**مقدمه اي بر سرولوژي:**

سرولوژي علم مطالعه سرم ها است، از ديد اختصاصي تر، سرولوژي شامل مطالعه واکنش هاي آنتي ژن\_ و آنتي بادي در خارج از بدن است (Invitro)

مصونيت روشهايي است که توسط آنها ارگانيسم زنده از خود در مقابل عفونت دفاع مي کند. ايمونولوژي علم مطالعه توليد آنتي بادي بر عليه آنتي ژنهاي بيگانه در بدن است (In vivo).

لغت مصونيت يا Immunity به معني مقاومت نسبت به عوامل مولد عفونت، ذرات بيگانه، توکسين ها سلولهاي زنده و سرطان مي باشد.

**1- اساس و پايه آزمايشات سرولوژي:**

آزمايشات سرولوژي باليني يکي از روشهاي سريع و اسان در تشخيص بيماريها مي باشد اين آزمايشات بر اساس اتصال آنتي باديهاي اختصاصي (Specific antibody) به آنتي ژن مربوطه صورت مي گيرد. آنتي ژن مورد نظر مي تواند باکتري، ويروس، گلبول قرمز، پروتئين، هورمون يا چيزي يا چيزي ديگر باشد.

اتصال آنتي ژن به آنتي بادي يک واکنش اختصاصي، دو طرفه و برگشت پذير مي باشد و از قوانين تئوري عکس العمل بين اسيدهاي ضعيف و بازهاي پيروي مي کند.

* آنچه که بايد در رابطه با آزمايشات سرولوژيک بدانيم:
  1. عواملي که بر واکنشهاي آنتي ژن و آنتي بادي دخالت مي کنند.
  2. انواع واکنشهاي سرولوژيک

1-1- عواملي که بر واکنشهاي آنتي ژن و آنتي بادي دخالت مي کنند:

a- affinity يا قدرت اتصال آنتي بادي به آنتي ژن:

a2- Avidity: قدرت اتصال آنتي بادي به آنتيژنهاي پلي والان را آويديتي مي گويند

b- PH محيط:

c- قدرت يوني محيط (ionic strength):

d\_ زمان:

E\_ درجه حرارت:

F\_ تأثير حرکت دادن:

H\_ نسبت غلظت آنتي ژن و آنتي بادي:

G\_ تأثير مواد احياء کننده:

2-1- انواع واکنشهاي سرولوژيک:

طبقه بندي واکنشهاي سرولوژيک بر اساس شکل مولکولي آنتي ژن يا کار آنتي بادي و آنتي ژن انجام مي گيرد.

انواع واکنشهاي سرولوژيک بر اساس شکل مولکول آنتي ژن:

a\_ واکنشهاي متراکم يا آگلوتيناسيون (Agglutination):

b- واکنشهاي رسوبي يا پرسيپيتاسيون (Precipitation):

c- واکنشهاي فلوکولاسيون (Fluccolation):

4-2-1: انواع واکنشهاي سرولوژيک بر اساس کار آنتي بادي و آنتي ژن:

1: واکنشهاي آگلوتيناسيون

2: واکنشهاي پرسيپيتاسيون

3: واکنشهاي نوتراليزاسيون

4: واکنشهاي فيکساسيون کمپلمان يا ثبوت مکمل

5: واکنشهاي ايمونوالکتروفورز

6: واکنشهاي نشاندار با مواد فلوئورسان: (IF)

7: واکنشهاي نشاندار با آنزيم (Enzyme Immuno assay) (EIA)

8: واکنشهاي نشاندار با مواد راديو اکتيو (RIA)

9: واکنشهاي کمي لومينسانس

آگلوتيناسيون غير فعال:

اگر در آزمايش آگلوتيناسيون، آنتي بادي ناقص يا مسدود کننده باشند بعبارتي وقتي از چندين ظرفيت آنتي بادي فقط يک ظرفيت ان به آنتي ژن ذره اي متصل شود کمپلکس (ab، ag) ايجاد مي شود و شبکه کمپلکس آنتي ژن و آنتي بادي تشکيل نمي گردد فلذا آگلوتيناسيون با چشم ديده نمي شود به اين نوع واکنش مي گوييم آگلوتيناسيون غير فعال.

براي توليد شبکه کمپلکس آنتي ژن و آنتي بادي از معرف کومبس (آنتي گاماگلوبولين انساني) استفاده مي کنند که باعث تشکيل شبکه اي از آنتي ژنها و آنتي بادي گشته و آگلوتيناسيون قابل رويت مي گردد معمولاً در اين موارد کلمه کومبس به اول نام آزمايش اضافه مي کنيم مثلاً تست کومبس رايت (coombs wright)

آگلوتيناسيون پاسيو:

گفتيم وقتي آنتي ژنها محلول باشند نمي توانند آگلوتيناسيون ايجاد کنند فلذا براي ايجاد آگلوتيناسيون، آنتي ژنهاي محلول را روي ذرات لاتکس (ذراتي مثل پلي استرن و در قطرهاي 8/0 ميکرون و سايزهاي ديگر) سوار مي کنند و آنتي ژنهايي بدست مي آيد که شبيه آنتي ژنهاي ذره اي بوده و در واکنش با آنتي باديهاي اختصاصي توليد آگلوتيناسيون مي کنند که با چشم ديده مي شود به اين آگلوتيناسيون، آگلوتيناسيون پاسيو يا لاتکس آگلوتيناسيون مي گوييم مثل تست CRP\_ تست RF\_ تست گراويندکس

هماگلوتيناسيون:

اگر آنتي ژن ذره اي خود گلبول قرمز (Heme) باشد. آگلوتيناسيون حاصله را هماگلوتيناسيون مي گويند. مثل تعيين گروههاي خوني، مثل تست هماگلوتيناسيون براي منونوکلئوز عفوني \_ تست هماگلوتيناسيون براي کيست هيداتيک

طرز تهیه سوسپانسیون 5-3% گلبول قرمز

برای اینکار ابتدا چند سی سی خون کامل (مثلاً 2-1 سی سی ) را در داخل یک لوله آزمایش ریخته و لوله را پر از سرم فیزیولوژی می کنیم و آنرا به آرامی مخلوط می کنیم.

مرحله شستشو:

1- لوله را در داخل سانتریفوژ با دور 3000 بمدت 5-3 دقیقه سانترفیوژ می کنیم

2- لوله را از سانترفیوژ برداشته با سر و ته کردن آرام لوله مایع سفید رویی را دور می ریزیم.

3- کمی سرم فیزیولوژی به لوله اضافه کرده، آنرا آرام مخلوط کرده و سپس لوله را با سرم فیزیولوژی پر می کنیم.

4- مجدداً سانتریفوژ می کنیم و از مرحله دوم به بعد را 4-3 بار تکرار می کنیم.

5- در مرحله آخر مایع رویی را دور ریخته و گلبولهای قرمز رسوب شده را به آرامی به هم می زنیم.

مرحله تهیه سوسپانسیون 5%: 5/0 سی سی از RBC شسته شده را برداشته و در داخل یک لوله بزرگ ی بشر کوچک می ریزیم و سپس روی آن 5/9 سی سی سرم فیزیولوژی اضافه می کنیم. (5/0 = 5%)

اگر خون شسته شده زیاد باشد می توان حجم بیشتر از سوسپانسیون را تهیه کرده مثل 95cc- RBC5cc سرم فیزیولوژی.

تعيين گروه خوني سيستم ABO:

الف\_ روش مستقيم (Cell Type)

ب\_ روش غير مستقيم يا معکوس (Back Typing or Revers):

الف\_ روش مستقيم تعيين گروه خوني:

* + يک صفحه شيشه اي (لام) يا کاشي سفيد انتخاب کرده و از خون کامل يا سوسپانسيون گلبول قرمز 50% دو قطره مجزا روي کاشي يا لام قرار مي دهيم.
  + از آنتي سرم A (ويال آبي رنگ) يک قطره روي قطره خون سمت چپ اضافه مي کنيم و از آنتي سرم B (ويال زرد رنگ) يک قطره روي قطره خون سمت راست اضافه مي کنيم.
  + با آپليکاتور پلاستيکي آنرا به هم مي زنيم و بعد از 2-1 دقيقه هماگلوتيناسيون را بررسي مي کنيم نتايج واکنش هماگلوتيناسيون و تعيين گروه خوني در جدول زير نمايش داده شده است.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| هماگلوتیناسیون با Anti-B | هماگلوتیناسیون با Anti-A |  |
| - | + | گروه خونی A |
| + | - | گروه خونی B |
| + | + | گروه خونی AB |
| - | - | گروه خونی O |

ب- تعيين گروه خوني بروش معکوس (Revers typing):

در اين روش از سرم (بجاي خون) براي تعيين آنتي بادي گروههاي خوني استفاده مي کنيم سپس از روي نوع از روي نوع آنتي بادي شناسايي شده نوع آنتي ژن را تشخيص مي دهيم. (نوع گروه خوني).

- ابتدا سوسپانسيون هاي 50% گروه خوني B و A را بطور جداگانه تهيه مي کنيم.

- يک لام شيشه اي يا کاشي سفيد را انتخاب کرده و دو قطره سرم فرد را بطور جداگانه روي لام قرار مي دهيم.

- سپس از روي سوسپانسيون گلبول قرمز 50% A يک قطره روي سرم چپ اضافه مي کنيم و يک قطره از سوسپانسيون 50% B را به سمت راست اضافه مي کنيم.

- با آبيليکاتور پلاستيکي آنرا به هم مي زنيم و بعد از 2-1 دقيقه نتايج هماگلوتيناسيون را بررسي مي کنيم..

- نتايج واکنش هما گلوتيناسيون و تعيين گوه خوني غير مستقيم در جدول زير نمايش داده شده است.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| نوع آنتی بادی در سرم | هماگلوتیناسیون با سوسپانسیون B | هماگلوتیناسیون با سوسپانسیون A |  |
| Anti-B | + | - | گروه خونی A |
| Anti – A | - | + | گروه خونی B |
| - | - | - | گروه خونی AB |
| Anti-AB | + | + | گروه خونی O |

روش تعيين Rh در لوله و آزمايش تکميلي کومبس:

1- در يک لوله آزمايش 12×75 يک قطره سوسپانسيون 50% RBC مي ريزيم (يا خون کامل)

2- يک قطره آنتي سرم D اضافه مي کنيم و بعد از 2 دقيقه آگلوتيناسيون را بررسي مي کنيم اگر مشکوک بوديم و يا آگلوتيناسيون ضعيف باشد مرحله بعد را انجام مي دهيم.

3- دو قطره آنتي هيومين گلوبولين (معرف کومبس) اضافه مي کنيم.

4- 3-4 دقيقه در حرارت اطاق و يا 37 انکوبه کرد.

5- با دور 1000 بمدت یک دقیقه سانتریفوژ می کنیم.

و سپس با انگشت دست به آرامی به ته لوله ضربه ملایممی زنیم و نتیجه آگلوتیناسیون را بررسی می کنیم.

آزمایش کومبس مستقیم:

هدف:

تعیین D-Anti هایی است که توسط مادر تولید شده و روی RBC جنین اتصال یافته اند. بنابراین نمونه لازم همان خون بند ناف (یا گلبولهای قرمز نوزاد) خواهد بود و این آزمایش هنگام تولد از نوزاد انجام می گیرد تا به موقع تعویض خون انجام شود.

آزمایش کومبس غیر مستقیم:

هدف:

تعیین آنتی کرهای D از سرم مادر است این آزمایش از سرم مادر در زمان قبل از حاملگی یا مراحل اول حاملگی انجام می گیرد تا مشخص شود آیا مادر در زایمان اول حساس شده یا نه.

آزمایش کومبس غیر مستقیم:

a- مرحله حساس کردن گلبول قرمز: ابتدا از گلبولهای قرمز گروه خونی O و سوسپانسیون 5% تهیه می کنیم.

1- در یک لوله آزمایش 12100 مقدار 100 میکرولیتر سوسپانسیون فوق را میریزیم.

2- مقدار 100 میکرولیتر سرم بیمار (مادر حامله) را اضافه می کنیم.

3- بمدت 30 دقیقه در بن ماری 37 درجه سانتیگراد انکوبه میکنیم.

b- مرحله شستشو و کومبس:

4- گلبولهای قرمز حساس شده فوق را 3 بار با سرم فیزیولوژی می شوییم.

5- پس از آخرین سانتریفوژ، لوله آزمایش را برگردانده و تمام سرم فیزیولوژی را خارج کرده و آخرین قطره را با دستمال کاغذی پاک می کنیم.

6- دو قطره معرف کومبس (آنتی هیومن- گلوبولین) را به لوله فوق اضافه می کنیم.

7- 3 دقیقه در حرارت 37 درجه سانتیگراد قرار می دهیم.

8- یک دقیقه در دور 1000 سانتریفوژ می کنیم.

تفسیر: نتیجه ازمایش را با ضربه ملایم به ته لوله بررسی می کنیم. آگلوتیناسیون مثبت دلالت بر حساس بودن سیستم ایمنی بدن بیمار بر علیه آنتی ژن مذکور می باشد.

در آزمایش کومبس مستقیم از خون بند ناف یا خون نوزاد بعد از تولد استفاده کرده و از مرحله 4 به بعد را انجام می دهیم.

کاربرد آزمایش کومبس غیر مستقیم:

1- مادران Rh منفی که احتمالاً بر علیه ژنD حساس شده اند.

2- آزمایش کراس مچ

3- تشخیص آنتی ژن (تست تکمیلی Rh و کومبس)

4- تشخیص گروههای خونی kellو Duffy و kidd

5- تشخیص آنتی بادیهای ناقص یا مسدود کننده.

**آزمایش رایت: Wright Test:**

برای تشخیص بیماری بروسلوزیس که بنامهای دیگر نظیر تب مالت، تب مواج نیز مشهور است بکار می رود عامل بیماری شامل باکتری زیر می باشد:

1- بروسلا آبور توس B.abortus عامل بیماری در گاو

2- بروسلا ملی تنسیس B.Melitensis عامل بیماری در گوسفند و بز

3- بروسلا کانیس B. canis عامل بیماری در سگ

4- بروسلا سوئیس B. suis عامل بیماری در خوک

روشهای تشخیص سرولوژیکی بروسلوز:

1- تهیه سرم:

از بیمار خون گرفته و سرم آن را جدا نمایید. چنانچه در روز تهیه سرم، نمونه مورد آزمایش قرار نگیرد، لازم است که تا روز آزمایش سرمها را در حرارت 8-2 درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

2- تست سریع یا آنگلوتیناسیون اسلایدی:

طبق جدول ذیل مقادیر مختلف سرم مورد آزمایش و آنتی ژن بروسلایی را در حفرات یا دوایر اسلاید شیشه ای مخصوص به وسیله پیپتهای سرولوژی اضافه نمائید. پس از اضافه کردن آنتی ژن، با آپلیکاتور از رقت پایین به رقت بالا محتوات آن را مخلوط می کنیم و بمدت 5 دقیقه در روی روتاتور حرکت دورانی می دهیم.

روش راپید:

|  |
| --- |
| شماره حفرات اسلاید 1 2 3 4 5 |
| سرم بیمار به میلی لیتر 08/0 04/0 02/0 01/0 005/0 |
| مقدار آنتی ژن بروسلایی یک قطره یک قطره یک قطره یک قطره یک قطره |
| رقت سرم 20 40 80 160 320 |
| حدود تیتر آنتی بادی 20/1 40/1 80/1 160/1 320/1 |

3- تست استاندارد لوله ای:

طبق جدول مقابل مقادیر مختلف سرم فیزیولوژی، سرم بیمار و آنتی ژن را که همان آنتی ژن مورد مصرف در روش اسلایدی است با این اختلاف که قبلاً با سرم فیزیولوژی 20 بار رقیق شده است را به ده لوله همولیز تمیز (میلیمتر 10013) به ترتیب زیر اضافه نمایید:

سپس محتویات لوله ها را مخلوط نموده و با جا لوله ای به مدت 48 ساعت در حرارت 37 درجه سانتیگراد قرار دهید و سپس با ضربه مختصری به انتهای لوله آزمایش آگلوتیناسیون را در ته لوله ها مشاهده کنید. آخرین لوله ای که آگلوتیناسیون داده باشد تیتر آنتی بادی را مشخص می کند. مثلا اگر آخرین لوله که در آن آگلوتیناسیون مشاهده شده است لوله شماره 6 باشد، تیتر آنتی بادی در سرم مورد آزمایش برابر 640/1 خواهد بود. یکی از طریق مطالعه آگلوتیناسیون برای صرفه جوئی در وقت، سانتریفوژ سریع لوله ها در 3000rpm به مدت یک دقیقه و مطالعه آگلوتیناسیون می باشد.

جدول رایت لوله ای:

|  |
| --- |
| شماره لوله 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 |
| سرم فیزیولوژی به ml 9/0 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0 |
| سرم بیمار ml 1/0 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0 |
| ابتدا به لوله شماره یک 0/1ml سرم بيمار را افزوده و محتویات را مخلوط نموده و 0/5ml برداشته و به لوله دوم منتقل کنید و این عمل را تا لوله شماره 9 ادامه دهید. سپس از لوله شماره 9، 0/5ml برداشته و دور بریزید و لوله دهم لوله کنترل آنتی ژن است. |
| آنتی ژن رقیق ml 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0 5/0  محتویات کل لوله ها برابر 1ml است |
| رقت نهایی سرم 20 40 80 160 320 640 1280 2560 5120 |
| تیتر سرم 20/1 40/1 80/1 160/1 320/1 640/1 1280/1 2560/1 5120/1 |

4- روش انجام آزمایش کومبس:

این آزمایش برای تشخیص آنتی بادیهای ناقص (Incomplete) یا مسدود کننده (Blocking)، خصوصاً در موارد رجعت بروسلوز یا مرحله مزمن می باشد.

1- ابتدا آزمایش رایت لوله ای را مطابق دستوری که گفته شده بطور کامل انجام داده و نتایج را یادداشت نمائید.

2- سپس لوله ها را به مدت 10 دقیقه در دور 3000 در دقیقه سانتریفیوژ و رسوب آنها را جدا و سه بار با سرم فیزیولوژی بشوئید.

3- پس از آخرین سانتریفیوژ، سرم فیزیولوژی بالای رسوب را دور ریخته و آخرین قطره آنرا روی دستمال کاغذی خارج نمایند. سپس به ته هر لوله یک قطره سرم آنتی گلبولین انسانی (سرم کومبس) اضافه کرده و لوله ها را تکان دهید.

4- لوله ها را نیم ساعت یا یکساعت در بن ماری 37 درجه سانتیگراد قرار دهید.

5- لوله ها را به مدت 10 دقیقه در دور 3000 در دقیقه سانتریفیوز نمائید.

6- نتیجه را با زدن ضربه آرامی به ته لوله ها بررسی و تیتر آخرین لوله ای که آگلوتیناسیون مشاهده گردید، گزارش نمائید.

5- روش انجام آزمایش رزبنگال:

آزمایش رزبنگال در منابع مختلف به اسامی رزبنگال پلیت تست، کاردتست ( Card test)، آزمون سریع یا راپید ( test) و غیره نامیده می شود. آنتی ژن رزبنگال به رنگ قرمز متمایل به صورتی و با PH اسیدی برابر با 05/0 6/3 و به جرم نهائی 8 درصد، از کلنی های صاف (smooth) بروسلا آبورتوس سویه 99 یا 19 که فاکتورهای آنتی ژنی مشترکی با دیگر سویه های بروسلا دارند، طبق روش استاندارد بین المللی در موسسه رازی. این آنتی ژن جهت تشخیص اولیه در برنامه های کنترل و ریشه کنی بروسلوز بکار می رود. آنتی ژن رزبنگال را باید دور از نور و در یخچال چهار درجه سانتی گراد نگهداری کرد و تا زمانی که اتو آگلوتینه نشده، قابل مصرف است. قبل از انجام آزمایش باید ابتدا آنتی ژن رزبنگال و سرم بیمار را از یخچال خارج کرده و در محیط آزمایشگاه به مدت 20 تا 30 دقیقه نگهداری نموده تا به دمای آزمایشگاه برسند. سپس روی یک صفحه شیشه ای یا سفید یک قطره معادل 03/0 میلی لیتر سرم را مجاور یک قطره آنتی ژن قرار داده و با یک میله نازک چوبی یا پلاستیکی، این دو قطره را با هم مخلوط و به اندازه دایره ای به قطر حدود 5/2 سانتی متر پخش نمائید. سپس صفحه را در دست یا روی روتاتور بمدت حداکثر چهار دقیقه حرکت داده و نتیجه آگلوتیناسیون را در زیر نور چراغ قرائت نمائید. واکنش مثبت به حالتی گفته می شود که دانه های آگلوتینه بطور مشخص جدا از هم دیده شوند و در موارد منفی، دو قطره مخلوط شده به حالت یکنواختی باقی خواهند ماند. در آزمایش رزبنگال موارد مشکوک دیده نمی شود و نتیجه با قاطعیت مثبت یا منفی می باشد.

تبصره 1: آ«تی ژن رزبنگال موسسه رازی را نباید رقیق کرد. در صورت رقیق کردن، خصوصیات آنتی ژن مانند تعداد ذرات میکروبی، PH و الکترولیتهای آن تغییر می کند و جوابهای مثبت یا منفی کاذب که با وضعیت بالینی هماهنگی ندارند، ایجاد می شود.

تبصره 2: آنتی ژن رزبنگال را نباید برای روش لوله ها استفاده کرد.

تبصره 3: آنتی ژن رزبنگال، نباید یخ بزند.

روش انجام آزمایش کومبس – رایت

این آزمایش برای تشخیص آ«تی بادیهای ناقص (Incomplete) یا مسدود کننده (Blocking)، خصوصاً در موارد رجعت بروسلوز یا مرحله مزمن می باشد.

1- ابتدا آزمایش رایت معمولی در لوله را مطابق دستوری که گفته شده بطور کامل انجام داده و نتایج را یادداشت نمائید.

2- سپس لوله ها را به مدت 15 دقیقه در دور 2000 در دقیقه سانتریفیوژ و رسوب آنها را جدا و سه بار با سرم فیزیولوژی بشوئید.

3- پس از آخرین سانتریفیوژ، سرم فیزیولوژی بالای رسوب را دور ریخته و آخرین قطره آنرا روی دستمال کاغذی خارج نمایند. سپس به ته نشین هر لوله یک قطره سرم آنتی گلبولین انسانس Polyspecific (سرم کومبس) اضافه کرده و لوله ها را تکان دهید.

4- لوله ها را نیم تا یکساعت در بن ماری 37 درجه سانتیگراد قرار دهید.

5- لوله ها را بمدت 15 دقیقه در دور 2000 در دقیقه سانتریفیوژ نمائید.

6- نتیجه را با زدن ضربه آرامی به ته لوله ها بررسی و تیتر آخرین لوله ای که آگلوتیناسیون مشاهده گردید، گزارش نمائید.

روش انجام آزمایش رایت سانتریفیوژ:

روش رایت سانتریفیوژ توسط دکتر نظری و همکاران در بخش ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران پیشنهاد شده است. برای انجام این آزمایش، سرم را طبق روش معمولی رایت در لوله ها رقیق کرده و به آنها آنتی ژن بروسلا را اضافه می کنند و بلافاصله با سرعت 2500 دور در دقیقه بمدت ده دقیقه سانتریفیوژ کرده و جوابها یادداشت می شوند. با این روش اکثراً پدیده منطقه ای نیز از بین می رود.

آزمایش 2ME-Wright Test:

این آزمایش پس از مثبت شدن آزمایش رایت انجام می شود تا کلاس آنتی بادی را تشخیص داد. با این آزمایش، مولکولهای IgM سرم از بین می روند ولی IgGو IgA نسبت به مواد احیا کننده در غلظتی که استفاده می شود، مقاوم است. مواد احیا کننده، پیوندهای دو سولفیدی (-S-S-) را بصورت SH، بین زنجیره های سنگین و سبک ایمونو گلبولین باز می کند. مهمترین کاربرد این آزمایش، تشخیص افتراقی بین بروسلوز فعال از غیر فعال در فردی که تظاهرات بالینی بیماری را ظاهراً دارد ولی کشت خون یا سایز نمونه ها، عاری از میکروب بروسلا و تیتر آزمایش رایت او نیز پائین است. بعلاوه با انجام این آزمایش می توان تأثیرر آنتی بیوتیک مناسب را در درمان بیماری تحت بررسی قرار داد.

محلولهای مورد لزوم:

1- تامپون یا بافر فسفات نمکی PBS=7.2 محتوی 1/0 مولار 2- مرکاپتواتانول ( محتوی 1/0 مولار 2- مرکاپتواتانول (2-ME)یا بافر فسفات نمکی محتوی 005/0 مولار 1 و 4- دی تیوترئیتول (DTT). از آنجایی که 2-ME بوی زننده ای دارد و باید در زیر هواکش یا هود (Hood) کار کرد، بنابراین اگر در آزمایشگاهی هود موجود نیست می توان از DTT استفاده کرد. بهتر است است تامپون 2- مرکاپتواتانل در روز آزمایش آماده شود و درب آن محکم بسته شده تا تبخیر و غیر فعال نگردد.

2- آنتی ژن بروسلا، سرم و سایر محلولهائی که برای این آزمایش بکار می روند باید فاقد فنل باشند، زیرا که فنل از کار مواد احیاء کننده (2-مرکاپتواتانل و دی تیوئیتول) جلوگیری می کند. در صورتی که آنتی ژن محتوی فنل باشد باید قبل از آزمایش چند بار آنرا با بافر فسفات نمکی شستشو داد.

روش کار:

1- تعداد 10 از لوله آزمایش سرولوژی را در جا لوله ای ممناسب قرار دهید. (جدول شماره 3-6).

2- مقدار 9/00 سانتی متر مکعب بافر فسفات نمکی محتوی ماده احیا کننده را در لوله آزمایش اول بریزید.

3- مقدار 1/0 سانتی متر مکعب سرم بیمار را به لوله اول آزمایش اضافه نموده و سر لوله را با کاغذ پارافیلم مسدود نمائید.

4- لوله اول را بمدت یکساعت در درجه حرارت اطاق یا 37 درجه سانتی گراد قرار داده و مواد احیا کننده اثر خود را نموده و باعث تجزیه و غیر فعال شدن IgM گردد.

پدیده منطقه ای یا پره زون:

در صورتی که غلظت آنتی بادی بیشتر از آنتی ژن باشد واکنش انجام نمی گیرد و احتمال جواب کاذب در لوله های اول وجود دارد که در تست رایت دیده می شود.

ب- روش اگلوتیناسیون سریع: Rapid Plate Agglutination Test

روی شیشه پاک و تمیزی بکمک خط کش و مداد شمعی حدود 64 مربع به ابعاد 5/1\*5/1 سانتی متر می کشیم سپس با استفاده از پی پت 1/0 میلی لیتر و یا سمپلر (Sampler) مقادیر 08/0، 04/0، 02/0، 01/0، 005/0، 002/0 میلی لیتر از سرم خون بیمار را در شش خانه افقی ریخته و یک قطره از آنتی ژن مورد نظر را به آنها اضافه می نمائیم.

مخلوط آنتی ژن و سرم را توسط اپلیکا تور چوبی بخوبی بهم می زنیم. شاهد نیز یک قطره آنتی ژن در خانه هفتم است شیشه را چندین بار تکان داده و نتیجه آزمایش را بعد از یک دقیقه به شرح ذیل ثبت می نمائیم.

100% اگلوتیناسیون با علامت (++++)، 75% اگلوتیناسیون با علامت (+++)، 50% اگلوتیناسیون باعلامت (++)، 25% اگلوتیناسیون با علامت (+) و بالاخره اگلوتیناسیون منفی با علامت (-) مشخص می شود. (تابلوی شماره 2).

لازم به یادآوری است که در روش اگلوتیناسیون سریع چند نکته زیر را باید مد نظر داشت.

1- تیتراژ برابر است با عکس بالاترین رقتی که با مقایسه شاهد حداقل 50% (++) اگلوتیناسیون از خود نشان دهد.

2- بعد از اضافه نمودن آنتی ژن مقادیر 08/0 تا 02/0 میلی لیتر از سرم خون به ترتیب معادل ، ،،،، رقت خواهد شد.

3- در این روش باید به محدودیت زمانی توجه خاصی نمودوضمن آزمایش نبایدشیشه الگوتیناسیون را نزدیک حرارت قرار دادکه هر دوصورت مقداری آب تبخیرگشته و نتیجه ای صحیح حاصل نمیگردد.

تابلو( 2)نمونه ثبت نتیجه در روش اگلوتیناسیون سریع

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| مقدارسرم  (ml) | رقت مشابه | شدت اگلوتیناسیون نمونه اول | نمونه دوم | نمونه سوم |
| 8% | 1:20 | \*\*\* | \*\*\* | \*\*\*\* |
| 4% | 1:40 | \*\* | \*\*\*\* | \*\*\* |
| 2% | 1:80 | \* | \*\*\* | \*\* |
| 1% | 1:160 | - | \*\* | \* |
| 005/0 | 1:320 | - | \* | - |
| 002/0 | 1:640 | - | - |  |
| تیتر سوم |  | 40 | 160 | 80 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| مقدارسرم  (ml) | رقت مشابه | شدت اگلوتیناسیون نمونه اول | نمونه دوم | نمونه سوم |
| 8% | 1:20 | \*\*\* | \*\*\* | \*\*\*\* |
| 4% | 1:40 | \*\* | \*\*\*\* | \*\*\* |
| 2% | 1:80 | \* | \*\*\* | \*\* |
| 1% | 1:160 | - | \*\* | \* |
| 005/0 | 1:320 | - | \* | - |
| 002/0 | 1:640 | - | - |  |
| تیتر سوم |  | 40 | 160 | 80 |

ج- روش اگلوتيناسيون لوله

اين روش که براي کليه نمونه سرمهاي مکشوک مورد استفاده قرار مي گيرد به مراتب حساس تر از روش اگلوتيناسيون سريع بوده و صرفا به وقت و لوازم آزمايشگاهي بيشتر نياز دارد.

روش آزمايش:

1. تهيه رقت آنتي ژن: در آزمايش ويدال ابتدا آنتي ژن سالمونلاي مورد نظري که براي آزمايش به روش آگلوتيناسيون سريع استاندارد گرديده را با محلول سرم فيزيولوژي فرمله (5/0% ) به نسبت⅛ رقيق مي نمائيم. در مورد آزمايش رايت ووايل فليکس بايد از آنتي ژني (بروسلا آبورتوس و پروتئوس ولگاريس) که براي آزمايش به روش لوله استاندارد گرديده استفاده نمود.
2. روش کار : تعداد ده لوله (10\*100) را در جا لوله اي قرار داده و در لوله اول 9/0 و در کليه لوله هاي بعدي 5/0 ميلي ليتر سرم فيزيولوژي (9/0 در صد) مي ريزيم به لوله اول 1/0 ميلي ليتر سرم مورد آزمايش را اضافه نموده و بعد از مخلوط نمودن آنها بوسيله پي پت، 5/0 ميلي ليتر از آنرا به لوله دوم و 5/0 ميلي ليتر از لوله دوم را به سوم و به ترتيب تا لوله نهم انتقال مي دهيم ضمنا 5/0 ميلي ليتر مايع اضافي لوله نهم را دور مي ريزيم. به هر يک از لوله ها 5/0 ميلي ليتر از آنتي ژن رقيق شده و يا استاندارد شده براي روش لوله را اضافه نموده و بعد از بهم زدن به شرح زير در گرمخانه قرار مي دهيم.

آنتي ژنهاي فلاژلا سالمونلاها به مدت يک ساعت در 50 درجه و يا سه ساعت در 37 درجه سانتيگرد.

آنتي ژنهاي سماتيک سالمونلاها به مدت 16 ساعت در 50 درجه و يا 24 ساعت در 37 درجه سانتي گراد.

آنتي ژن بروسلا آبورتوس (لوله) به مدت 24 تا 48 ساعت در 37 درجه سانتي گراد.

آنتي ژنهاي پروتئوس ابتدا به مدت 2 ساعت در 37 درجه سپس 16-18 ساعت در 4 درجه سانتي گراد.

بعد از زمان اينکوباسيون، بوسيله نور فلورسنتي که در زمينه سياهي بتابد درجه آگلوتيناسيون را با مقايسه شاهد (لوله دهم که داراي 5/0 ميلي ليتر آنتي ژن است) طوري ثبت مي نمائيم که علامت (++++) مشخص کننده صد در صد اگلوتيناسيون آنتي ژن با آنتي کر باشد يا بعبارت ديگر هنگاميکه در ته لوله آگلوتيناسيون به خوبي مشاهده گرديده و مايع لولهمانند سرم فيزيولوژي کاملاً شفاف باشد.

CRP Quantitative و اهميت بالين آن:

CRP يک پرزوتئين فاز حاد التهابي است که در حالت نرمال به تعداد خيلي کم در سرم وجود دارد (کمتر از 5/0 mg/dl در پي هر گونه التهاب، آزردگي بافتي ممکن است اين پروتئين تا 100 برابر افزايش يابد. بنابراين اندازه گيري آن در بيماريهاي مختلف از جمله در عفونتها، التهابات، تروما و انفارکتوس ميوکارد ارزش ويژه اي داشته و در تشخيص افتراقي، پيگيري و تاييد درمان اين بيماريها کاربرد دارد.

امروزه ثابت شده است که در تعيين مقدار کمي (Quantitative CRP) يا (hs CRP) در مقايسه با ابررسي شاخص هاي ديگر التهاب مانند تب – درد- افزايش گلبولهاي سفيد خون (WBC) و سرعت رسوبي گلبولي (ESR) قابل اعتمادترين شاخص است و به دليل نيمه عمر کوتاه آن بعد از حذف عامل تحريک سريعاً کاهش مي يابد و بعنوان يک آزمون غربالگري سودمند براي تشخيص و تاييد و پيگيري درمان بيماريهاي عفوني التهابي (ميکروبي) ويرال و انواع بدخيمي ها و انفارکتوس ميوکارد بکار ميرود.

- ارزش CRP hs در تشخيص بيماريهاي التهابي و انفارکتوس ميوکارد:

1. در حال عادي کمتر از 0/5 mg/dl نرمال محسوب مي گردد.
2. در بيماران عفونت حاد باکتريايي ميزان آن به 350-150 mg/dl مي رسد.
3. در بيماران عفونت حاد ويروس حدود 40-20 mg/dl مي باشد.
4. در موارد انفارکتوس ميوکارد به ميزان 10-4 mg/dl افزاي مي يابد.

* امروزا از CRP کمي يا CRP hs در مايع نخاع (CSF) براي افتراق سريع مننژيت باکتريال از ويرال استفاده مي شود.
* با کنترل مدام ميزان hs CRP امکان تشخيص زود رس مشکلات احتمالي پس از سکته قلبي را ميسر مي سازد.

متد اندازه گيري hs CRP : ايمونو توربيومتري يا روش اليزا مي باشد.

روش انجام آزمايش CRP:

در گذشته از پلي ساکاريد C پنوموکوک براي تشخيص CRP استفاده مي شد ولي به علت مشکلاتي که در تهيه اين آنتي ژن وجود دارد، امروزه از کيتي که بدين منظور تهيه مي شود، براي تشخيص CRP در سرم استفاده مي شود. در اين کيت، از آنتي بادي ضد CRP (anti CRP) براي تشخيص CRP در سرم استفاده مي شود.

ازاي موجود در کيت CRP

* 1. قطه چکان حاوي سرم کنترل مثبت (Positive Control)
  2. قطره چکان حاوي سرم کنترل منفي (Negative Control)
  3. قطره چکان حاوي آنتي بادي ضد CRP از کلاس IgG، که بر سطح ذرات لاتکس متصل شده است.
  4. اسلايدزمينه سياه
  5. اپليکاتور
  6. بافر براي رقيق کردن و تيراسيون سرم بيمار (در برخي از کيتها)

آزمايش CRP به دو روش کيفي و کمي انجام مي شود:

روش کيفي (اسلايدي):

روي اسلايد زمينه سياه يک قطره سرم بيمار، يک قطره سرم کنترل مثبت و يک قطره سرم کنترل منفي بريزيد.

شيشه محتوي ذرات لاتکس را به آرامي تکان داده، سپس به هر کدام از سه قطره سرم مرحله قبل، يک قطره از آن را اضافه نمايد.

با اپليکاتور هر کدام از سرم ها را با ذرات لاتکس، مخلوط نموده، به اندازه دايره اي به قطر دو سانتي متر پخش نمايد.

لام را به مدت 5 دقيقه به آرامي بر روي دست يا روتاتور حرکت دوراني داده و نتيجه آگلوتيناسيون را زير نور بررسي نموده به صورت زير گزارش نمايد.

آگلوتيناسيون درشت +++ (+3)

آگلوتيناسيون متوسط ++ (+2)

آگلوتيناسيون ريز +‌ (+1)

آگلوتيناسيون مشاهده نمي شود (سوسپانسيون يکنواخت و شيري رنگ) – (منفي)

در صورت اثبات وجود CRP در سرم بيمار، به منظور اندازه گير ي مقدار و يا تيتر آن در سرم، روش کمي (لوله اي) را انجام دهيد.

نکته: گاهي اوقات مقدار CRP در سرم بيمار بسيار زياد است، در نتيجه به علت پديده منطقه اي (Zone Phenomenon) ممکن است يک سرم مثبت، اشتباهاً منفي گزارش شود. بنابراين بهتر است چنانچه آزمايش CRP سرمي منفي شد، قبل از اينکه آن را منفي گزارش نماييد با رقت 5/1 يا بيشتر آزمايش را تکرار نماييد.

روش نيمه کمي (لوله اي)

براي هر نمونه سرمي، شش عدد لوله آزمايش را با شماره هاي1 تا 6 علامت گذاري کنيد.

به همه لوله ها 50 لاندا (میکرولیتر) تامپون یا سرم فیزیولوژی اضافه نمایید.

به لوله شماره 1، 50 لاندا سرم بيمار را اضافه نموده با تکان دادن لوله محتويات داخل لوله را مخلوط نماييد. (غلظت 2/1)

سپس 50 لاندا از محلول لوله شماره 1 را به لوله شماره 2 اضافه کنيد و بعد از مخلوط کردن اين عمل را براي لوله های دیگر بطور سریال تکرار نمائید. (2 به 3 و ...).

در آخر 50 لاندا از محلول لوله شماره 6 را بیرون بریزید.

با این روش رقتهای مختلفی از سرم (2/1، 4/1، 8/1، 16/1و ...) تهیه می شود.

هر کدام از نمونه های رقیق شده را بر اساس روش کیفی بررسی کنید.

آخرین رقتی که واکنش آگلوتیناسیون در آن قابل مشاهده است به عنوان تیتر CRP گزارش نمایید.

تست HCG به روش آگلوتیناسیون:

این تست کیفی و نیمه کمی بر اساس واکنش ایمونولوژیک بین hCG متصل به ذرات لاتکس و آنتی بادی های مونوکلونال که بر علیه قسمت های خاصی از زنجیر B ساخته شده اند صورت می پذیرد. در این محصول از روش غیر مستقیم (indirect) جهت بالا بردن حساسیت استفاده شده است. بدین ترتیب اگر غلظت این هورمون حدوداً بیش از 5/0 واحد (IU) در میلی لیتر ادرار باشد، اتصال آنتی بادی به آنتی ژن متصل به ذرات لاتکس (که سبب آگلوتیناسیون می گردد) صورت نخواهد پذیرفت. عدم آگلوتیناسیون نشان دهنده حاملگی خواهد بود. بر اساس این روش در صورت حاملگی، تست در 8-6 روز پس از قطع پریود مثبت می شود.

معرفها: معرف شماره 1 = محلول آنتی بادی مونوکلونال، معرف شماره 2 = سوسپانسیون لاتکس، معرف شماره 3 = کنترل مثبت، معرف شماره 4 = کنترل منفی.

توجه: معرفها در یخچال (2 تا 8 درجه) تا تاریخ انقضاء کیت قابل استفاده خواهند بود.

* سوسپانسیون لاتکس را قبل از استفاده به آرامی تکان دهید و از انجماد آن جداً ودداری نمایید.
* معرفها حاوی Sodium azide می باشند. در مصرف آنها احتیاط کنید.

نمونه های آزمایش:

* جهت انجام آزمایش، اولین ادرار صبحگاهی که حاوی HCG بیشتری می باشد توصیه می شود.
* لازم است که نمونه های ادرار در ظروف خشک و تمیز بدون مواد شوینده جمع شوند.
* بسیار ضروری است که نمونه کاملاً شفاف باشد. مواد نا محلول در نمونه ممکن اسن باعث تداخل در واکنش و ایجاد نتایج کاذب شوند. قویاً توصیه می شود که در صورت نیاز جهت حصول به نمونه کاملاً شفاف ادرار صبحگاهی با دور بالا سانتریفوژ شود.
* توصیه می شود که نمونه های ادرار بلافاصله بعد از جمع آوری (تهیه) تست شوند یا اینکه در یخچال قرار داده شوند. در این صورت حداقل برای مدت 24 ساعت پایدار خواهند بود. برای مدتهای طولانی تر لازم است که نمونه ها Sodiumazide (1/0 درصد) اضافه شود. یا در فریزر (-20C) قرار داده شوند.

نمونه های فریز شده بایستی کاملاً شفاف باشند. در غیر اینصورت سانتریفوژ نمودن آنها ضروری است.

* وجود خون یا آلودگی های میکروبی می توانند باعث نتیجه غلط بشوند. در اثر مصرف بعضی از داروها امکان مشاهده نتایج کاذب وجود دارد.

روش آزمایش:

در انجام آزمایش تعیین حاملگی لازم است که اسلاید و نمونه ادرار به درجه حرارت اطاق رسیده باشند. رساندن سوسپانسیون لاتکس و محلول آنتی بادی به درجه حرارت اطاق ضروری نمی باشد. اسلاید را با آب ولرم بشویید و بلافاصله بخوبی خشک کنید. از نگهداری دراز مدت آن در آب خودداری فرمایید. مراحل زیر را به دقت انجام دهید.

الف- روش کیفی:

1- 50 میکرولیتر (یا یک قطره، با استفاده از قطره چکان همراه کیت) از نمونه های ادرار را در وسط دایره قرار دهید. سپس یک قطره از محلول آنتی بادی را در حالیکه ویال حاوی این معرف به حالت عمودی نگهداری شده است، در کنار آ«ها بچکانید.

2- با استفاده از همزن پلاستیکی، قطرات را طوری مخلوط نمایید تا کاملاً سطح داخلی دایره را پوشانده و حداقل برای مدت 30 ثانیه بصورت دورانی در دست یا با استفاده از روتاتور حرکت دهید.

3- سوسپانسیون لاتکس را به آرامی تکان دهید و یک قطره از آن را به هر یک از نمونه ها بچکانید.

4- با استفاده از همزن پلاستیکی، قطرات را مخلوط نموده و در سطح دایره ها پخش نمایید.

5- اسلاید را مجدداً بطور دورانی برای مدت 2 دقیقه حرکت دهید.

6- میزان آگلوتیناسیون را بصورت زیر گزارش کنید:

* بدون آگلوتیناسیون و کاملاً شیری منفی (حاملگی مثبت)
* آگلوتیناسیون مشخص مثبت (حاملگی منفی)
* آگلوتیناسیون ضعیف (مشکوک)

ب- روش نیمه کمی:

1- برای هر نمونه ادرار، 6 عدد لوله آزمایش را با شماره های 1 تا 6 علامت گذاری کنید.

2- 5/0 میلی لیتر PBS یا سرم فیزیولوژی را به لوله شماره 1 و 2/0 میلی لیتر از آن را به لوله های 2 تا 6 اضافه کنید.

3- به لوله شماره 1) 5/0 میلی لیتر از ادرار مورد آزمایش اضافه نمایید و تکان دهید تا مخلوط شود.

4- 2/0 میلی لیتر از محلول شماره 1 را به لوله شماره 2 اضافه کنید و بعد از مخلوط کردن این عمل را برای لوله های دیگر بطور سریال تکرار نمایید (2 به 3 ...)

5- هر کدام از نمونه های رقیق شده را بر اساس روش کیفی فوق بررسی کنید و از اطلاعات زیر جهت مشخص کردن مقدار نیمه کمی هورمون hCG استفاده نمایید (بعنوان مثال، اگر اگلوتیناسیون در نمونه اولیه که 32 برابر رقیق شده است دیده نشود، نمونه حدوداً حاوی 24 واحد از hCG در میلی لیتر خواهد بود).

رقت نمونه ادرار غلظت تقریبی hCG (Iu/ml)

1:2 5/1

1:4 3

1:8 6

1:16 12

1:32 24

1:64 48

اساس تست RPR:

آنتی ژن RPR یک سوسپانسیون کاردیولیپین حاوی ذرات بسیار ریز شارکول است. این آنتی ژن یک آنتی بادی ضد چربی را شناسایی می کند که به آن رآژین می گویند. رآژین در بیماران سیفلیسی و نیز گاهی در سرم بیماران مبتلا به دیگر بیماریهای حاد یا مزمن یافت می شود. هر گاه نمونه ای حاوی رآژِین ها باشد، یک فلوکولاسیون آنتی ژن بوجود می آید که ذرات شارکول را کواگول کرده و کلامپهای سیاه به اندازه های مختلف بر حسب تیتر آنتی ژن بوجود می آورد. با نمونه های فاقد رآژین هیچ واکنشی پدید نمی آید و یک سوسپانسیون یکنواخت خاکستری رنگ بر جا می ماند.

معرفها و اجزاء کیت: سوسپانسیون آنتی ژن RPR، ویال تقسیم کننده آنتی ژن، سر سوزن که هر قطره آن معادل 16/0 میلی لیتر است. پیپت برای انتقال و هم زدن سرم یا پلاسما، اسلاید

احتیاط: نمونه باید از بیمار در حالت ناشتا گرفته شود. سرمهای لیپیک ممکن است واکنش کاذب نشان دهند. با نمونه واضحاً همولیز شده آزمایش انجام نشود. نمونه های آلوده دور انداخته شوند. نیازی به غیر فعال کردن سرم نیست.

**تهیه آنتی ژن:**

- ویال حاوی آنتی ژن را قبل از مصرف به خوبی تکان دهید . از تکان های شدید اجتناب گردد.

- سوزن را به ویال تقسیم کننده متصل نموده و به آرامی مقدار مورد نیاز آنتی ژن را بداخل ویال پلاستیکی بکشید.

- هر بار پس از پر نمودن ویال پلاستیکی شماره lot و تاریخ انقضاء آنتی ژن و تاریخ پر نمودن ویال را بر روی آن ثبت نمائید.

**جمع آوری نمونه:**

1- سرم از سانتریفوژ خون تازه لخته شده تهیه گردد. اگرچه حرارت ندیده می تواند استفاده شود ولی می توان سرم را به مدت 30 دقیقه و در 56 درجه سیلسیوس حرارت داد. در زمان انجام آزمایش درجه حرارت نمونه باید معادل درجه حرارات اتاق 30-20 درجه سیلسیوس باشد.

چنانچه آزمایش بلافاصله انجام نمی گیرد نمونه را می توان تا 48 ساعت در 8-2 درجه سیلسوس نگهداری کرد.

2- پلاسما: نمونه انتخابی جهت انجام این تست سرم است، هرچند می شود از پلاسما نیز استفاده نمود.

- پلاسما را از خون تازه حاوی ماده ضد انعقاد، ( EDTA، هپارین، اگزالات پتاسیم، سدیم فلوراید) تهیه نمائید. دقت شود که ماده ضد انعقاد آن بیش از اندازه نباش به خصوص در مورد اگزالات پتاسیم و سدیم فلوراید که ممکن است باعث نتایج کاذب گردند.

- از مایع مغزی نخاعی استفاده نشود.

- از آزمایش نمونه های مشخصاً آلوده، شدیداً همولیز شده، کدر یا شیری رنگ (Cjylous) خودداری گردد.

**روش کیفی:**

- دمای سوسپانسیون آنتی ژن RPR ، کنترلها را به دمای اتاق برسانید 30-20 درجه سیلسوس و سر سوزن را به ویال پلاستیکی متصل نمائید.

- قبل از انجام هر سری آزمایش بهتر است با کنترلهای مثبت و منفی ابتدا آنتی ژن را آزمایش نمایئد.

- با استفاده از پیپت پلاستیکی منتقل کننده یک قطره از نمونه را در یک خانه اسلاید قرار دهید. در هنگام مصرف پیپت اتوماتیک قطره باید معادل 50 میکرولیتر باشد.

- با استفاده از انتهای پهت پیپت پلاستیکی نمونه را در سطخ خانه اسلاید پخش نمائید.

- پیپت پلاستیکی را دور بیاندازید.

- ویال پلاستیکی خاوی آنتی ژن RPR (متصل به سر سوزن) را به آرامی تکان دهید و در یک وضعیت عمودی نسبت به سطح اسلاید نگهداری و اجازه دهید یک قطره آزاد از آن (معادل 16 میکرولیتر) بر روی سرم بچکد.

- آنها را مخلوط نکنید:

- اسلاید را به مدت 8 دقیقه و به وسیله یک روتاتور با 100 دور در دقیقه بچرخانید.

- پس از این مدت اسلاید را برداشته و به آهستگی حرکت دهید و آن را در زیر نور لامپ بررسی نمائید.

- پس از پایان آزمایش ها سر سوزن را با آب مقطر شسته اجازه دهید بتدریج در دمای اتاق خشک شود. بر روی آن دستمال نکشید زیرا لایه سیلیکون سطح آن را از بین می برد. درب ویال را بسته و در 8-2 درجه سیلسوس قرار دهید.

**تفسیر نتایج:**

1- فعال یا مثبت (Reactive) بصورت کلامپهای واضح سیاه است ( که ممکن است به درجات مختلف از ضعیف، متوسط تا شدید دیده شود.)

2- غیر فعال یا منفی ( NotReactive) در سطح اسلاید سوسپانسیون خاکستری یکنواخت دیده می شود.

هر نوع فلوکولاسیون خفیف اما مشخص نیز باید به عنوان فعال(Reactive) یا مثبت گزارش شود.

نتایج مثبت می تواند دلیلی بر عفونت فعلی یا گذشته باترپونم پاتوژن باشد.

نتایج منفی همراه با فقدان علائم بالینی سیفیلیس ممکن است دال بر عفونت درمان شده یا عدم وجود عفونت باشد.

**روش کمی:**

جهت انجام آزمایش به روش کمی، سرم را به وسیله نرمال سالین به صورت سریال با نسیت 2/1 رقیق نموده و تست نظیر روش ذکر شده در بالا مجددداً تکرار نمائید. چنانچه رقت 6/1 سرمی مثبت باشد برای تهیه رقت های بالاتر از آن از سرم منفی که با نرمال سالین به صورت 50/1 رقیق شده است استفاده گردد.

**محدودیت های روش:**

گاهی یک واکنش پروزون (کامل یا نیمه مهار شده) با سرمهای رقیق نشده ممکن است دیده شود. تمام نمونه هایی که به هر میزان در روش کیفی مثبت یا فعال باشند باید مجدداً با روش کمی آزمایش شوند.

یک تست منفی یا غیر فعال RPR عفونت نهفته سیفیلس را رد نمی کند. نتایج منفی ممکن است در مرحله ابتدایی سیفیلس اولیه، سیفیلیس ثانویه به علت پدیده پروزون و در بعضی موارد سیفیلس تاخیری مشاهده گردد.

2- نتایج مثبت تست RPR جهت تایید وجود بیماری سیفلیس باید با یک تست ترپونمال نیز تایید شوند مگر بیماربانی که علائم و نشانه های دیاگنوستیک بیماری سیفلیس را دارا هستند.