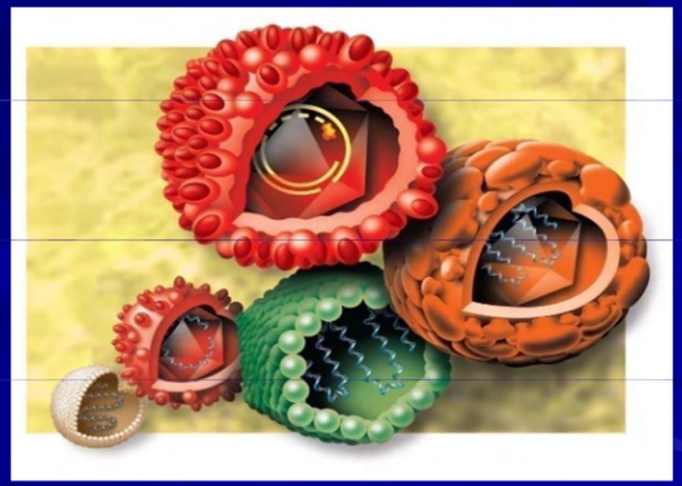
principle of Serology



آگلوتیناسیون ساده غیر فعال

اگر آنتی ژن بصورت محلول باشد و بخواهیم به روش آگلوتیناسیون آزمایش سرولوژی را انجام دهیم باید به روش آگلوتیناسیون پاسیو عمل کنیم. برای این منظور، آنتی ژن محلول را به ذرات غیرمحلول متصل می کنیم. بدین ترتیب شاخص های آنتی ژنیک در این دسته از واکنش های سرولوژی بصورت خارجی (extrinsic) و جزء ساختمانی ذرات غیر محلول نمی باشند.

مثل تست RF

ذرات غیر محلول استفاده شده"

لاتکس

بنتونایت (پلیمری از $Al_2O_3/SiO_2 + H_2O$)

ذغال چوب (Charcoal)

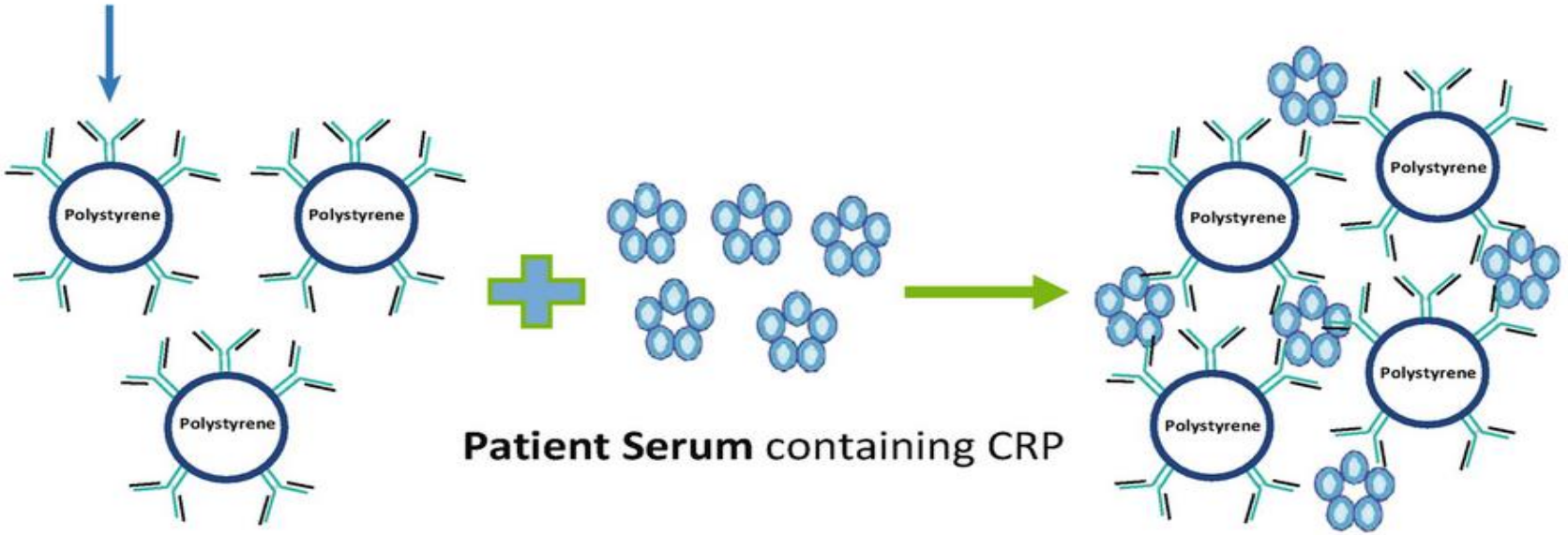
خاک چینی یا کائولین (Kaolin)

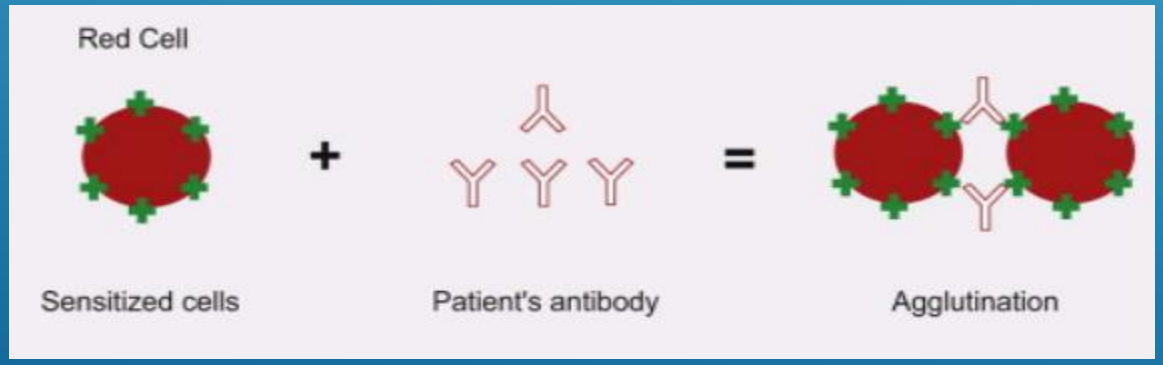
Passive Agglutination

- An agglutination reaction that employs particles that are coated with antigens not normally found in the cell surfaces
- Particle carriers include:
  - Red blood cells
  - Polystyrene latex
  - Bentonite
  - charcoal

Passive Agglutination

latex particles coated with antibodies specific to CRP



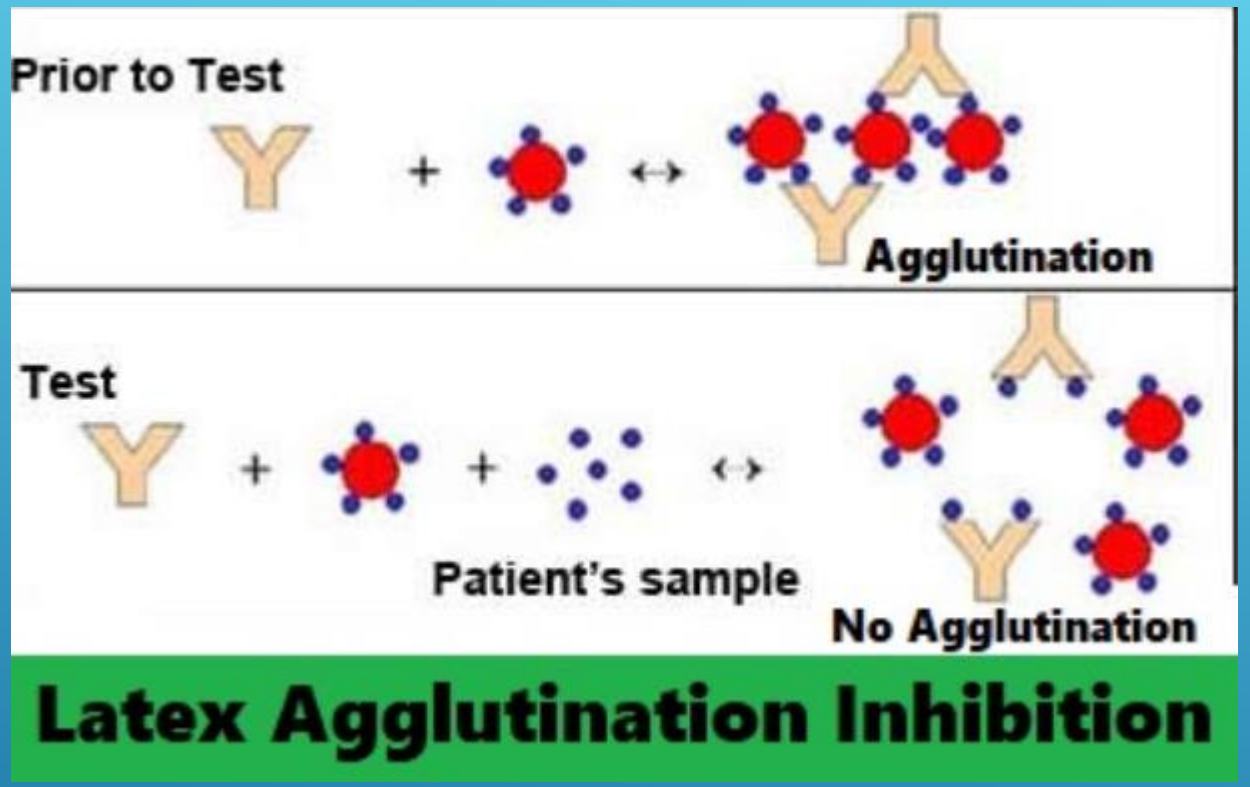


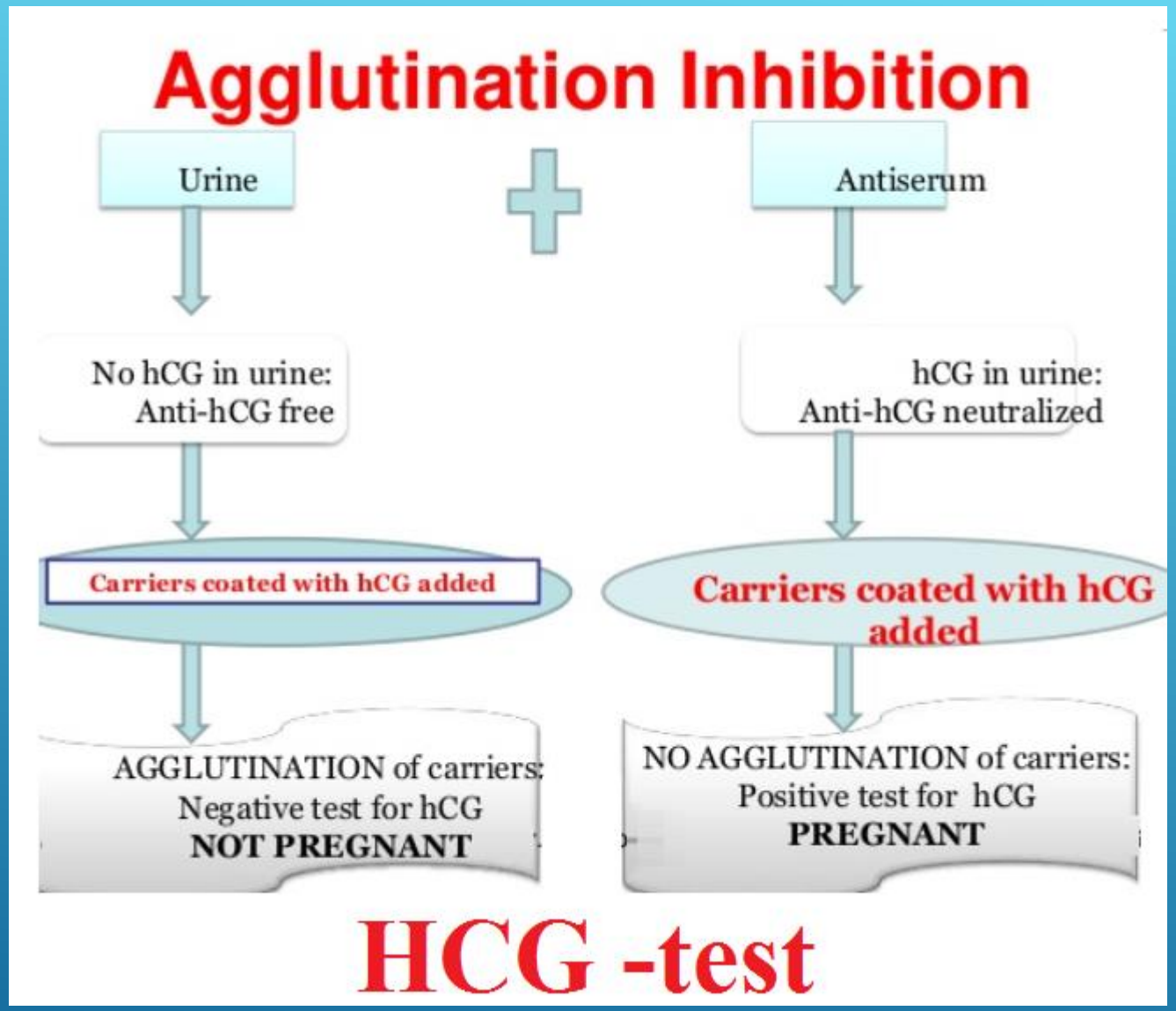
ممانعت از آگلوتیناسیون غیرفعال

(Passive inhibition of agglutination)

اساس این آزمایش براساس رقابت بین یک آنتی ژن به دو صورت، محلول و غیر محلول در مقابل یک آنتی بادی اختصاصی معلوم می باشد .

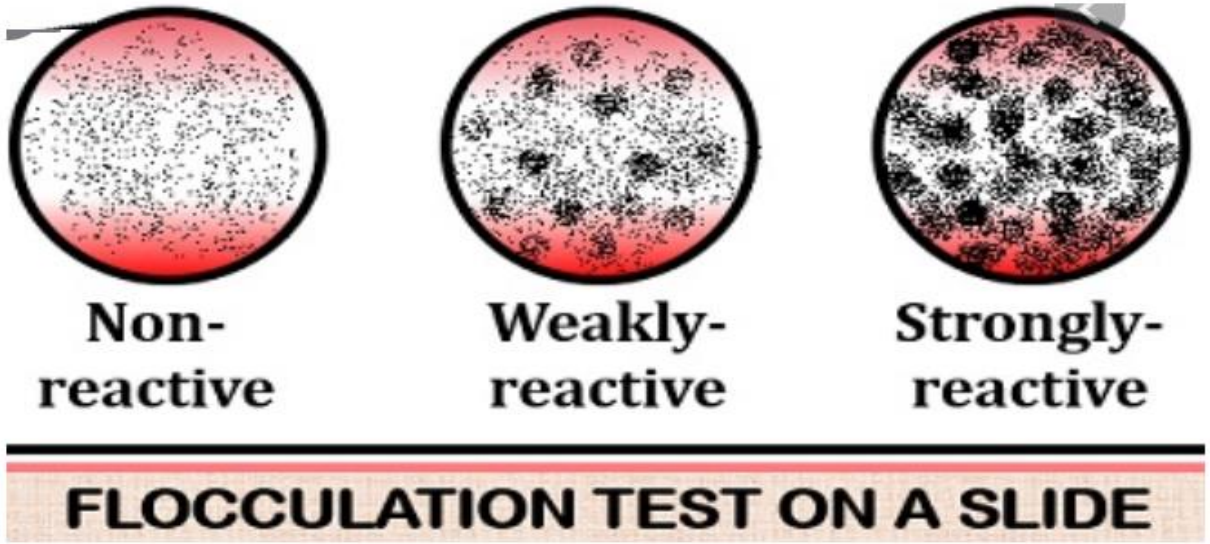
این دسته از واکنش ها که معمولا برای تست HCG استفاده می شود. به این ترتیب که با مجاورت کردن آنتی بادی اختصاصی علیه هورمون مذکور با ادرار شخص مورد آزمایش، چنانچه HCG در ادرار وجود داشته باشد، در این مرحله کمپلکس ایمنی تشکیل می شود. در مرحله دوم چنانچه به مجموعه حاصل از مرحله اول ذرات لاتکس که در سطح آنها HCG متصل شده است، اضافه شود چون در مرحله اول سایت فعال آنتی بادی ها با هورمون HCG موجود در ادرار اشغال شده است لذا در مرحله دوم با HCG متصل به سطح ذرات لاتکس واکنش نداده و آگلوتیناسیون ظاهر نمی شود. بنابراین عدم آگلوتیناسیون در این آزمایش دال بر وجود HCG در ادرار شخص مورد آزمایش است.


Prior to Test
Agglutination
Test
Patient's sample
No Agglutination
Latex Agglutination Inhibition

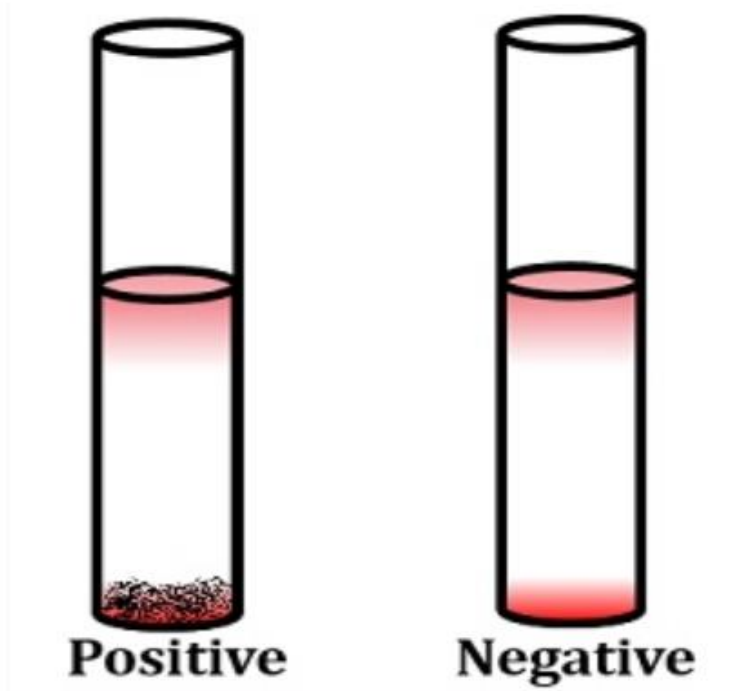

Agglutination Inhibition
Urine
Antiserum
No hCG in urine:
Anti-hCG free
hCG in urine:
Anti-hCG neutralized
Carriers coated with hCG added
Carriers coated with hCG added
AGGLUTINATION of carriers:
Negative test for hCG
NOT PREGNANT
NO AGGLUTINATION of carriers:
Positive test for hCG
PREGNANT
HCG -test

Flocculation tests

- Flocculation is an antigen-antibody reaction that occurs if the antigen is neither cellular nor soluble, but is an insoluble particulate.
- The flocculation reaction is a special type of precipitation reaction.
- Example of the flocculation reaction in current use are the Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) test and the rapid plasma reagin (RPR) used for the diagnosis of syphilis.
- These tests are non-specific (non-treponemal) or called standard test of syphilis (STS).



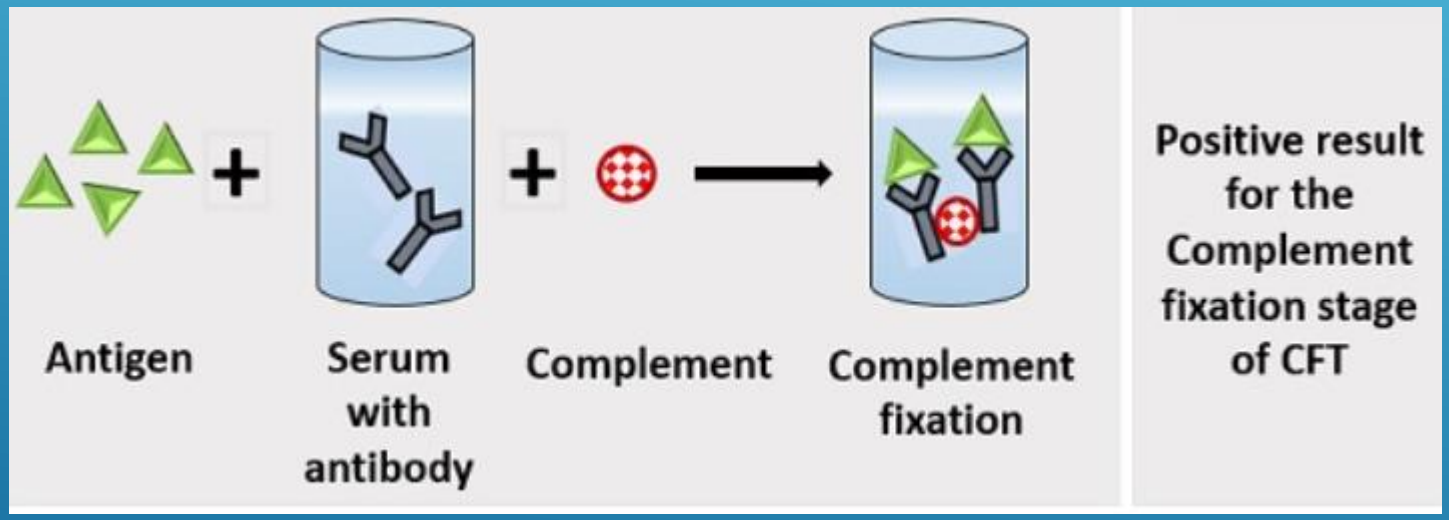
FLOCCULATION TEST ON A SLIDE



FLOCCULATION TEST IN A TUBE

Complement Fixation Test

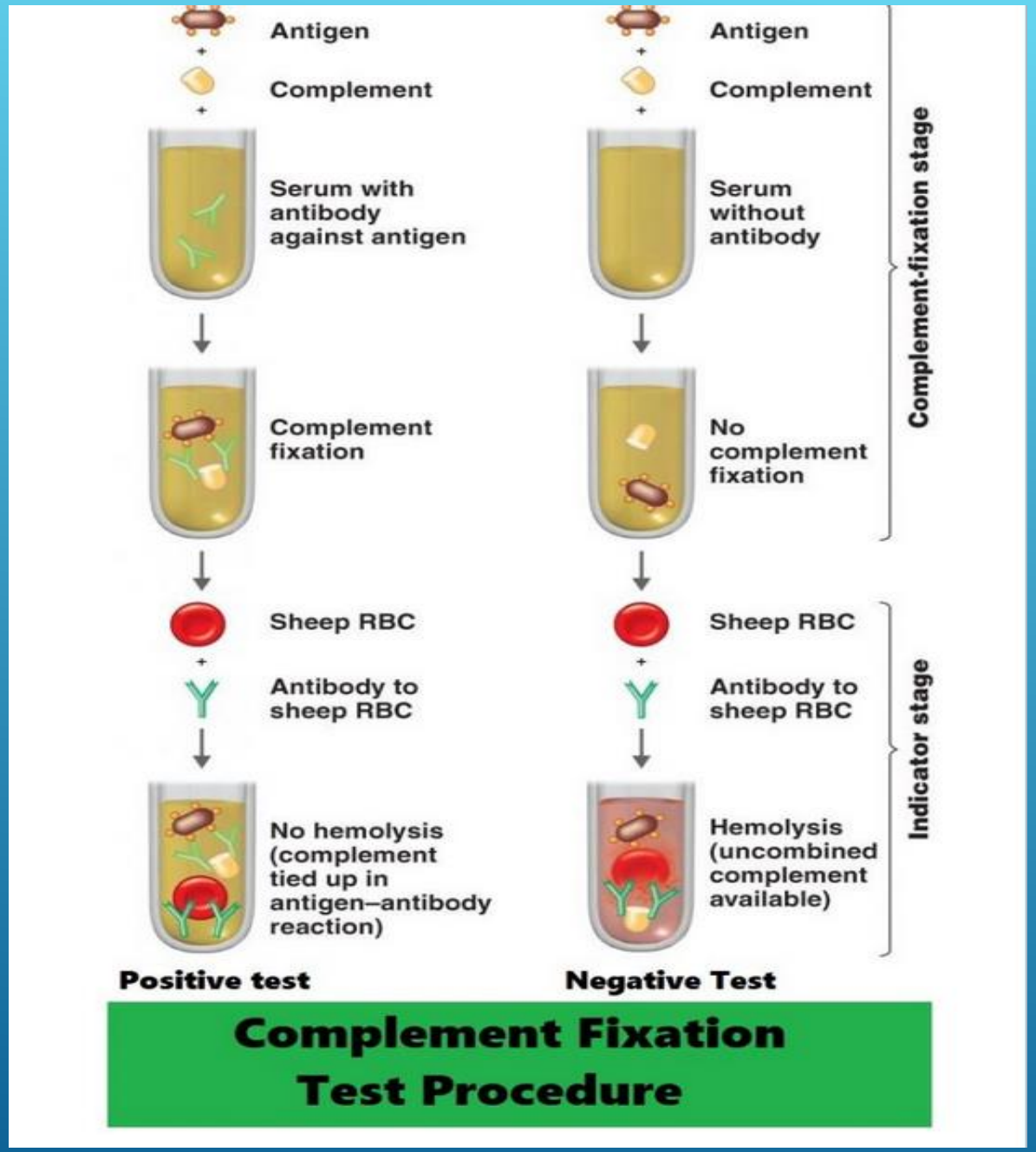
Complement fixation test is based on the principle that when antigen and antibodies of the IgM or the IgG classes are mixed, complement is "fixed" to the antigen-antibody complex. If this occurs on the surface of RBCs, the complement cascade will be activated and hemolysis will occur.



Complement Fixation Test consists of following two steps:

Step 1: A known antigen and inactivated patient's serum are incubated with a standardized, limited amount of complement. If serum contains specific complement activating antibody, complement will be activated or fixed by antigen-antibody complex. However, if there is no antibody in patient's serum, there will be no formation of antigen-antibody complex, and therefore complement will not be fixed. But will remain free.

Step 2: It detects whether complement has been utilized in first step or not. This is done by adding indicator system. If complement is fixed in first step owing to presence of antibody there will be no complement left to fix to indicator system. However, if there is absence of antibody in patient's serum, there will be no antigen-antibody complex, and therefore, complement will be present free or unfixed in mixture. This unfixed complement will now react with antibody- coated sheep red blood cells to bring about their lysis.


Antigen
Complement
Serum with antibody against antigen
Complement fixation
Sheep RBC
Antibody to sheep RBC
No hemolysis (complement tied up in antigen–antibody reaction)
Positive test
Antigen
Complement
Serum without antibody
No complement fixation
Sheep RBC
Antibody to sheep RBC
Hemolysis (uncombined complement available)
Negative Test
Complement-fixation stage
Indicator stage
Complement Fixation Test Procedure

تست βHCG

HCG (human chorionic gonadotropin) هورمونی است که در دوران حاملگی در ادرار فرد حامله دیده می شود، و متداولترین، آسان ترین و سریع ترین راه تشخیص حاملگی تشخیص همین هورمون گوناوتروپین جفتی انسان در ادرار قابل جستجو می باشد.

هورمون HCG بطور طبیعی توسط سلول های لانگهانس (Langhance cell) جفت زنان باردار تولید می شود و در مایعات بدن قابل تشخیص است. وزن ملکولی هورمون ۴۰۰۰۰ دالتون و از جنس گلیکوپروتئین است که از دو قسمت آلفا و بتا درست شده است. قسمت آلفا از نظر آنتی ژنی با بعضی هورمون های دیگر قرابت دارد ولی قسمت بتا کاملا اختصاصی است و به همین دلیل برای تهیه آنتی سرم از این قسمت ملکول استفاده می شود.

هورمون HCGβ در وضعیت های مرضی ذیل در سرم و ادرار یافت می شود:

۱-مول هیداتیفرم (Hydatiform mole): حاملگی مولار= بچه خوره= نابهنجاری در تخم بارور شده= سقط جنین

۲-کوریو کارسینوما (Choriocarcinoma): خونریزی دائم از واژن و آسیب به کبد

۳-تراتومهای بدخیم (Malignant teratoma): کیست های بد خیم تخمدان

۴- بیماران دیابتیک

۵-توکسمی حاملگی: عارضه کلیوی در دوران حاملگی (افزایش فشار خون، ادم و پروتئین اوری)

۶- سرطان بیضه

مقدار HCG را براساس واحد بین الملل (IU) در سال ۱۹۳۸ توصیف کردند. هر واحد بین المللی برابر است با قدرت ۰/۱ میلی گرم HCG خالص خشک استاندارد، که در موسسه ملی بهداشت در لندن نگهداری می شود.

اساس آزمایش βHCG

Latex-passive agglutination inhibition test

این آزمایش را معمولا به روش کیفی روش سریع روی لام زمینه سیاه (Rapid slid test) و روش کمی الیزا انجام می دهند. ابتدا مقدار معنی از ادرار مشکوک را با آنتی بادی اختصاصی ضد هورمون HCG مخلوط می کنند و سپس به آن ذرات لاتکس که از هورمون HCG پوشیده شده است اضافه می کنند. اگر در ادرار، هورمون HCG باشد، به آنتی بادی اختصاصی متصل می شود. از آنجایی که هورمون HCG به صورت محلول است و کمپلکس آن با آنتی بادی بصورت ذرات بسیار ریز رسوبی می باشد و با چشم دیده نمی شود، بنابراین ذرات لاتکسی که به این کمپلکس اضافه می شود به علت نبود آنتی بادی اختصاصی بصورت آزاد باقی مانده و آگلوتیناسیون ایجاد نمی شود، از طرف دیگر چنانکه ادرار فاقد هورمون HCG باشد، آنتی بادی اختصاصی ضد این هورمون بطور آزاد باقی مانده و در مرحله بعد که ذرات لاتکس پوشیده از هورمون HCG اضافه می شود، با این ذرات ایجاد توده های آگلوتیناسیون را می کند. بنابراین، چنانچه آگلوتیناسیون مشاهده شود آزمایش مثبت و چنانچه آگلوتیناسیون مشاهده نشود، آزمایش منفی و برای تایید آن باید آزمایش را پس از مدتی تکرار کرد.

مواد و وسایل مورد نیاز آزمایش

کیت βHCG شامل:

۱-محلول آنتی بادی مونوکلونال

۲-سوسپانسیون لاتکس (ذرات لاتکس پوشیده شده با هورمون)

۳-کنترل مثبت (بافر فسفات حاوی آنتی ژن محلول)

۴-کنترل منفی (بافر فسفات عاری از آنتی ژن آزاد)

۵-لام زمینه سیاه (توده های متراکم آگلوتیناسیون بخوبی مشاهده شود)


hCG-R
Pishtazteb
Rapid hCG ELISA KIT
MICROPLATE
96 TESTS
IVD
REF
LOT
2013-12


HCG

روش انجام آزمایش

۱-آماده کردن نمونه:

حدود ۴۸ ساعت قبل از آزمایش، داروهای مسکن و سالیسیلات ها مانند آسپرین و اسید باربیتوریک (فنوباریتال) نباید مصرف شود. جهت انجام آزمایش، اولین ادرار صبحگاهی که حاوی HCG بیشتر می باشد توصیه می شود.

جمع آوری و ارسال نمونه به آزمایشگاه کاملا در ظروف شیشه ای و یا پلاستیکی تمیز و عاری از هرگونه مواد پاک کننده و یا نگهدارنده

جهت حصول به نمونه کاملا شفاف باید از دور بالای سانتریفیوژ استفاده شود

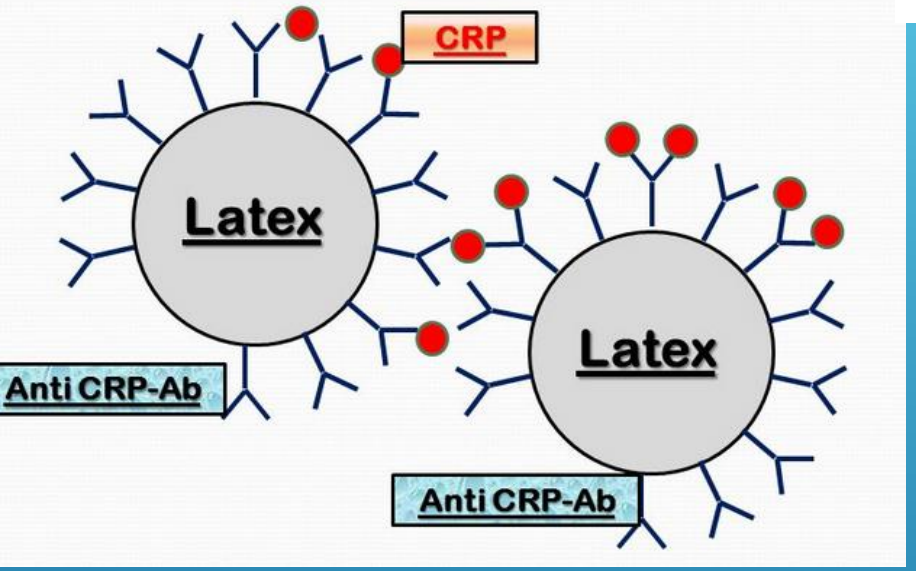
نگهداری ادرار (یخچال ۲۴ ساعت، مدت های طولانی فریزر منهای ۲۰ و یا با اضافه کردن سدیم آزید ۰/۱ درصد)

۲- اسلاید و نمونه ادرار و سایر محلول های داخل کیت به درجه حرارت اتاق رسانده شوند.

۳- مقادیر برابر از آنتی ژن و آنتی بادی اضافه شوند (هرکدام ۵۰ میکرولیتر)

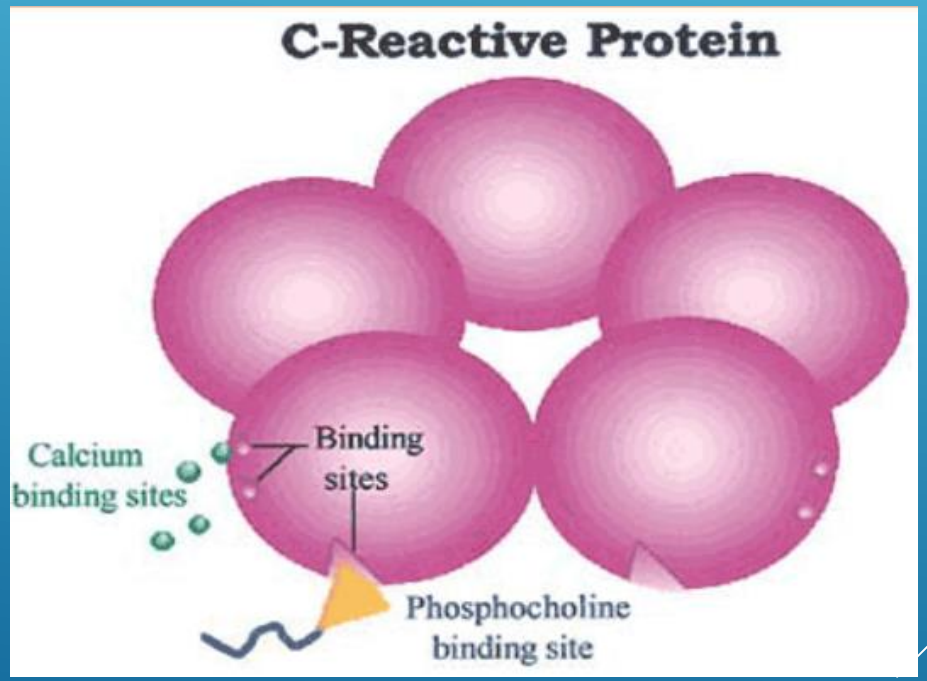
۴- میکس کردن به کمک همزن پلاستیکی با حرکت دورانی دست و برای ۱۲۰ ثانیه

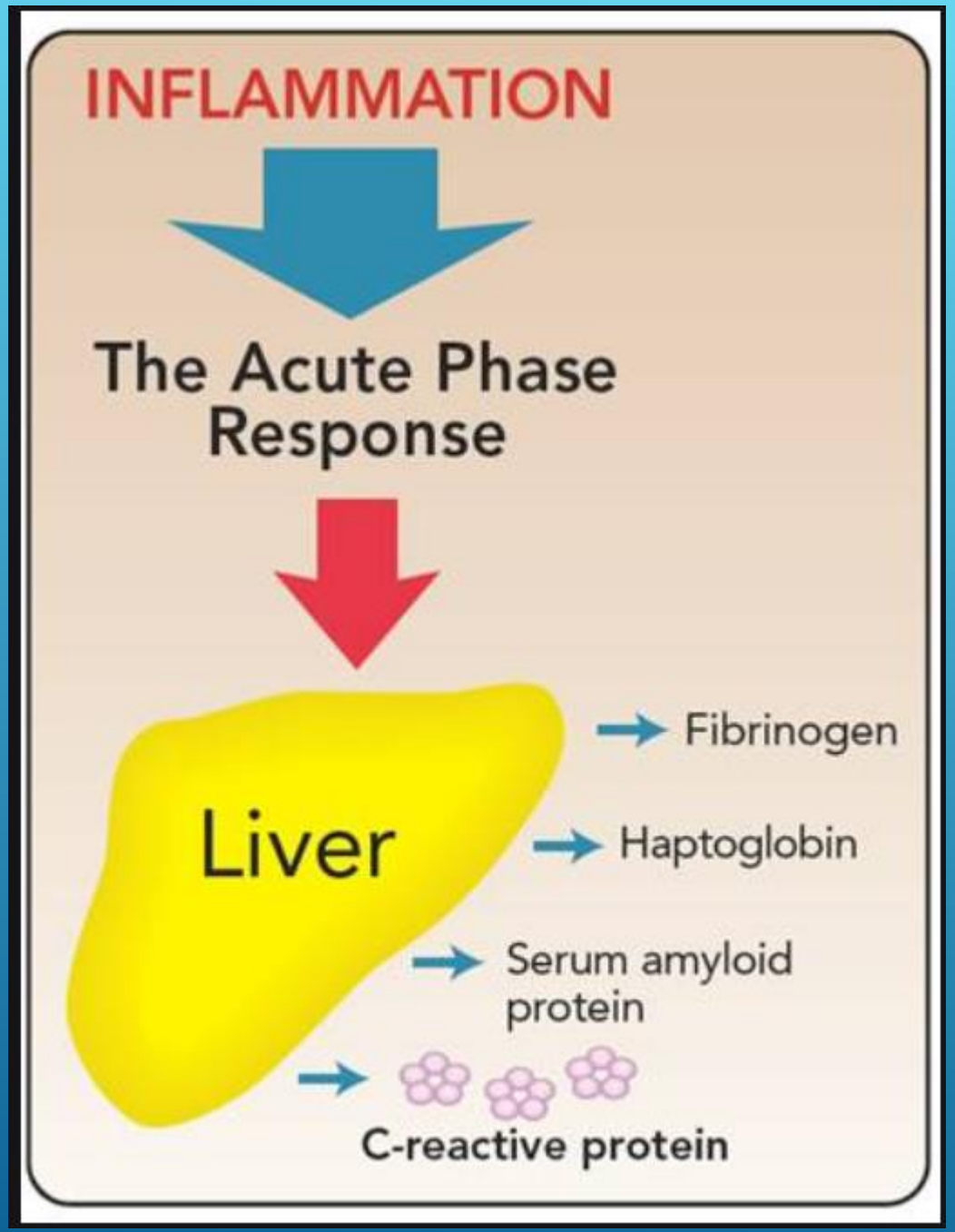
- Reverse Passive Agglutination-

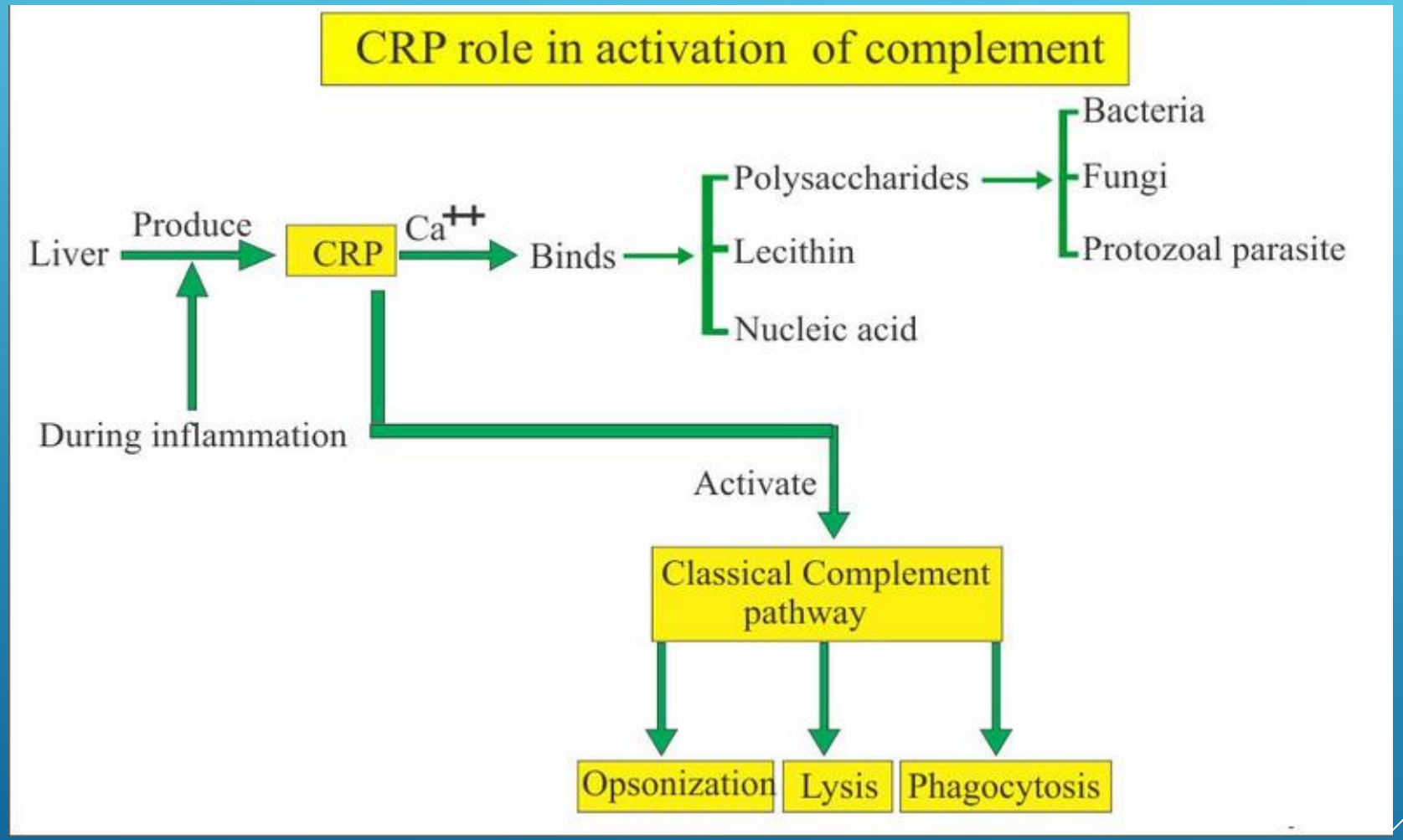


CRP test

Reverse passive latex agglutination test




INFLAMMATION
The Acute Phase Response
Liver
Fibrinogen
Haptoglobin
Serum amyloid protein
C-reactive protein


CRP role in activation of complement
Liver
Produce
CRP
Ca++
Binds
Polysaccharides
Lecithin
Nucleic acid
Bacteria
Fungi
Protozoal parasite
During inflammation
Activate
Classical Complement pathway
Opsonization
Lysis
Phagocytosis

در بیماریهای زیر مقدار CRP در سرم افزایش پیدا می‌کند:

۱) عفونتهای باکتریایی

۲) تب روماتیسمی فعال

۳) سکته قلبی حاد

۴) سرطانهای بدخیم منتشر

CRP در بیماریهای زیر معمولاً دیده می‌شود:

۱) آرتریت روماتوئید فعال

۲) عفونتهای ویروسی

۳) سل

مقدار CRP ممکن است بعد از اعمال جراحی، انتقال مقدار زیادی خون، واکسیناسیون و آمبولی ریه نیز در سرم خون بالا برود. در انفارکتوس قلبی اندازه‌گیری CRP بهترین و حساس‌ترین آزمایشی است که یا آن می‌توان نشانه‌هایی از نکروز یا التهاب بافت را بدست آورد. CRP بهترین و حساس‌ترین آزمایش است که در طول بیماری بطور مداوم مثبت باقی می‌ماند.

روش تشخیص CRP

برای تشخیص CRP در قدیم از پلی ساکارید «سی» بدنه میکروب پنوموکوک استفاده می‌شد. ولی به علت مشکلاتی که تهیه این آنتی ژن داشت امروزه از آنتی بادی ضد CRP استفاده می‌شود. با روشهای مختلف پرسیپیتاسیون در لوله موئینه، ایمونودیفیوژن، فیکساسیون کمپلمان، هماگلوتیناسیون، نفلومتری و یا روش لاتکس آگلوتیناسیون CRP را در سرم تشخیص و اندازه‌گیری می‌کنند، ولی از بین آنها روش لاتکس آگلوتیناسیون از سایرین متداولتر می‌باشد.

برای انجام این آزمایش، ابتدا آنتی بادی اختصاصی ضد CRP را با تزریق CRP به حیوانات آزمایشگاهی تهیه می‌کنند و سپس آنرا به ذرات پلی استیرن لاتکس (polystyrene latex) متصل می‌کنند. بنابراین وقتی سرم بیماری را که حاوی CRP است با ذرات فوق مخلوط کنیم، باعث ایجاد آگلوتیناسیون می‌شود.

اساس تست

مواد و وسایل لازم

برای انجام این آزمایشات معمولاً از کیت‌های آماده CRP استفاده می‌شود. هر کیت شامل محتویات زیر می‌باشد.

۱- سوسپانسیون لاتکس CRP

سوسپانسیون ذرات لاتکس (پلی استیرن) پوشیده شده با IgG ضد CRP در بافرهمراه ۰/۱ درصد سدیم آزاید

glycine salin

۲- کنترل مثبت: محلول حاوی بیش از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر CRP

۳- کنترل منفی: محلول حاوی کمتر از ۶ میلی‌گرم در لیتر CRP

۴- اسلاید

مواد لازم برای آزمایش که همراه کیت نمی‌باشد.

نرمال سالین (۰/۹ درصد NaCl فقط برای انجام تستهای نیمه کمی)