





بر اساس استانداردهای جهانی طراحی و ساخته شده و هیچگونه صرفه‌جویی غیرمنطقی در آن نشده است، پس از کاربرد اولیه، برای استفاده مجدد در آینده و نیز در طول دوران انجام واکنش کافی است که سرپوش پلیت BIRD را به شکل درست بر روی کفه قرار دهید و هیچگونه نیازی به چسب کاری منافذ پلیت و نگرانی از خشک شدن سریع ژل نداشته باشید.

**هشدار:** این فرآورده هرگز نباید یخ بزند، یخ زدن سبب انهدام اجزای سازنده این فرآورده می‌شود و آن را غیر قابل استفاده می‌کند.

### مواد و ابزار مورد نیاز

۱. صفحه شیشه‌ای تراز (کد سفارش بهارافشان *Level Table*).
۲. خط‌کش ویژه و استاندارد «*SRID Triangle*» برای اندازه‌گیری قطر دایره واکنش (کد سفارش بهارافشان *SRID Triangle*) یا ذره‌بین ویژه.
۳. کاغذ میلی‌متری
۴. سمپلر ۲ و ۵µL و یا سرنگ هامیلتون ۱۰µL
۵. سرم فیزیولوژی برای رقیق‌سازی نمونه (کد سفارش بهارافشان *PHSE*).

### نمونه مورد نیاز و شرایط نگهداری آن

۱. نمونه‌های قابل استفاده در پلیت‌های BIRD شامل سرم و پلاسما ادرار و CSF است.
۲. سرم و یا پلاسما را در یخچال  $4^{\circ}\text{C}$  تا  $2^{\circ}\text{C}$  نگهداری کنید. اگر فاصله زمانی بین برداشت نمونه و انجام آزمایش بیش از چند ساعت است باید نمونه در جایی و در سرمای  $20^{\circ}\text{C}$  نگهداری شود. به‌خاطر ناپایداری اجزای کمپلمان، بهتر است سرم مورد آزمایش برای کمپلمان‌ها را بلافاصله پس از جداسازی از خون به جایی  $20^{\circ}\text{C}$  منتقل کنید.

### آماده‌سازی و تدارکات پیش از آزمایش

۱. بسته پلیت BIRD مورد نظر را از یخچال بیرون آورده و به دمای اتاق برسانید.

۲. پلیت BIRD را از داخل جعبه مقوایی و کیسه زیپ‌دار بیرون آورده و لبه کیسه مرطوب را با قیچی بریده و پلیت BIRD حاوی ژل را بیرون بیاورید. (کیسه زیپ‌دار را برای نگهداری مجدد پلیت در یخچال حفظ کنید).

۳. پیش از ریختن نمونه‌های سرم (کالیبراتور، کنترل و یا بیمار) سرپوش پلیت BIRD را برداشته و بگذارید آب و رطوبت موجود در چاهک‌ها تبخیر شود.

۴. نمونه‌های مورد آزمایش و کالیبراتورها را از یخچال بیرون آورده و به دمای اتاق برسانید. پیش از برداشت از نمونه و آماده کردن آن‌ها آن‌ها به آرامی چندبار وارونه کنید تا کاملاً یکنواخت و همگن شود. توجه داشته باشید که کالیبراتورهای مورد استفاده کدر نبوده و رسوب نداشته باشند.

۵. رقیق کردن نمونه برای کالیبراتور کنترل و سرم بیمار یکسان می‌باشد (طبق جدول ۲ و ۳ پیوست).

۶. نمونه‌های Urine و CSF مستقیماً در داخل پلیت تزریق می‌شود و عدد به‌دست آمده را تقسیم بر رقت پلیت می‌کنیم.

### روش ریختن نمونه به داخل چاهک پلیت BIRD

۱. قبلاً بروی یک کاغذ نام بیمار، شماره پرونده و شماره چاهک مربوط به آن نمونه را یادداشت کنید. به‌طور معمول سه چاهک شماره ۱، ۲ و ۳ برای کالیبراتورها و چاهک شماره ۴ را برای سرم کنترل در نظر گرفته می‌گیرند.
۲. به کمک سمپلر یا سرنگ هامیلتون، بدقت حجم مورد نیاز از هر نمونه آماده شده را داخل چاهک از پیش تعیین شده خود بگذارید.
- نکته در مورد IgA:** اگر برای ریختن حجم ۲µL، سمپلر و یا سرنگ هامیلتون در اختیار ندارید، می‌توانید نمونه مورد آزمایش را به میزان ۵۰µL در ۱۰µL سرم فیزیولوژی رقیق کرده و ۵µL آن‌را بداخل چاهک بریزید، نتیجه یکسان خواهد بود.

۳. برای گذاشتن نمونه، نوک سمپلر و یا سرنگ هامیلتون حاوی نمونه را تا ته چاهک برده و به آرامی شروع به تخلیه سمپلر کنید و همزمان با پر کردن چاهک، نوک سمپلر را به آرامی بالا بکشید. چاهک‌ها برای پذیرش





حجم مورد نظر ایجاد شده‌اند ولی توجه بیشتر در گذاشتن نمونه و سرریز نکردن از چاهک نتیجه دقیق‌تری را به همراه دارد، بوجود آمدن حباب هوا در کف چاهک سبب سرریز شدن از سر چاهک است.

۴. پس از گذاشتن نمونه‌ها در چاهک‌های مربوطه سرپوش پلیت BIRD را گذاشته و چند دقیقه صبر کنید تا سرم‌ها و یا مایعات مورد آزمایش بدون ژل نفوذ کرده و جذب شوند.

### شرایط انجام واکنش در پلیت BIRD

پس از جذب نمونه‌ها بداخل ژل پلیت BIRD را وارونه کرده و به‌شکل وارونه بر روی صفحه شیشه‌ای تراز (کد سفارش بهارافشان *Level Table*) قرار دهید. ساعت و تاریخ نمونه‌گذاری را یادداشت کرده، پلیت BIRD را برای زمان تعیین شده در دمای اتاق نگاهدارید.

### شیوه بررسی واکنش در پلیت BIRD

قطر رسوب دایره مربوط به هریک از کالیبراتورها، کنترل و نمونه بیماران را جداگانه با خط‌کش مخصوص SRID Triangle اندازه‌گیری کنید. مشاهده و اندازه‌گیری واکنش رسوبی دایره‌ها در مقابل پس‌زمینه سیاه مات و تابش نور از پهلو به‌شکل دقیق‌تری انجام می‌گیرد.

میزان هریک از ایمونوگلوبولین‌ها و یا اجزای کمپلمان در نمونه‌های مورد آزمایش براساس مقایسه قطر دایره رسوبی نمونه با کالیبراتورها، محاسبه می‌شود. رسم منحنی استاندارد این مقایسه را ممکن می‌سازد. اگر قطر دایره رسوبی نمونه بیمار بالاتر از دامنه کالیبراتور شماره ۳ باشد، باید با رقیق کردن نمونه، آزمایش را تکرار کنید. برای این کار نمونه را با یک رقت انتخابی بیش از رقت اصلی کار کنید و جواب به‌دست آمده را در رقت انجام شده نسبت به رقت اصلی ضرب کنید (طبق جدول ۲ و ۳ پیوست).

### روش کاربرد خط‌کش BIRD SRID Triangle

خط‌کش SRID Triangle در محور اندازه‌گیری دارد، یکی خط‌کش

میلی‌متری ۲۳ سانتی در لبه است و دیگری مثلث اندازه‌گیری قطر دایره رسوبی در داخل صفحه تا ۱۰mm است. در داخل صفحه خط‌کش *SRID Triangle* دو خط کج و یک خط موازی با افق در وسط به‌شکل میانه وجود دارد، خطوط کوتاه عمودی، با فاصله معین، دو خط کج یا ساق‌های مثلث ناقص را مدرج کرده‌اند. ارقام روی خطوط کوتاه عمودی، نمایانگر مجذور این فاصله و در واقع مجذور قطر دایره‌های رسوبی ( $d^2$ ) می‌باشند. برای اندازه‌گیری قطر دایره‌های رسوبی به‌وسیله خط‌کش *SRID Triangle*، پلیت BIRD را از پشت روی خط‌کش گذاشته و آنقدر آن را جابجا کرده تا محیط خارجی دایره رسوبی با دو خط کج کاملاً مماس شود و خط میانه درست از وسط چاهک بگذرد. در این حالت رقم پایین خط کوتاه عمودی که از وسط چاهک می‌گذرد، نشان‌دهنده قطر دایره رسوبی (d) است که می‌توان مجذور همان قطر را ( $d^2$ ) در بالای خط کوتاه عمودی یافت.

برای اندازه‌گیری واکنش‌های رسوبی بیضی شکل باید اندازه‌گیری را در دو جهت عمود بر هم انجام داد و میانگین دو قطر کوچک و بزرگ را بر روی منحنی برد. در صورتی که دایره واکنش بیش از ۱۰mm باشد، باتوجه به نکات یاد شده در بالا، با استفاده از لبه مدرج خط کش دایره واکنش را اندازه‌گیری کنید.

هشدار: برخی از خط‌کش‌های موجود در بازار که بر روی کاغذهای شفاف فتوکپی شده، خارج از استاندارد بوده و قسمت‌هایی از مثلث بر روی خط‌کش محاسبه اصلی، که از آن صرفاً یک برداشت تصویری و بدون محاسبه شده است، قابل انطباق نیست. به خطای ناشی از محاسبه با این خط‌کش‌ها توجه داشته باشید.

### روش رسم منحنی و اندازه‌گیری غلظت

بر روی محور افقی X غلظت کالیبراتورهای به‌کارگرفته شده و بر روی محور عمودی Y قطر دایره‌های رسوبی هر کالیبراتور (d) را جداگانه علامت‌گذاری کنید. نقاط بدست آمده از کالیبراتورها (غلظت





معین و قطر دایره‌های رسوبی هر کالبراتور یعنی  $d$  را علامت‌گذاری کنید و سپس با اتصال آن نقاط بیکدیگر، منحنی استاندارد را رسم کنید، بهترین روش رسم منحنی خطی (linear) بوده که در بهترین حالت خود از میان نقاط ۱، ۲ و ۳ با فاصله مساوی عبور میکنند. نقاط کالبراتور که بیش از حد از خط مفروض دور شده را نباید در نظر گرفت. برای تعیین غلظت نمونه بیمار، از نقطه مربوط به قطر دایره رسوبی آن، خطی موازی محور X رسم کرده تا منحنی را قطع کند سپس از آنجا خطی عمود بر محور X رسم کنید، عدد مربوطه بیانگر غلظت نمونه بیمار است.

### عواملی که سبب دریافت نتیجه نادرست می‌شوند

۱. بقایای مایعات شستشو در شیشه‌آلات و نوک‌های سمپلر مورد استفاده که باعث عدم تشکیل واکنش رسوبی می‌گردند.
۲. سرم و یا نمونه‌هایی که به مدت زیاد در دمای خارج از یخچال مانده‌اند.
۳. به‌کارگرفتن پلیت تاریخ گذشته برای انجام آزمایش.
۴. به‌عنوان یک اصل کلی برای روش SRID، خطای مطلق در نمونه‌هایی که میزان پروتئین آنها کم است، بیشتر می‌شود (مواردی که قطر دایره واکنش  $[d]$  کمتر از  $5 \text{ mm}$  است).  $[d > 5 \text{ mm}]$  بهتر است برای این دسته از نمونه‌ها از روش‌های دقیق‌تری مانند الایزا استفاده شود.
۵. ریختن نمونه به شکل نادرست، اعم از کم و زیاد ریختن حجم سرم و یا حوادثی که حرکت رسوبی واکنش را از حالت دایره دربرآورد: الف) زخمی کردن ژل به هنگام ریختن نمونه در چاهک. ب) سرریز کردن از چاهک‌ها و لبریز شدن نمونه بر روی سطح ژل.

### اثر عوامل گوناگون بر نتایج

اگر نمونه‌های مورد آزمایش برای یک پلیت BIRD کفایت کرده است، مشکل خاصی ایجاد نمی‌شود، اما اگر پلیت BIRD چاهک‌های قابل استفاده دارد باید به نکات یاد شده در پایین توجه شود.

۱. **استفاده مجدد:** برای استفاده مجدد از پلیت‌هایی BIRD که برخی از چاهک‌های آن استفاده شده باشد، می‌توان حداکثر تا سه هفته بعد در پلیت BIRD را بسته و در داخل کیسه زیپ‌دار خودش گذاشته و آن را وارونه در یخچال  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری کرد.

۲. **منحنی استاندارد:** اگر منحنی اولیه را براساس واکنش نهایی (endpoint) رسم نکرده باشید، در صورت نگاهداری پلیت BIRD به مدت طولانی، بهتر است که برای نمونه‌های مورد آزمایش جدید، منحنی استاندارد جدیدی را رسم کرد، زیرا احتمال دارد ضریب زاویه قسمت خطی منحنی تغییر کرده باشد.

۳. **حرارت:** افزایش حرارت محیط تا محدوده‌ای خاص سبب افزایش سرعت واکنش می‌گردد و پس از آن نقش معکوس و تخریبی برای واکنش رسوبی ایفا می‌کند. نباید پلیت BIRD را پس از استفاده اولیه برای مدت طولانی در دمای اتاق قرار داد، زیرا واکنش مربوطه تحت تأثیر دمای زیاد، سبب گسترش بیش از حد قطر دایره‌های رسوبی می‌گردد و آن‌را غیرقابل استفاده می‌سازد.

۴. **زمان:** واکنش رسوبی متأثر از زمان است، همانطور که پیشتر یاد شد، زمان خواندن واکنش یا ثابت است و یا از پیش تعیین شده، واکنش‌های رسوبی نمی‌توانند همیشه ادامه یابند، بالعکس، به محض به تعادل رسیدن دو طرف واکنش (Ag-Ab) متوقف می‌شود.

### محدودیت‌های روش SRID برای اندازه‌گیری

به‌طورکلی روش SRID از حساسیت زیادی برخوردار نبوده و امروزه در جهان جایگزین سریعیتر، ویژه‌تر و حساس‌تری همچون روش‌های نفولومتری و تور بیدیمتری را بدنبال خود دارد. در کشور ما روش SRID به‌دلایل گوناگون مورد استقبال و استفاده قرار گرفته است. اما چند مورد وجود دارد که قطعاً مصرف‌کننده باید به آن توجه کافی داشته باشد از جمله اینکه:

\* **پلیمریزه شدن ایمونوگلوبولین** در برخی از بیماری‌ها مانند میلوم مولتیپل (MM) و ماکروگلوبولینمی والدنشتروم سبب کاهش سرعت انتشار





می شود، همین امر سبب می شود که حرکت ایمونوگلوبولین کند شده و میزان ایمونوگلوبولین ها کمتر از مقدار واقعی خود به دست آید.

**\* مونومر شدن ایمونوگلوبولین M** در سرم افراد مبتلا به ماکروگلوبولینمی، لوپوس اریتماتوز (LE)، آرتریت روماتوئید و آتاکسی تلاژنکازی سبب انتشار و گستردگی وسیع تر از ملکول های پنتامر IgM شده و باعث می شود به شکل کاذب میزان آن بیشتر از مقدار واقعی خود به دست آید.

### اندازه گیری IgG، IgA، IgM و کاربردهای بالینی

ایمونوگلوبولین های IgG، IgA، IgM مؤثرترین اجزای دفاعی سرم انسان می باشند. اندازه گیری آنها در بررسی بیماران مشکوک به عفونت های مکرر یا اختلال در سیستم ایمنی سرمی از گام های ابتدایی تشخیص است.

**\* چند نکته درباره IgG:** بیشترین مقدار ایمونوگلوبولین های موجود در سرم را IgG تشکیل می دهد. میانگین IgG در سرم بزرگسالان حدود ۱۱۰۰ mg/dl می باشد. بیشتر آنتی بادی ها در افراد طبیعی مانند آنتی بادی های ضدباکتری ها، ویروس ها، انگل ها، قارچ ها، توکسین های محلول و آنتی ژن Rh از کلاس IgG هستند. این آنتی بادی توانایی گذر از جفت را در دوران حاملگی را داشته که خود سبب ایجاد ایمنی موقت در چند ماه اول زندگی در نوزادان است. کاهش این ایمونوگلوبولین آسیب های جدی را به همراه دارد.

**\* چند نکته درباره IgM:** ایمونوگلوبولین M تا ۸٪ ایمونوگلوبولین های سرم را تشکیل می دهد و میانگین آن حدود ۱۰۰ mg/dl می باشد. این مولکول نقش اصلی را در واکنش های آگلوتیناسیون دارد. معمولاً ایزوهماگلوبولین ها، آگلوتینین های سرد، فاکتور روماتوئید، آنتی بادی های هتروفیل مانند آنتی بادی واسرمن و آنتی بادی ایجاد شده بر علیه بعضی از آنتی ژن های دیواره باکتری های گرم منفی از کلاس IgM هستند. همچنین آنتی بادی های ایجاد شده بر علیه آنتی ژن های مستقل از تیموس از کلاس IgM می باشند. این آنتی بادی از جفت نمی گذرد

و میزان آن در سرم نوزادان و خون بندناف ناچیز بوده و یا اصلاً وجود ندارد، اما در عفونت های داخل رحمی شامل سرخچه، توکسوپلاسموز، هرپس HSV، ویروس سیتومگال (TORCH) CMV میزان آن شدیداً افزایش می یابد. به همین علت تعیین کلاس آنتی بادی ها در نتایج مثبت بدست آمده در بررسی TORCH نوزاد و مادر از اهمیت خاصی برخوردار است. ایمونوگلوبولین M اولین آنتی بادی است که بلافاصله بعد از تحریک آنتی ژن در پاسخ اولیه ظاهر می شود، لذا کاهش این ایمونوگلوبولین بدن را آماده بسیاری از بیماریها کرده و سبب کاهش دفاع اولیه بدن می شود.

**\* چند نکته درباره IgA:** این ایمونوگلوبولین به سه شکل تک مولکولی (monomer)، دو مولکولی (Dimer) و یا ترشچی (secretory) وجود دارد. دریافت خون کامل و یا پلاسما تازه در کسانی که مبتلا به کمبود IgA هستند همراه با واکنش های ایمنی شدیدی است که ناشی از واکنش آنتی بادی بر علیه IgA است. افزایش IgA سرمی در بیماران مبتلا به عفونت چرکی و مزمن برونش ها شایع می باشد. IgA ترشچی در آب دهان، آغوز و ترشحات مخاطی دستگاه گوارش و مجاری ادراری و تناسلی و به طور کلی در بیشتر ترشحات بدن وجود دارد. IgA ترشچی دارای یک جزء موسوم به قطعه ترشچی می باشد. میانگین IgA در سرم افراد طبیعی حدود ۲۳۰ mg/dl می باشد.

### اندازه گیری C3 و C4 و کاربردهای بالینی

کمپلمان به حالت پلکانی و یا آبشاری عمل کرده و نقش عمده ای در دفاع بدن در مقابل عوامل بیماریزای دارد از جمله دفاع بدن از واکنش های آنافیلاکسی، کمک در بیگانه خواری فاگوسیت ها و انهدام سلول های هدف است.

اجزای پروتئینی تشکیل دهنده آبشار کمپلمان از نظر ساختمان و کار متفاوت هستند و فعالیت آنها در دو مسیر کاملاً جداگانه انجام می پذیرد؛ یکی مسیر کلاسیک (اصلی) و دیگری مسیر آلترناتیو (جنبی) است. عوامل محرک و فعال کننده مسیرهای دوگانه از نظر مکانیزم متفاوت و مهمترین





## پلیت ایمونودیفیوژن (SRID Plate) بهار افشان

اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان CH50	IDCH50
اندازه‌گیری IgG در سرم و مایعات بدن	IDG
اندازه‌گیری IgM در سرم و مایعات بدن	IDM
اندازه‌گیری IgA در سرم و مایعات بدن	IDA
اندازه‌گیری C3 در سرم و مایعات بدن	IDC3
اندازه‌گیری C4 در سرم و مایعات بدن	IDC4
اندازه‌گیری ترانسفرین در سرم	IDTR
اندازه‌گیری آلفا - 1 آنتی تریپسین در سرم	IDAAIT
سرم کنترل و کالیبراتور ایمنی شناسی	IDIC, IDCS
خط کش ویژه اندازه‌گیری ایمونودیفیوژن	SRID-TR
صفحه تراز برای انجام الکتروفورز و ایمونودیفیوژن	LT-RID

### مراجع

- Henry J.B.: *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 18th ed., Saunders publication, 1991.
- Rose N.R. et al: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd ed. ASM publication, 1986.
- Stites D.P. et al: *Basic and Clinical Immunology*. ed. Appelton & Lange publication, 1992.
- Wallach J.: *Interpretation of Diagnostic Tests. A Synopsis of Laboratory Medicine*. 5rd ed. Little Brown, 1992.
- Whaley K.: *Complement in Health and Disease*. (*Immunology & Medicine Series*), MTP Press, 1987.

آنها در جدول شماره ۱ مورد اشاره قرار گرفته است. آبشار کمپلمان در سه بخش عمل می‌کند:

- ۱. فعال‌سازی آبشار:** این مرحله در مسیر اصلی با C1 و در مسیر جنبی با C3b آغاز می‌شود.
- ۲. فعالیت آنزیم-سوپسترا:** این مرحله در مسیر اصلی بترتیب با C4، C2 و C3 و در مسیر جنبی با فاکتورهای D، B و P انجام می‌گیرد.
- ۳. تشکیل مجموعه حمله به غشاً یا MAC:** این کمپلکس (Membrane Attack Complex) که فرآیند نهایی فعال شدن چرخه کمپلمان است با همکاری C5، C6، C7، C8، C9 ایجاد می‌شود. از نظر آزمایشگاهی اندازه‌گیری تمامی اجزای کمپلمان به منظور سراند برای تشخیص اختلالات ایمنی ممکن نبوده و در عین حال کاهش یا افزایش اجزای کمپلمان در ایمنی و سیستم دفاعی بدن تعیین کننده است. اما با اندازه‌گیری دو جزء پایه کمپلمان در مسیر اصلی C4 و C3 در مسیر جنبی C3 می‌توان بسیاری از اختلالات آنرا شناسایی کرد. C3 و C4 هر دو از اجزای بتا-1- گلبولین‌های سرم بوده و میزان C4 به‌مراتب کمتر از C3 است.

### جدول شماره ۱- عوامل محرک و فعال‌کننده مسیرهای دوگانه کمپلمان

مسیر اصلی	مسیر جنبی
IgM & IgG	آندوتوکسین باکتریهای گرم منفی
آنزیم‌های شبه تریپسین	لیپوپلی ساکاریدهای گیاه و باکتری
پروتئین A	سم مار کبری
ایمونوگلوبولینهای متراکم	فاکتور نفروتیک
DNA و CRP	آنزیم‌های شبه تریپسین

www.bird-bahar.com  
E-mail: bahar@bird-bahar.com

