که باعث از بین رفتن اجزای فعال کمپلمان می‌گردند.
۲. سرم‌هایی که در دمای خارج از یخچال نگاهداری شده‌اند.
۳. به‌کارگرفتن پلیت کهنه و تاریخ گذشته برای انجام آزمایش.
۴. ریختن نمونه به شکل نادرست، اعم از کم و زیاد ریختن حجم سرم و یا حوادثی که حرکت دایره‌وار واکنش را از بین ببرد:
الف) زخمی کردن ژل به هنگام ریختن نمونه در چاهک.
ب) سرریز کردن از چاهک‌ها و لبریز شدن نمونه برروی سطح ژل.
۵. یخ زدن و ذوب کردن مکرر سرم مورد آزمایش سبب از بین رفتن اجزای‌فعال کمپلمان می‌گردد.
۶. تراز نبودن پلیت در یخچال بعد از ریختن نمونه سبب ایجاد هاله‌های بیضوی می‌گردد.

اثر عوامل گوناگون بر نتایج

اگر نمونه‌های مورد آزمایش برای یک پلیت BIRD CH_{50} کفایت کرده است، مشکل خاصی ایجاد نمی‌شود، اما اگر پلیتBIRD CH_{50} چاهک‌های قابل استفاده دارد باید به نکات یاد شده در پایین توجه شود.

۱. استفاده مجدد: برای استفاده مجدد از پلیت‌های BIRD CH_{50} که برخی از چاهک‌های آن استفاده شده باشد، می‌توان حداکثر یک تا دو هفته بعد درب پلیت BIRD CH_{50} را بسته و در داخل کیسه زیپ‌دار خودش گذاشته و آن را وارونه در یخچال $2-8^{\circ}C$ نگهداری کرد. به‌محض آنکه پلیت کدورت خود را از دست بدهد و همولیز پدیدار شود، پلیت را غیرقابل استفاده تلقی کنید.

۲. حرارت: افزایش حرارت محیط تا محدوده‌ای خاص سبب افزایش سرعت واکنش می‌گردد و پس از آن نقش معکوس و تخریبی برای واکنش ایفا می‌کند. نباید پلیت BIRD CH_{50} را پس از استفاده اولیه در دمای اتاق قرار داد، زیرا اجزای سازنده مربوطه تحت تأثیر دمای محیط غیرفعال می‌شود و پلیت را غیرقابل استفاده می‌سازد.

توجه: در استفاده مجدد از پلیت در نخستین‌بار استفاده بعد از خارج نمودن پلیت از انکوباتور حتما رطوبت درب داخلی پلیت را با دستمال پاک نمایید.

۳. زمان: واکنش متاثر از زمان است، همان‌طور که پیشتر یاد شد، زمان

واکنش ثابت و از پیش تعیین شده است، واکنش‌ها نمی‌توانند همیشه ادامه یابند، بالعکس، به محض به تعادل رسیدن واکنش متوقف می‌شود.

روش محاسبه و میزان طبیعی CH_{50}

با استفاده از خط‌کش ویژه، قطر(d) دایره همولیز را برحسبmm اندازه‌گیری کرده و برای تعیین فعالیت براساسU با مراجعه به جدول پشت همین برگه آنرا محاسبه نمایید. بررسی آماری بیش از ۲۰۰۰ نمونه از افراد سالم با این روش نشان میدهد که دامنه طبیعی بین ۴/۵ تا ۸/۵ mm است که معادل ۷۰ تا ۱۵۰ واحد(U) است. افزایش میزان CH_{50} بیش از حد اعلام شده دلیل هیچ بیماری خاصی نیست. پیشنهاد می‌شود که هر آزمایشگاه دامنه طبیعی خود را مستقلا تعیین نماید. همان‌طور که قبلا یاد شد، هربار که میزان CH_{50} را اندازه‌گیری می‌کنید، حتما در مورد چند نمونه تازه را به‌طور تصادفی مخلوط کرده و به‌عنوان کنترل استفاده نمایید. سرم‌هایی که واکنش همولیتیک ندارند (دایره همولیز ایجاد نمی‌کنند)، آزمایش CH_{50} را یکبار دیگر با نمونه تازه تکرار کنید و اگر نتیجه یکسان بود، می‌توان در باره یک اختلال در فعالیت کمپلمان فکر کرد و اگر واکنش به‌دست آمده طبیعی شد، قطعا سرم اولیه کهنه و یا در شرایط نامناسب نگاهداری شده بوده است. اجزای سازنده کمپلمان از عوامل مؤثر اجزای دفاعی سرم انسان می‌باشند. اندازه‌گیری هریک از آن عوامل در بررسی بیماران مشکوک به عفونت‌های مکرر یا اختلال در سیستم ایمنی سرمی یکی از گام‌های ابتدایی تشخیص است. اندازه‌گیری CH_{50} یک روش مفید برای بررسی کمبود هموزیگوت یک جزء و یا یک عامل کمپلمان است، اما تمامی اختلالات مربوط به تک‌تک اجزا را رد نمی‌کند.

مراجع

1. Henry J.B.: *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.* 18th ed., Saunders publication, 1991.
2. Rose N.R. et al: *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd ed. ASM publication, 1986.
3. Whaley K.: *Complement in Health and Disease, (Immunology & Medicine Series),* MTP Press, 1987.

جدول محاسبه فعالیت CH50 (تبدیل قطر(mm(d واکنش به U)

قطر دایره mm(d)	واحد U	قطر دایره mm(d)	واحد U	قطر دایره mm(d)	واحد U	قطر دایره mm(d)	واحد U	قطر دایره mm(d)	واحد U
۳/۵	۵۰	۴/۵	۷۰	۵/۵	۹۰	۶/۵	۱۱۰	۷/۵	۱۳۰
۳/۶	۵۲	۴/۶	۷۲	۵/۶	۹۲	۶/۶	۱۱۲	۷/۶	۱۳۲
۳/۷	۵۴	۴/۷	۷۴	۵/۷	۹۴	۶/۷	۱۱۴	۷/۷	۱۳۴
۳/۸	۵۶	۴/۸	۷۶	۵/۸	۹۶	۶/۸	۱۱۶	۷/۸	۱۳۶
۳/۹	۵۸	۴/۹	۷۸	۵/۹	۹۸	۶/۹	۱۱۸	۷/۹	۱۳۸
۴/۰	۶۰	۵/۰	۸۰	۶/۰	۱۰۰	۷/۰	۱۲۰	۸/۰	۱۴۰
۴/۱	۶۲	۵/۱	۸۲	۶/۱	۱۰۲	۷/۱	۱۲۲	۸/۱	۱۴۲
۴/۲	۶۴	۵/۲	۸۴	۶/۲	۱۰۴	۷/۲	۱۲۴	۸/۲	۱۴۴
۴/۳	۶۶	۵/۳	۸۶	۶/۳	۱۰۶	۷/۳	۱۲۶	۸/۳	۱۴۶
۴/۴	۶۸	۵/۴	۸۸	۶/۴	۱۰۸	۷/۴	۱۲۸	۸/۴	۱۴۸

قطر دایره mm(d)	واحد U	قطر دایره mm(d)	واحد U	قطر دایره mm(d)	واحد U	قطر دایره mm(d)	واحد U
۸/۵	۱۵۰	۸/۶	۱۵۲	۸/۷	۱۵۴	۸/۸	۱۵۶
۸/۹	۱۵۸	۹/۰	۱۶۰	۹/۱	۱۶۲	۹/۲	۱۶۴
۹/۳	۱۶۶	۹/۴	۱۶۸				

بهارافشان

CH50

اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان

CH50

به‌روش SRID

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

تهران، خیابان کارگر شمالی، نرسیده به پمپ‌بنزین، ساختمان آزمایشگاه بهار
شماره ۱۶۲۷، صندوق پستی: ۷۶۸-۱۴۱۸۵
تلفن: ۸۸۹۶۶۲۴۶-۸۸۹۶۱۸۶۹، نمابر: ۸۸۹۶۰۴۴۵

پایه آزمون *SRID* CH_{50}

به‌طور کلی کمپلمان به حالت پلکانی و یا آبشاری عمل کرده و نقش عمده‌ای در دفاع بدن در مقابل عوامل بیماریزا دارد از جمله شرکت در برخی از واکنش‌های آنافیلاکسی، کمک در بیگانه‌خواری فاگوسیت‌ها و انهدام سلول‌های هدف. اجزای پروتئینی تشکیل دهنده آبشار کمپلمان از نظر ساختمان و کار متفاوت هستند و فعالیت آنها در دو مسیر کاملا جداگانه انجام می‌پذیرد که یکی مسیر کلاسیک (اصلی) و دیگری مسیر آلترناتیو (جایگزین) است. عوامل محرک و فعال‌کننده مسیرهای دوگانه از نظر مکانیزم متفاوت‌اند. آبشار کمپلمان در سه بخش عمل می‌کند:

۱. فعال‌سازی آبشار: این مرحله در مسیر اصلی با C1 و در مسیر جایگزین با C3b آغاز می‌شود.

۲. فعالیت آنزیم- سوبسترا: این مرحله در مسیر اصلی به‌ترتیب با C1 C2 و C3 و در مسیر جنبی با فاکتورهای D، B و P انجام می‌گیرد.

۳. تشکیل مجموعه حمله به غشأ یا MAC: این کمپلکس (Membrane Attack Complex) که فرآیند نهایی فعال شدن چرخه کمپلمان است با همکاری C5، C6، C7، C8 و C9 ایجاد می‌شود.

از نظر آزمایشگاهی اندازه‌گیری تمامی اجزای کمپلمان به منظور سرند برای تشخیص اختلالات ایمنی ممکن نبوده و در عین حال کاهش یا افزایش اجزای کمپلمان در ایمنی و سیستم دفاعی بدن تعیین‌کننده است. اما با اندازه‌گیری دو جزء پایه کمپلمان در مسیر اصلی C4 و در مسیر جایگزین C3 و نیز فعالیت، کمپلمان CH_{50} می‌توان بسیاری از اختلالات را شناسایی کرد.

این پایه آزمایش برای اندازه‌گیری همولیز تام کمپلمان (Total Hemolytic Complement Assay) که به‌طور سنتی آن را CH50 می‌نامند استفاده شده است. در یک بررسی جامع بیش از ۲۰۰۰ نمونه سرم را با این روش مقایسه و ارزیابی کرده‌ایم. با توجه به تحلیل آماری که برروی این نتایج انجام گرفته است، تا آنجا که فعالیت کمپلمان در محدوده CH_{50} مورد نظر باشد، نتایج حاصله قابل قبول و قابل تکرار می‌باشد.

پایداری و روش نگهداری پلیت CH_{50}

پلیت‌های CH_{50} تا تاریخ یادشده بر روی پلیت در یخچال (°C ۸-۲)

به شکلی که برچسب زرد «*This Side Up*» آن به‌سمت بالا باشد پایدار است. هنگامی که برچسب روی بسته به‌سمت بالا است، در عمل، رطوبت ژل حفظ شده و پایداری لازم را برای واکنش نشان می‌دهد. پلیت CH_{50} براساس 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 CH_{50} را به‌شکل درست برروی کفه قرار دهید و هیچ‌گونه نیازی به چسب‌کاری 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 آن‌را غیرقابل استفاده می‌کند.

مواد و ابزار مورد نیاز

۱. سمپلر ۵µL و یا سرنگ هامیلتون ۱۰µL.

۲. خط‌کش ویژه و استاندارد «*SRID Triangle*» برای اندازه‌گیری قطر دایره واکنش (کد سفارش بهارافشان *SRID Triangle*) یا ذره‌بین ویژه.

۳. صفحه شیشه‌ای تراز (کد سفارش بهارافشان *Level Table*).

نمونه مورد نیاز و شرایط نگاهداری آن

۱. ۵µL سرم تازه

۲. فاصلهٔ زمانی بین برداشت نمونه و انجام آزمایش CH_{50} اگر بیش از یک ساعت است، باید نمونه در جایخی و در سرمای °C۲۰- نگهداری شود. از یخ زدن و ذوب کردن مکرر سرم جدا خودداری کنید.

آماده‌سازی و تدارکات پیش از آزمایش

۱. پلیت CH_{50} را از یخچال بیرون آورده و تا ۵ دقیقه به دمای اتاق برسانید.

۲. پلیت CH_{50} را از داخل جعبه مقوایی و کیسه زیپ‌دار بیرون آورده و لبه کیسه مرطوب را با قیچی بریده و پلیت CH_{50} حاوی ژل را بیرون بیاورید. (کیسه زیپ‌دار را برای نگاهداری مجدد پلیت در یخچال حفظ کنید).

۳. پیش از ریختن نمونه‌های سرم (کنترل یا بیمار) سرپوش پلیت CH_{50} را برداشته و بگذارید آب و رطوبت موجود در چاهک‌ها تبخیر شود.

۴. نمونه‌های فریز شده را در یخچال ذوب نمایید و به دمای اتاق برسانید. پیش از برداشت از نمونه، آنرا به آرامی چندبار سروته کنید تا کاملا یکنواخت و همگن شود.

روش ریختن نمونه در پلیت BIRD CH_{50}

۱. قبلاً برروی یک کاغذ نام بیمار، شماره پرونده و شماره چاهک مربوط به آن نمونه را یادداشت کنید. بطور معمول چاهک شماره ۱ را برای سرم کنترل در نظر می‌گیرند. علامت زدن چاهک شماره یک از پشت پلیت انجام شود.

۲. سرم‌ها را از جایخی بیرون آورده، در داخل یخچال ذوب کرده و بلافاصله به‌کمک سمپلر یا سرنگ هامیلتون و به‌دقت ۵µL از هر نمونه را داخل چاهک از پیش تعیین شده خود بریزید.

۳. برای گذاشتن نمونه، نوک سمپلر و یا سرنگ همیلتون حاوی نمونه را در 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 ریختن 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 می‌شود.

۴. پس از ریختن نمونه‌ها، پلیت‌ها را در یخچال °C۴ قرار دهید تا سرم‌های مورد آزمایش به‌درون ژل نفوذ کرده و جذب شوند.

نگاهداری پلیت BIRD CH_{50} برای واکنش

پس از جذب نمونه‌ها به داخل ژل پلیت BIRD CH_{50} را وارونه کرده و به‌شکل وارونه در داخل یخچال، حتی‌المقدور بر روی یک صفحه تراز (کد سفارش بهارافشان *Level Table*) قرار دهید. ساعت و تاریخ نمونه‌گذاری را یادداشت کرده، پلیت BIRD CH_{50} را برای ۱۸ تا ۲۴ ساعت آینده در یخچال °C۴ حرارت نگاهداری کنید. سپس پلیت را از یخچال بیرون آورده به گرمخانه (انکوباتور) °C۳۷ منتقل کرده و دقیقا به‌مدت ۱/۵ ساعت صبر کنید.

شیوه بررسی واکنش در پلیت BIRD CH_{50}

پلیت را از گرمخانه بیرون آورده و قطر دایره واکنش مربوط به هریک از نمونه‌های کنترل و بیماران را جداگانه با خط‌کش مخصوص

SRID Triangle اندازه‌گیری کنید. مشاهده و اندازه‌گیری دایره‌های همولیز در مقابل پس‌زمینه سیاه مات و تابش نور از پهلو به‌شکل دقیق‌تری انجام می‌گیرد.

کاربرد خط کش BIRD CH_{50} *SRID Triangle*

خط‌کش دو محور اندازه‌گیری دارد، یکی خط‌کش میلی‌متری ۲۳ سانتی در لبه است و دیگری مثلث اندازه‌گیری قطر دایره در داخل صفحه تا ۱۰mm است. در داخل صفحه خط‌کش دو خط کج و یک خط موازی با افق در وسط به‌شکل میانه وجود دارد، خطوط کوتاه عمودی، با فاصله معین، دو خط کج با ساق‌های مثلث ناقص رامدرج کرده‌اند. ارقام روی خطوط کوتاه عمودی، نمایانگر مجذور این فاصله و در واقع مجذور قطر دایره‌ها(d^2) می‌باشند.

برای اندازه‌گیری قطر دایره‌ها به‌وسیله خط‌کش *SRID Triangle*، پلیت BIRD CH_{50} را از پشت روی خط‌کش گذاشته و آنقدر آن را جابجا کرده تا محیط خارجی دایره با دو خط کج کاملا 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 (d) است که می‌توان مجذور همان قطر را (d^2) در بالای خط کوتاه عمودی یافت. برای اندازه‌گیری واکنش‌های بیضی شکل باید اندازه‌گیری را در دو جهت عمود بر هم انجام داد و میانگین دو قطر کوچک و بزرگ را اندازه‌گیری کرد. در صورتی‌که دایرهٔ 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 برروی کاغذهای شفاف فتوکپی شده، خارج از استاندارد بوده و قسمت‌هایی از مثلث برروی خط‌کش محاسبه اصلی، که از آن صرفا یک برداشت تصویری و بدون محاسبه شده است، قابل انطباق نیست. به خطای ناشی از محاسبه با این خط‌کش‌ها توجه داشته باشید.

*** نکته: در صورت ایجاد ۲ هاله قطر هر دو هاله را اندازه‌گیری کرده و میانگین را مبنای جواب قرار دهید.**

عواملی که سبب دریافت نتیجه نادرست می‌شوند

۱. بقایای مایعات شستشو در شیشه‌آلات و نوک‌های سمپلر مورد استفاده