادی سازی نمی شوند، اما به هنگام اتصال به مولکول درشت تر می توانند باعث تحریک تولید آنتی بادی گردند. به عنوان یک قانون کلی هر چقدر مولکولی درشت تر و پیچیده تر باشد آنتی ژن قوی تری است.

پروتئین ها به خصوص با وزن مولکولی بیش از ده هزار دالتون خاصیت آنتی ژنی قوی داشته و می توانند باعث پاسخ های ایمنی قوی شوند. میکروارگانیسم ها و فرآورده های آنها، گرده های گیاهی، بافت ها و سلول های افراد دیگر و گاهی اوقات در شرایط غیر طبیعی بعضی از سلول ها و بافت های خودی می توانند باعث بروز پاسخ ایمنی بشوند.

البته در ایمونولوژی نظری توضیح داده می شود که تمامی سطوح یک ماده بیگانه خاصیت آنتی ژنیک ندارد بلکه فقط قسمت هایی از این ماده قادر است که سیستم ایمنی را تحریک نماید، این قسمت ها را شاخص های آنتی ژنیک (Antigenic Determainent) یا اپی توپ (Epitop) می گویند و عاملی که باعث تمایز آنتی ژن ها می شود تنوع و تعداد اپی توپها است. هر آنتی ژن، اپی توپ های مخصوص خود را دارد، با این حال اپی توپ هایی هستند که بین دو آنتی ژن یا چند آنتی ژن مشترک هستند. شناسایی اپی توپهای مشترک بین آنتی ژن های مختلف در تفسیر آزمایشهای سرولوژی اهمیت زیادی دارد. آنتی بادی های تولید شده علیه یک آنتی ژن بطور اختصاصی عمل می کنند بدین معنی که این آنتی بادی ها منحصراً به آنتی ژنی که باعث تولید آنها شده است متصل می گردند. با این حال گاهی اوقات وجود اپی توپ های مشترک بر روی آنتی ژن های مختلف باعث واکنش های متقاطع (Cross Reaction) می شود.

واکنش های آنتی بادی – آنتی ژن

مکانی که اتصال آنتی بادی به آنتی ژن صورت می گیرد. جایگاه اتصالی آنتی ژن (Antigen-Binding Site) یا پاراتوپ (Paratop) نامیده می شود. این جایگاه در اثر چین خوردگی ناحیه متغییر زنجیره های سبک و سنگین مولکول آنتی بادی بوجود می آید. این محل، اتصال فضائی را بوجود می آورد که شاخص آنتی ژنیک (Epitope) در آن قرار گرفته و ارتباط نزدیکی بین مولکول های اسید آمینه پاراتوپ و اپی توپ بوجود می آید، سپس نیروهای مختلف با انرژی کم این دو قسمت را به هم متصل می کنند.

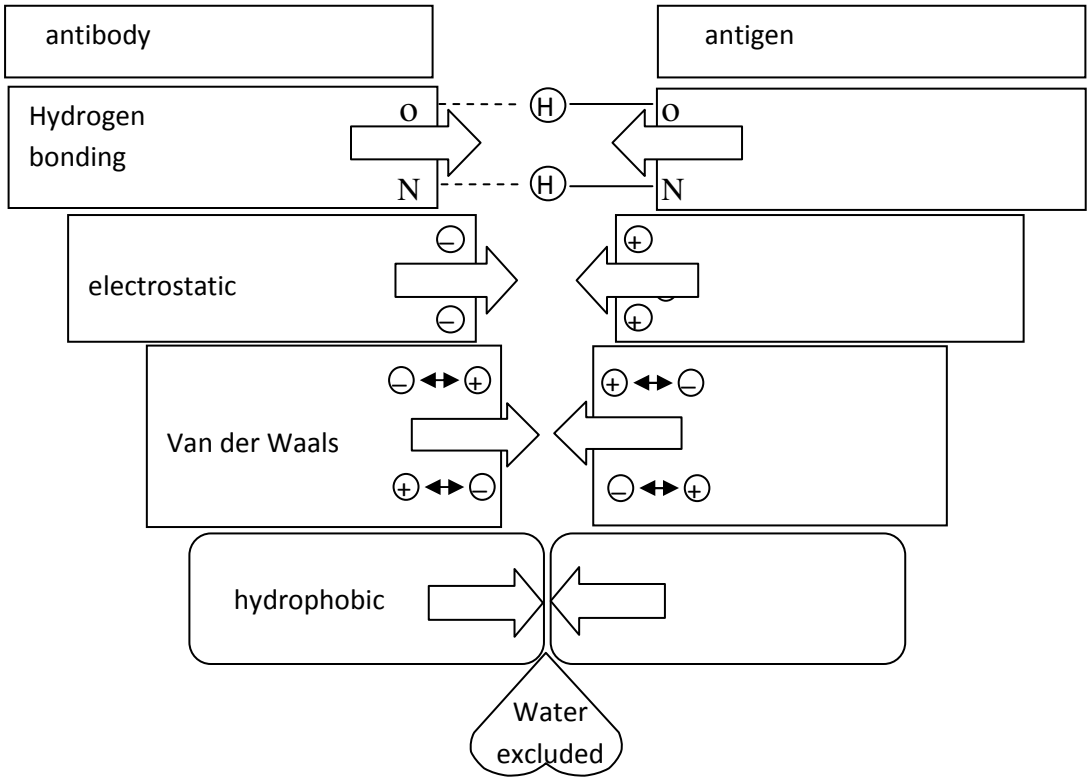
این نیروهای کم انرژی که سبب اتصال آنتی ژن و آنتی بادی می گردند عبارتنداز:

1- **نیروی الکترواستاتیک:** این نیروها مربوط به جاذبه بین گروه های یونی زنجیره های جانبی اسید های آمینه سازنده پاراتوپ و اپی توپ می باشد که دارای بار مخالف می باشند. نیروهای جاذبه ای دو گروه یونی مخالف نسبت عکس با مجذور فاصله این دو بار دارد. ($F \alpha \frac{1}{d^2}$)

2- **پیوند ئیدروژنی:** در این حالت یک اتم ئیدروژن سبب اتصال دو مولکول می گردد و می تواند بین گروه های OH، NH2، COOH پاراتوپ و اپی توپ ایجاد شود.

3- **پیوند هیدروفوبیک:** گروه های هیدروفوبیک بین پاراتوپ و اپی توپ تمایل دارند که به یکدیگر نزدیک شده و آب بین خود را کنار می زنند. محاسبه شده که نیروی هیدروفوبیک بیش از پنجاه درصد از کل نیروی لازم برای پیوند آنتی ژن و آنتی بادی را فراهم می سازد.

4- **نیروی واندروالس:** این نیرو وقتی که اتم بطور فشرده در کنار هم قرار گیرند ایجاد می شود. یک اتم ممکن است بطور زود گذر و دوره ای دو قطبی شود و این خاصیت در مولکول مجاور القاء شود در نتیجه این دو واحد دو قطبی یکدیگر را جذب خواهند کرد.



میل ترکیب یا تمایل یک پاراتوپ برای فقط یک اپی توپ Affinity نامیده می شود. افینیتی فقط در مورد ترکیب آنتی ژن یک ظرفیتی (که فقط دارای یک اپی توپ باشد) یا هاپتن یک پاراتوپ آنتی بادی به کار برده می شود. اگر هر دو جایگاه اتصال یک آنتی بادی (دو پاراتوپ) به دو شاخص آنتی ژنیک موجود را قدرت ترکیب یا Avdity می نامند.
بدیهی است که اویدیتی یک آنتی بادی برای یک آنتی ژن بستگی به افینیتی هر کدام از پاراتوپ ها برای اپی توپ های موجود بر روی آن آنتی ژن دارد.

اساس آزمایش های سرولوژی

آزمایش های سرولوژی یکی از روش های سریع و آسان در تشخیص بیماریها و تعیین مراحل بیماریها می باشند. اساس این آزمایش ها اتصال آنتی بادی اختصاصی (Specific Antibody) به آنتی ژن مربوطه می باشد. آنتی ژن مورد نظر می تواند باکتری، ویروس، گلبول قرمز، پروتئین، هورمون ویا چیز های دیگر باشد.
اتصال آنتی ژن به آنتی بادی یک واکنش اختصاصی، دوطرفه و برگشت پذیر می باشد.

$$[Ag] + [Ab] \underset{K2}{\overset{K1}{\rightleftharpoons}} [AgAb]$$

پیوند Ag و Ab دارای ضریب اتصال (K1) و ضریب تجزیه (K2) می باشد ولی در یک زمان خاص یک ثابت تعادل دارد که می توان آن را از فرمول زیر بدست آورد، هر قدر این ضریب بالاتر باشد میل ترکیبی آنتی بادی برای اتصال به آنتی ژن بیشتر است.

$$K \equiv \frac{[Ag\ Ab]}{[Ag]\ [Ab]} \quad \equiv \frac{K1}{K2}$$

منظور از اختصاصی بودن این است که هر آنتی بادی برای یک شاخص آنتی ژنیک بطور اختصاصی عمل می کند و این اختصاصی بودن علاوه بر ساختمان اولیه آنتی ژن (توالی منومرهای سازنده آنتی ژن) به وضعیت فضائی آن آنتی ژن نیز وابسته است. مثلاً اگر یک ماده با ساختمان حلقوی یا هلیکس سبب تحریک ایجاد آنتی بادی شود، آنتی بادی تولید شده فقط با فرم حلقوی ترکیب خواهد شد و اگر آن آنتی ژن حلقوی را به صورت خطی (رشته ای) در آوریم دیگر واکنشی بین آنتی بادی و آنتی ژن صورت نخواهد گرفت.

واکنش های متقاطع (Cross-reaction): اگر بر روی یک ماده آنتی ژنیک A چند اپی توپ متفاوت وجود داشته باشد، متعاقب تزریق این ماده به حیوان برای هر اپی توپ یک آنتی بادی مخصوص ساخته می شود که قادر است با همان اپی توپ واکنش نماید، و در این صورت مجموعه ای از آنتی بادی های مختلف بوجود می آید که به آن آنتی سرم می گوییم.

حال اگر ماده آنتی ژنیک B را در نظر بگیریم که از نظر ساختمانی در یک اپی توپ با آنتی ژن A مشترک است و در بقیه اپی توپها با آن متفاوت باشد، اگر آنتی سرم ضد آنتی ژن A را روی آنتی ژن B بریزیم آن آنتی بادی که برضد اپی توپ مشترک حاصل شده است با آنتی ژن B واکنش می کند ولی با اپی توپ های دیگر واکنشی صورت نمی گیرد، در این حالت گفته می شود که آنتی ژن A را روی آنتی ژن B دارای واکنش متقاطع هستند و این وضعیتی است که در آزمایش های سرولوژیک تشخیص عفونت های باکتریایی و ویروسی بایستی در نظر گرفته شود. مثلاً آنتی بادی تولید شده بر ضد سالمونلاتیفی (متعاقب آلودگی با این میکروب) می تواند سالمونلا پاراتیفی A واکنش نماید و در نتایج آزمایش تاثیر بگذارد.

عواملی که در واکنش اتصال آنتی ژن و آنتی بادی دخالت دارند:

1- **قدرت اتصال آنتی بادی به آنتی ژن (Affinity):** هر چقدر قدرت اتصال آنتی بادی به آنتی ژن محکم تر باشد، کمپلکس آنتی ژن و آنتی بادی پایدارتر است و مشکل تر از یکدیگر جدا می شوند.

2- **PH محیط:** مناسب ترین PH برای واکنش های سرولوژی PH=7.2 می باشد در PH پائین تر از 7/2 اتصال آنتی بادی به آنتی ژن ضعیف می باشد. (البته در PHهای بالاتر {تا حدود 8/6}) نیز اتصال آنتی ژن به آنتی بادی امکان پذیر است.

3- **قدرت یونی محیط (Ionic Stren):** عکس العمل های سرولوژی در محیطی که فاقد الکترولیت ها باشد صورت نمی گیرد. قدرت یونی در حقیقت مولاریته نمک های محلول است که آنتی ژن و آنتی بادی در آن محلول قرار

دارند. چناچه غلظت نمک زیاد باشد باعث رسوب آنتی بادی و آنتی ژن پروتئینی می شود. معمولاً سرم فیزیولوژی 0/15 مولار و یا تامپون فسفات نمکی (PBS=Phosphate Buffer Saline) با قدرت یونی 0/02 مولار و PH=7.2 برای رقیق کردن سرم بیمار و مطالعه عکس العمل های سرولوژی بسیار مناسب است.

4- **زمان انکوباسیون (Incubation time)**: اتصال مولکول های آنتی ژن به آنتی بادی معمولاً به سرعت و در عرض چند ثانیه صورت می گیرد ولی برای تشکیل کمپلکس های قابل مشاهده با توجه به نوع آزمایش مدت زمانی لازم است. بطور کلی چناچه آنتی بادی از کلاس IgM و مولکول های آنتی ژن درشت باشند زمان لازم برای دیده شدن واکنش های آنتی ژن و آنتی بادی کوتاه تر است.

5- درجه حرارت: در حرارت بالا ممکن است تغییراتی در کنفورماسیون آنتی بادی رخ بدهد بطوریکه اپی توپها به خوبی شناسائی نشوند ولی در حرارت 60 درجه سانتیگراد غیر از این مسئله شکستن پیوند ها را داریم در درجه حرارت 37 درجه سانتیگراد واکنش های سرولوژی سریعتر قابل رویت می باشند. در هر واکنش بایستی نوع آنتی بادی ها را در نظر گرفت و با توجه به آن حرارت را تنظیم نمود.

6- **تاثیر حرکت دادن (Stirring)، تکان دادن (Shaking) و سانتریفوژ کردن (Centrifugation)**: برای سریعتر مشاهده کردن واکنش های قابل رویت آنتی ژن و آنتی بادی پس از مجاورت و مخلوط کردن آنها از راه های مختلفی می توان کمک گرفت.

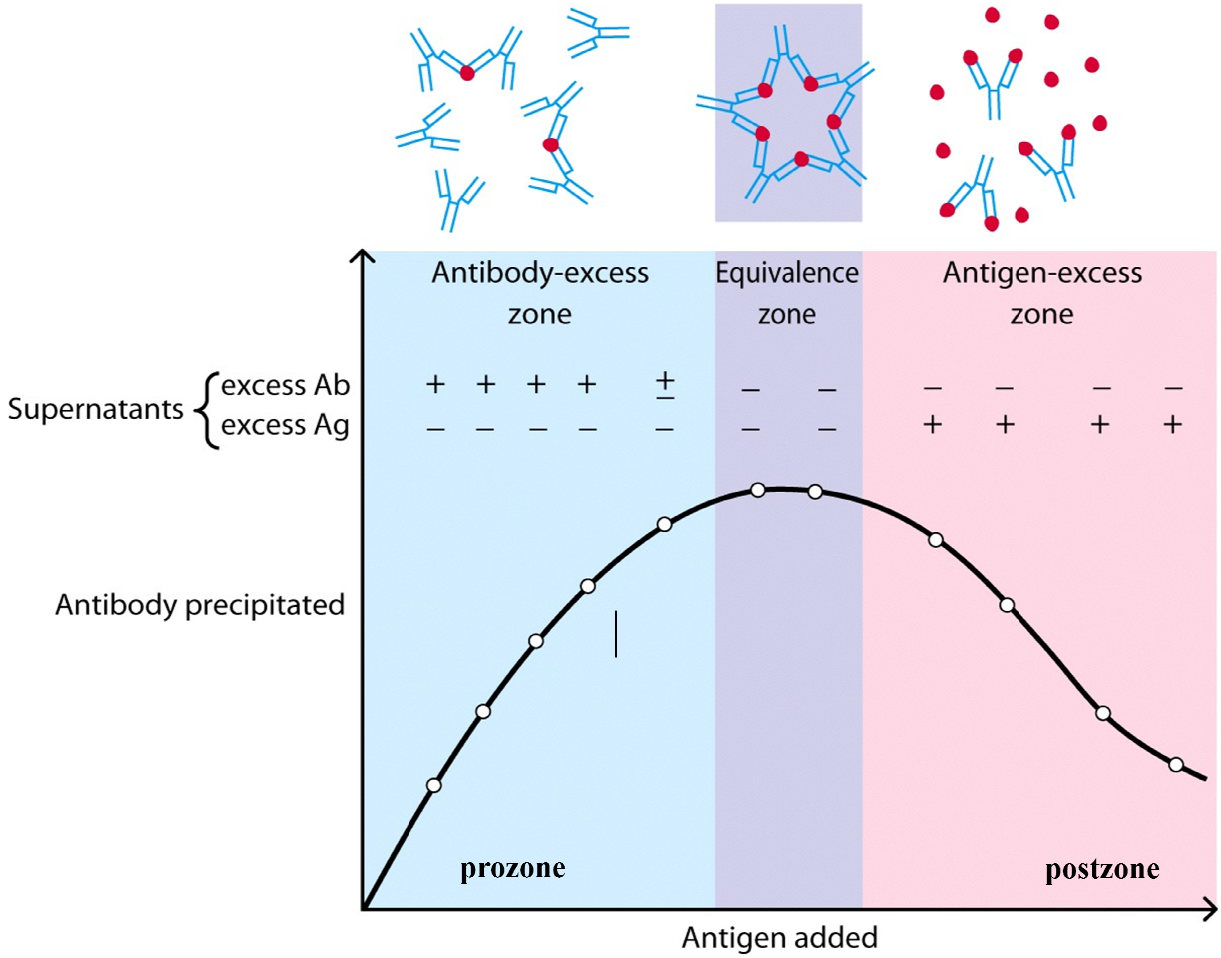
در صورتی که آنتی ژن و آنتی بادی بر روی لام مخلوط شده باشند می توان با حرکت دورانی آرام، لام را حرکت داد. اگر آنتی ژن و آنتی بادی در لوله آزمایش بر روی هم ریخته شده اند می توان با تکان دادن لوله، ظاهر شدن واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی را تسریع کرد. گاهی اوقات لازم است تا مولکول های آنتی ژن و آنتی بادی با فشار در مجاورت یکدیگر قرار گیرند تا عکس العمل بین آنها صورت گیرد. برای این کار می توان از سانتریفوژ کمک گرفت.

7- تاثیر مواد احیاء کننده (Reducing Agents): با اضافه کردن مقدار معینی از یک ماده احیاء کننده (2- مرکاپتواتانل یا دی تیو تریتول) بیشتر کلاس های آنتی بادیها تجزیه می شوند و فقط IgG سالم می ماند. بنابراین با اضافه کردن این مواد می توان مقدار IgG و مراحل بیماری را مطالعه نمود.

8- نسبت آنتی ژن به آنتی بادی (Antigen & Antibody Ratio): مقدار آنتی ژن و آنتی بادی اختصاصی آن باید با یکدیگر متناسب باشد تا تمام آنتی بادی موجود در لوله آزمایش به آنتی ژن مجاورش متصل شوند و حداکثر عکس العمل سرولوژی انجام پذیرد. این مطلب نقش بسیار مهمی در تعیین نتایج سرولوژیک دارد و بایستی همواره به آن توجه نمود.

اولین بار هایدل برگر (Heidel Berger) و همکارانش در لوله های آزمایش مقادیر افزاینده ای از یک آنتی ژن پلی ساکاریدی را ریختند و به هر کدام از این لوله ها مقدار ثابتی از آنتی بادی ضد آن اضافه نمودند. سپس لوله های محتوی آنتی ژن و آنتی بادی را در 37 درجه سانتیگراد قرار دادند تا واکنش آنتی ژن و آنتی بادی صورت گرفته و رسوب کمپلکس آنتی بادی و آنتی ژن حاصل شود. در هر لوله مقدار رسوب را اندازه گیری و میزان

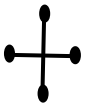
آنتی بادی های متصل نشده به آنتی ژن (آنتی بادی های آزاد) را تعیین نمودند. این محققان منحنی مقدار رسوب را نسبت به ترتیب لوله های آزمایش رسم کردند (منحنی زیر).



با توجه به این منحنی مشاهده می شود که در لوله های آزمایش شماره یک تا حدود چهار مقدار آنتی ژن نسبت به آنتی بادی کمتر است و در این لوله ها مقدار آنتی بادی رسوب داده شده نیز کمتر از لوله 5 و 6 می باشد. در لوله های یک الی چهار مقداری از آنتی بادی آزاد می باشد که در رسوب داخل نمی شوند، به این ناحیه، منطقه آنتی بادی اضافه و یا اصطلاحاً پروزون (Prozone) یا پری زون (Prezone) می گویند لوله های 5 تا 7 منطقه ای است که تقریباً تمام آنتی بادی موجود در لوله به آنتی ژن متصل شده و رسوب کرده است، به این منطقه، منطقه تعادل (Equivalence Zone) می گویند.از لوله 8 به بعد که نسبت آنتی ژن به تدریج نسبت به مقدار ثابت آنتی بادی افزایش بیشتری پیدا می کند، مقدار رسوب لوله ها نیز بتدریج کاهش می یابد به عبارت دیگر مقدار آنتی بادی که به آنتی ژن متصل شده و رسوب نموده است کاهش می یابد. این ناحیه را منطقه آنتی ژن اضافی و یا در اصطلاح (Postzone) می نامند.

یکی از محققین به نام ماراک (Marrack) در سال 1934 گفت که ما به واکنش آنتی ژن و آنتی بادی مثل واکنش های املاح معدنی نگاه نکنیم. ایشان ایده ظرفیت را وارد بحث آنتی ژن و آنتی بادی کردند. چون هر دو با هم واکنش می کنند پس اختصاصی

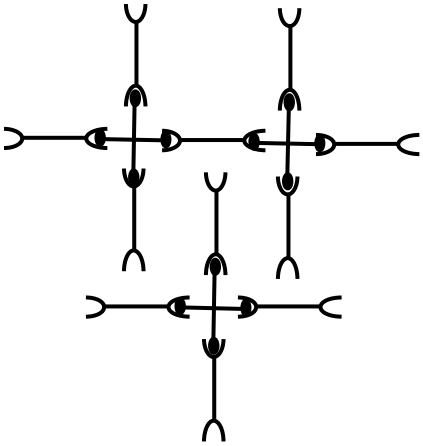
هستند و به خاطر ظرفیت می توانند تشکیل کمپلکس های محلول و غیر محلول بدهند.(البته در آن زمان هنوز ساختمان آنتی بادی ها مشخص نشده بودند)

اگر ما فرضاً آنتی ژن را چهار ظرفیتی در نظر بگیریم () و آنتی بادی نیز دو ظرفیتی باشد ( ).

در نتیجه:

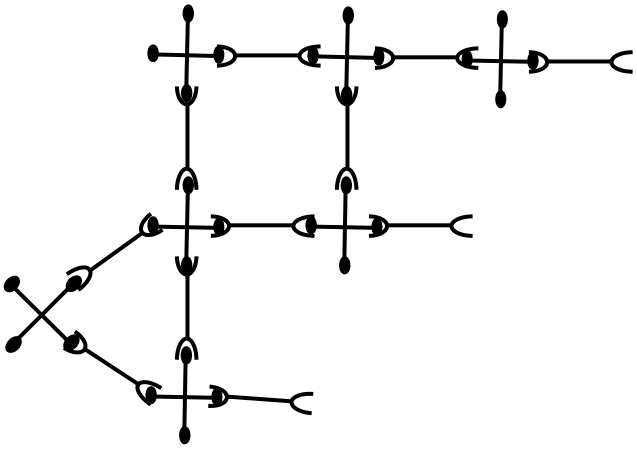
الف) در منطقه پروزون یا منطقه فزونی آنتی بادی (Antibody Excess) ظرفیت های آنتی ژن اشباع می شوند و کمپلکس هایی از آنتی ژن و آنتی بادی ایجاد می شوند ولی به علت کوچکی اندازه قادر به رسوب نیستند. بنابراین در این منطقه میزان رسوب کم خواهد بود.

Antibody Excess



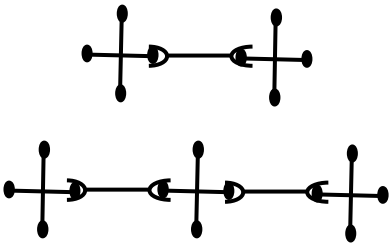
ب) در حالت تعادل شبکه های بزرگی تشکیل می شوند که به علت اندازه بزرگشان رسوب می کنند.

Equivalence



ت) در منطقه Postzone یا در فزونی آنتی ژن (Antigen Excess) ظرفیت های دو گانه آنتی بادی به سرعت اشباع می شوند، قسمت اعظم کمپلکس های تشکیل شده به صورت Ag2Ab خواهد بود.

Antigen Excess



نسبت آنتی ژن و آنتی بادی (منحنی فوق) بایستی در تمام آزمایش های سرولوژی مورد توجه باشد. بر این اساس چنانچه در تیتراسیون سرم بیمار، در لوله های اول جواب آزمایش منفی ولی در لوله های وسط مثبت شود یا بطور نامنظم لوله های آزمایش مثبت و منفی شوند علت آن همین نامتناسب بودن نسبت مقادیر آنتی ژن و آنتی بادی با یکدیگر می باشد به این وضعیت در اصطلاح پدیده منطقه ای (Zone Phenomenon) می گویند از جمله آزمایشهائی که این پدیده ممکن است در آن اتفاق بیفتد آزمایش رایت (Wright) برای تشخیص بیماری تب مالت (Brucellosis) و یا آزمایش تیتراسیون کومبس غیرمستقیم (Indirect comb's) در سرم مادران Rh^- می باشد.

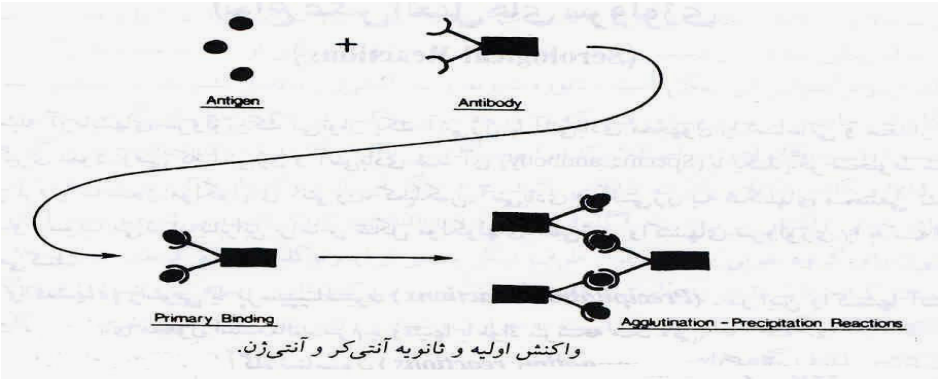
انواع آزمایشات ایمونولوژیک

واکنشهای سرولوژی آزمایشگاهی را می توان به دو دسته اولیه و ثانویه تقسیم نمود:

1) **واکنش اولیه:** واکنشهای اولیه سرلوژی در واقع، واکنش بین یک مولکول آنتی ژن با یک یا چند ظرفیت، با مولکول آنتی بادی می باشند. واکنشهای اولیه سرلوژی بخودی خود، مستقیماً قابل مشاهده نیستند. برای مشاهده این دسته واکنشها باید آنتی بادی یا آنتی ژن را بوسیله موادی از جمله مواد فلورسنت (مانند FITC و PE)، مواد رادیو اکتیو (ید 125- I^{125}) و یا آنزیم (مانند آنزیمهای آلکالین فسفاتاز: ALP و پراکسیداز HRP) نشاندار کرد. آزمایشاتی که بر اساس واکنش های اولیه بر حسب ماده نشاندار به ترتیب شامل:
   - ایمونوفلورسانس (IF = Immuno Fluorescence)
   - رادیو ایمونو اسی (RIA = Radio Immuno assay)
   - الیزا (ELISA = Enzyme Linked Immuno Sorbent assay)
2) ***واکنش های* ثانویه:** واکنشهای ثانویه در حقیقت تجلی اجتماع چندین مولکول آنتی ژن و آنتی بادی است که به صورتهای پرسیپیتاسیون، آگلوتیناسیون و یا فلوکولاسیون، در صورتی که مقادیر کافی آنتی ژن و آنتی بادی موجود باشند، دیده می شوند.

تقویت شده واکنش های اولیه هستند کمپلکسهای اولیه با هم ترکیب شده وکمپلکسهای بزرگی را (قابل مشاهده با چشم غیر مسلح) تشکیل می دهند. واکنشهای ثانویه در حقیقت تجلی اجتماع چندین مولکول آنتی ژن و آنتی بادی است که به صورتهای پرسیپیتاسیون، آگلوتیناسیون و یا فلوکولاسیون، در صورتی که مقادیر کافی آنتی ژن و آنتی بادی موجود باشند، دیده می شوند.

آزمایشاتی که بر اساس واکنش های اولیه اند حساس تر و گران قیمت تر از آزمایشاتی است که بر اساس واکنشهای ثانویه می باشند و مقادیر بسیار جزئی از آنتی بادی و یا آنتی ژن را می توانند شناسایی کنند.



واکنش اولیه و ثانویه آنتی‌کر و آنتی‌ژن.

انواع واکنش های سرولوژی

بوسیله آزمایشهای سرولوژی، می توان یک آنتی ژن یا یک آنتی بادی مجهول را شناسایی و مقدار آن را اندازه گیری کرد. وقتی که یک آنتی ژن با آنتی بادی اختصاصی ضد آن، با یکدیگر مخلوط شوند، بر اساس شکل و یا ساختمان مولکولهای آنتی ژن، کمپلکسهای آنتی بادی و آنتی ژن به شکلهای مختلفی تشکیل شده و رسوب می کنند. بنابراین بر اساس ماهیت و شکل مولکولهای آنتی ژن، واکنشهای سرولوژی را به سه دسته تقسیم می کنند:

1) واکنشهای آگلوتیناسیون یا متراکم (Agglutination Reactions)

اگر آنتی ژن یک ذره نامحلول مانند یک باکتری، باشد واکنش را آگلوتیناسیون گویند. اگر آنتی ژن نامحلول، گلبول قرمز باشد، اصطلاحاً به آن، واکنش هماگلوتیناسیون (Hemagglutination) گویند. در واکنشهای آگلوتیناسیون، به آنتی بادی، آگلوتینین (Agglutinin)، به آنتی ژن، آگلوتینوژن (Agglutinogen)، و به واکنش صورت گرفته آگلوتیناسیون (Agglutination)گویند.

از طرفی خود واکنشهای آگلوتیناسیون را بر اساس ماهیت شاخصهای آنتی ژنی در مولکولهای آنتی ژن، می توان به سه دسته تقسیم کرد:

الف) واکنشهای آگلوتیناسیون فعال (Active) یا مستقیم (Direct)

در این دسته از واکنشهای آگلوتیناسیون، شاخصهای آنتی ژنی (Determinants Antigenic) یا اپی توپ، جزء ساختمانی خود آنتی ژن نامحلول می باشد، مانند آزمایشهای رایت (Wright) و ویدال (Widal)، که در این آزمایشها از میکروب کشته شده بروسلا (Brucella) و سالمونلا (Salmonella) به ترتیب برای تشخیص بیماری تب مالت و حصبه استفاده می شود.

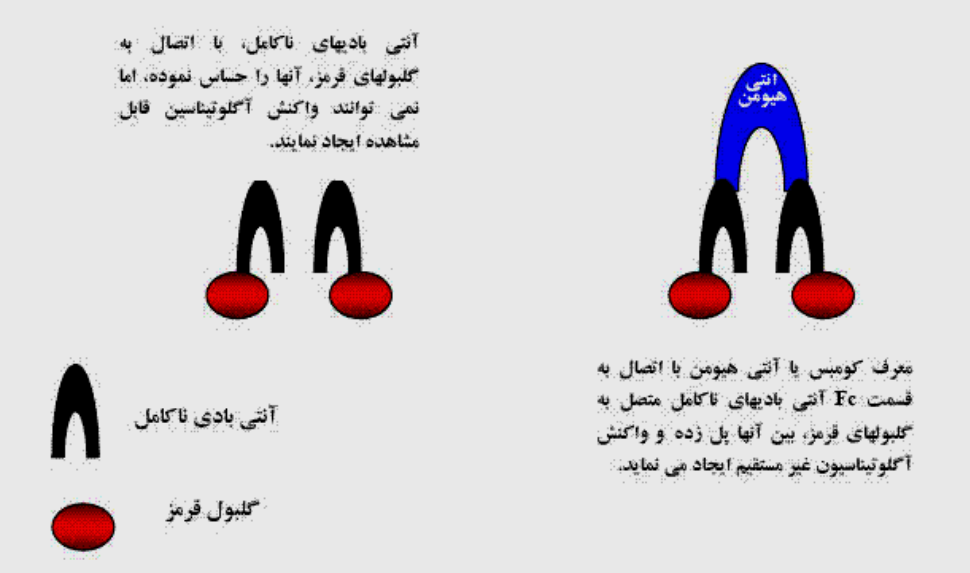
ب) واکنشهای آگلوتیناسیون غیر فعال (Passive)

اگر آنتی ژن محلول را بخواهیم به روش آگلوتیناسیون شناسایی نماییم، باید به روش آگلوتیناسیون پسیو عمل نماییم. بدین منظور می بایست آنتی ژن محلول را به ذرات غیر محلول متصل کرد. از آنجا که در این دسته واکنشهای آگلوتیناسیون، شاخصهای آنتی ژنیک، جزء ساختمانی ذره غیر محلول نمی باشد، به آنها واکنشهای آگلوتیناسیون پسیو یا غیر فعال می گویند. از ذرات غیر محلول که بیشترین کاربرد را در آزمایشهای سرولوژی دارند، می توان به ذرات لاتکس (از جنس ذرات بسیار ریز پلاستیک است) و گلبولهای قرمز گوسفند اشاره کرد. از ذرات غیر محلول دیگری که بندرت استفاده می شوند. می توان به ذرات بنتونایت (Bentonite) زغال چوب (Charcoal) اشاره کرد. به عنوان مثال در آزمایشهای سرولوژی تشخیص فاکتور روماتوئیدی (RF) و حاملگی، به ترتیب آنتی بادی IgG و هورمون hCG انسان را که محلول هستند، به ذرات غیر محلول لاتکس متصل کرده اند.

ج) واکنشهای آگلوتیناسیون غیر مستقیم (Indirect)

گاهی به علت وجود آنتی بادیهای ناقص (Incomplete) یا مسدود کننده (Blocking Antibody)، فقط یک بازوی آنتی بادی به آنتی ژن غیر محلول متصل می شود که در نتیجه شبکه بین آنتی بادی و آنتی ژن تشکیل نشده و آگلوتیناسیون دیده نمی شود. در چنین مواردی برای مشاهده آگلوتیناسیون و در صورتیکه آنتی بادی ناقص، انسانی باشد، از آنتی هیومن

(آنتی بادی ضد آنتی بادی انسانی یا آنتی گاماگلبولین) استفاده می شود (شکل زیر)، مانند آزمایش کومبس رایت. به این روش آگلوتیناسیون غیر مستقیم گویند.



2) واکنشهای رسوبی یا پرسیپیتاسیون (Precipitation Reactions)

اگر در واکنشهای سرولوژی، آنتی ژن یک ذره محلول باشد (مانند هورمونها، پروتئین های موجود در سرم و غیره) واکنش رسوبی یا پرسیپیتاسیون نامیده می شود. در واکنشهای پرسیپیتاسیون، به آنتی بادی، پرسیپیتین (Precipitin)، به آنتی ژن پرسیپیتینوژن (Precipitinogen)، و به واکنش صورت گرفته پرسیپیتاسیون (Precipitation)گویند. واکنشهای رسوبی در محیط نیمه جامد مانند ژل(آگار)، روی لام، لوله های آزمایش و لوله های موئینه انجام می شوند.

3) واکنشهای فلوکولاسیون (Fluccolation Reactions)

وقتی که در واکنشهای سرولوژی، آنتی ژن بصورت ذرات کلوئیدی باشد، مثل کاردیولیپین قلب گاو در آزمایش VDRL (برای تشخیص بیماری سیفیلیس)، واکنش را فلوکولاسیون می نامند.

آزمایش های سرولوژی بالینی

بهترین راه تشخیص یک بیماری عفونی ، جدا کردن میکروب از بیمار و شناسایی آن می باشد . ولی در اکثر موارد این کار به عللی میسر نمی باشد . از جمله:

1. دیر مراجعه کرن بیمار به پزشک.
2. مصرف داروهای ضد میکروبی.
3. مشکلات مربوط به جدا کردن و کشت میکروب ، تشخیص را با اشکال مواجه می کند.

در این گونه موارد بهترین و سریع ترین راه تشخیص بیماری، جستجوی آنتی بادی (Ab) اختصاصی ضد میکروب در سرم بیمار است. اهمیت آزمایشات سرولوژی بیشتر در تغییراتی است که در عیار یا تیتر (Titer) آنتی بادی در طول مدت بیماری صورت می گیرد و پزشک می تواند از روی این تغییرات درمان بیماری را تحت کنترل داشته باشد. کاهش تیتر یعنی تشخیص و درمان صحیح و افزایش تیتر پیشرفت بیماری را نشان می دهد بر همین اساس آزمایشات سرولوژی را باید حداقل در دو نوبت به فاصله

یک تا دو هفته انجام و تیتر آنتی بادی را مقایسه کرد مخصوصاً زمانی که نتیجه آزمایش مشکوک است و یا با وضعیت بالینی بیمار مطابقت ندارد، ضروری می باشد.

عوامل مؤثر بر نتایج آزمایشهای سرولوژی بیماریهای عفونی:

1- سن و سابقه بیماری: در افرادی که برای بار دوم یا بیشتر به یک بیماری عفونی خاص مبتلا می شوند ، تیتر آنتی بادی ضد عامل آن عفونت بیشتر از افرادی است که برای نخستین بار دچار همان بیماری شده اند. به همین ترتیب با افزایش احتمال دفعات ابتلا به یک بیماری خاص افزایش می یابد و تیتر آنتی بادی ها بالا می رود.

2- واکسیناسیون: انجام واکسیناسیون و زمان آن بر نتایج آزمایشات سرولوژی اثر می گذارد. در اینجا سه مسئله درباره افرادی که قبلاً واکسینه شده اند وجود دارد:

2-1- جواب آزمایش ممکن است مربوط به واکسنی باشد که چندی قبل دریافت کرده و فرد بیمار نباشد.

2-2- آیا واکسن دریافت شده ، با این بیماری تشابه آنتی ژنی دارد؟

2-3- اگر فردی به بیماری مبتلا شود که قبلاً واکسن مربوط به همان بیماری را دریافت کرده باشد و یا واکسن مورد استفاده دارای تشابه آنتی ژنی باشد، بطور معمول تیتر آنتی بادی افزایش می یابد.

3- شیوع بیماری: در صورت شیوع بیماری در یک منطقه جغرافیایی خاص، تیتر آنتی بادی حد نصاب برای آن بیماری افزایش خواهد یافت.

4- شغل بیمار: تیتر آنتی بادی در افرادی که بطور دائم در تماس با میکروب هستند، بالاتر است.

5- تشابه آنتی ژنی(Cross-reacting Antigen): ابتلا به عامل عفونی که با میکروب فعلی تشابه آنتی ژنی دارد سبب افزایش تیتر آنتی بادی می شود.

6- نقص ایمنی(Immunodeficiency): فقدان تولید آنتی بادی علیه عامل عفونی سبب منفی شدن تست یا کاهش تیتر می گردد.

7- مرحله بیماری: بطور معمول اندازه گیری آنتی بادیها، قبل از هفته دوم بیماری منجر به پاسخهای کاذب منفی خواهند شد.

8- خطاهای آزمایشگاهی: مانند استفاده از پیپت های آلوده به سرم بیماران دیگر ، یخ زدن آنتی ژن .

9- مصرف دارو: تجویز بی موقع آنتی بیوتیکها ، داروهای سرکوبگر ایمنی مانند کورتیکواستروئیدها و یا پرتودرمانی، سبب تأخیر، کاهش و یا فقدان تولید آنتی بادی می گردند.

10-وضعیت جغرافیایی محیط مثل شیوع بیماری در منطقه اندمیک یا مهاجرت افراد به مناطق دیگر.