طراحی روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم برای سنجش پادتن‌های ضدسیتوپلاسم نوتروفیل

محسن سعیدی* ، مرحوم دکتر حسن برادران** ، دکتر محمدرضا هاتف**

چکیده

پادتن‌های ضد سیتوپلاسم نوتروفیل (ANCA) ، رده‌ای از پادتن‌ها یا خودپادتن (اتوآنتی‌بادی)ها هستند که معمولاً در شرایطی که تخریب نوتروفیل‌ها در بدن ایجاد می‌شود ، به وجود آمده ، منجر به آسیب عروقی می‌شوند و بروزشان در بعضی از بیماری‌های روماتیسمی مثل آرتریت روماتوئید (RA)، لوپوس (SLE) و بیماری‌های وسکولیتی مثل گرانولوماتوز وگنر (W.G) شایع‌تر است. از آنجاکه تست غربالی برای تعیین ANCA روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (IFA) می‌باشد و همچنین به علت حساسیت بالای روش ایمونوفلورسانس و سادگی و قیمت مناسبش نسبت به سایر تست‌های الیزا و رادیوایمنواسی (RIA)، تصمیم گرفتیم که روش IFA-ANCA را انتخاب کنیم. روش کار شامل جداسازی نوتروفیل‌ها از خون اشخاص سالم ، سپس تثبیت کردن با محلول اتانل ۹۶درصد ، فرمالین ۰/۵درصد ، همراه با بهینه سازی وکنترل کیفیت روش می‌باشد. به این منظور تعداد ۴۴ نفر از بین مبتلایان به بیماری‌های روماتیسمی و وسکولیتی که تست ANCA در آنها مثبت بود ، به روش نمونه گیری غیراحتمالی وآسان ، انتخاب شدند. بر این اساس با استفاده از روش IFA، دو الگوی رنگ‌پذیری به نام‌های فرم C-ANCA یا نوع سیتوپلاسمی و فرم P-ANCA یا حاشیه هسته‌ای مشاهده گردید. ضمناً این روش ، نسبت به روش Inter assay از تکرارپذیری ۹۵درصد و دقت ۹۱درصد برخوردار بوده است.

واژه‌های کلیدی : پادتن‌های ضدسیتوپلاسم نوتروفیل ، ایمونوفلورسانس غیرمستقیم

* - عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان ، نشانی : دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گرگان ، تلفن : ۶-۲۲۳۱۴۵۵-۰۱۷۱

** - عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مقدمه

پادتن (آنتی‌بادی)های ضدسیتوپلاسم نوتروفیل (ANCA)[1] رده‌ای از پادتن‌ها هستند که علیه گرانول‌های اولیه یا آزروفیلیک و اجزاء لیزوزومی سلول‌های رده میلوئید (مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها) به وجود می‌آیند. این پادتن‌ها ابتدا در سرم بیماری که چندین بار خون دریافت کرده بود و نیز بیماری که نکروز نوتروفیلی همراه با ضایعات پلی آرتریت میکروسکوپی (MPA)[2] و گرانولوماتوز وگنر (WG)[3] داشت ، یافت شدند (۱).

سبب‌شناسی و آسیب‌زایی این پادتن‌ها هنوز مشخص نیست ، اما این نوع پادتن‌ها معمولاً در شرایطی که تخریب نوتروفیل‌ها در بدن ایجاد شود ، به وجود می‌آیند و منجر به آسیب عروقی می‌شوند (۱). از آنجاکه تست غربالی برای ANCA روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IFA)[4] می‌باشد که در آن از نوتروفیل‌های تخلیص شده به عنوان بیش ماده استفاده می‌شود (۲) و همچنین چون این تست با اختصاصیت بیش از ۹۰درصد به عنوان یک تست تشخیصی در بیماران مبتلا به گرانولوماتوز وگنر استفاده می‌شود (۳و۲) ، و با توجه به این که این تست به سادگی قابل انجام است ، لازم بود که تست ANCA طراحی شود. ما از میان روش‌های مختلف نظیر الیزا ، رادیوایمنواسی ، پراکسیداز و ایمونوفلورسانس ، با توجه به قیمت مناسب ، حساسیت نسبتاً زیاد و قابلیت تعمیم بیشتر تکنیک ایمونوفلورسانس ، از روش اخیر برای جستجوی ANCA استفاده کردیم.

وسایل و روش‌ها

بر این اساس از بین بیماران شناخته شدهٔ مبتلا به لوپوس اریتماتوی سیستمیک (SLE)[5] ، روماتیسم مفاصل (R.A)[6] و گرانولوماتوز وگنر (W.G) (به ترتیب ۴۲ ، ۶۵ و ۲ نفر) در بیمارستان امام رضا (ع) مشهد ، ۴۴ نفر از افرادی که تست ANCA در آن‌ها مثبت شده بود ، انتخاب شدند. همچنین ۴۰ نفر سالم نیز به عنوان شاهد سالم که هیچ‌گونه بیماری یا عارضه‌ای نداشتند نیز انتخاب شدند و تست ANCA در آن‌ها نیز بررسی شد. بنابراین نمونه گیری از نوع غیراحتمالی و آسان بود.

پس از خون‌گیری و جداسازی سرم افراد مورد مطالعه، این سرم‌ها برای انجام آزمایش در ۲۰°c- نگهداری شدند و به سرعت تست ANCA برایشان انجام شد.

وسایل و مواد مورد نیاز

بافر نمک فسفات (PBS.PH=۷/۲)، محلول مغذی هنکس[7]، محلول Nacl ۱/۶درصد و Nacl ۰/۲درصد، پادتن ضدایمنوگلبولین انسانی توتال کونژوگه شده با FITC ، فایکول ۱۰/۷۷ ، محلول رنگی برای ایجاد رنگ زمینه در لام فلورسنت (یک‌قطره ایواس بلو + ۴ میلی‌لیتر محلول فسفات سالین«PBS») ، الکل اتیلیک۹۶درصد و فرمالین ۰/۵درصد ، لام مخصوص فلورسانس ، لامل ، پلیت شیشه‌ای درب دار بزرگ ، انواع سمپلر ، گاز و پانسمان ، سانتریفوژ ، میکروسکوپ فلورسنت ، لوله آزمایش و یخچال.

روش اجرای آزمایش

الف) جداسازی و تثبیت نوتروفیل‌ها

خون هپارین شده از داوطلبین سالم جمع‌آوری و سپس از طریق سانتریفوژ کردن در دور RPM ۱۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه ، بافی کوت تهیه شد. بافی کوت حاوی گلبول‌های سفید و مقدار خیلی کمی از گلبول‌های قرمز می‌باشد. سپس آن را با فایکول (۱۰/۷۷) سانتریفوژ نموده تا سلول‌های تک هسته‌ای (لنفوسیت‌ها) جدا شوند. پس از خارج نمودن لایه سلول تک‌هسته‌ای و فایکول زیرین آن ، باقی‌مانده لایهٔ سلولی از نوتروفیل‌ها و مقدار جزئی گلبول قرمز و لنفوسیت تشکیل می‌گردد. با استفاده از شوک اسمزی از طریق اضافه کردن ۱۵ میلی‌لیتر محلول Nacl ۰/۲درصد به مدت ۲۰ ثانیه ، گلبول‌های قرمز باقی‌مانده لیز گشته و سپس با اضافه کردن ۱۵ میلی‌لیتر محلول Nacl ۱/۶درصد به همراه ۲۰ میلی‌لیتر محلول هنکس ، اسمولاریته محیط را به حالت اول برگرداندیم. اجساد گلبول‌های

---

1 -Anti neutrolophil cytoplasmic antibody
2 - Microscoplic Polyartritis
3 - Wegner's granolomatosis
4- Indirect fluorescent assay
5- Systemic lupus erithematosis (SLE)
6 - Rheumatic Arthritis (R.A)
7- Hanks

قرمز با سانتریفوژ در دور g۱۸۰ از محیط عمل خارج شدند. در این صورت اگر باز هم مقداری گلبول قرمز در محیط باقی می‌ماند عمل لیز کردن دوباره تکرار می‌شد. محلولی که بدین ترتیب تهیه می‌شود بیش از ۹۰درصد حاوی نوتروفیل‌های سالم هستند که در ۱۰ میلی‌لیتر محلول هنکس به حالت شناور وجود دارند (۴،۵).

سپس این محلول تهیه شده را روی لام‌های شیشه‌ای مخصوص فلورسنت انتقال دادیم (۱۰λ یا ۱۰μl) و در دمای ۴°c در داخل یخچال خشک نمودیم. بعد یکسری از لام‌ها را با استفاده از ظرف حاوی اتانل ۹۶درصد به مدت ۱۵، ۱۰، ۵ و ۱ دقیقه و یک سری از لام‌ها را با استفاده از ظرف حاوی فرمالین ۰/۵درصد، به مدت ۱۰، ۵، ۴ و ۱ دقیقه در دمای ۴°c، تثبیت نمودیم. بعد از این مدت، لام‌ها را با محلول PBS شستشو داده و در یخچال خشک کرده و مورد آزمایش قرار دادیم.

ب) مراحل انجام تست ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (IFA)

۱ - سرم‌های مورد آزمایش (بیمار و شاهد) را با عیار (تیتر) یک‌دوم الی یک‌صدوبیست‌وهشتم با بافر فسفات سالین (PBS.PH=۷/۴) تهیه نمودیم (۴).

۲ - ۱۰میکرولیتر از سرم‌های رقیق شده را روی حفره به لام‌های مورد آزمایش اضافه کردیم.

۳ - نمونه‌ها را در یک پلیت درب دار بزرگ، روی یک عدد گاز پانسمان مرطوب قرار داده، درب آن را بستیم.

۴ - نمونه‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار دادیم.

۵ - پس از این مدت، لام‌ها را دوبار با PBS شستشو داده (۱۰دقیقه)، سپس خشک نمودیم.

۶ - آنگاه ۱۰ میکرولیتر محلول پادتن کونژوگه Total با FITCرا با عیار یک‌بیستم الی یک‌صدم اضافه نموده، لام‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار دادیم.

۷ - پس از طی زمان انکوباسیون، لام‌ها را مجدداً طبق بند شماره ۵ با PBS شستشو داده و خشک نمودیم.

۸ - روی نمونه‌ها، یک قطره محلول مونته گلیسیرین گذاشته و آن را به کمک میکروسکوپ فلورسنت، مورد بررسی قرار دادیم.

در ضمن بر اساس تیترهای ذکر شده، حساسیت و اختصاصیت (ویژگی) هر گروه از بیماران را بر مبنای تعداد آن‌ها (یعنی ۶۵ بیمار مبتلا به R.A و ۴۲ بیمار مبتلا به SLE) به دست آوردیم (جداول ۱و۲).

جدول ۱: مقایسه حساسیت و ویژگی تست ANCA برای عیارهای مختلف در بیماران مبتلا به روماتیسم مفاصل

عیارسرم	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$
حساسیت(درصد)	۳۵/۳	۳۴/۳	۳۳/۳	۳۲/۲	۳۰	۱۰
ویژگی(درصد)	۷۳/۶	۶۷/۷	۷۲/۴	۸۷/۵	۸۵/۷	۸۲/۳

جدول ۲: مقایسه حساسیت و ویژگی تست ANCA برای تیترهای مختلف در بیماران مبتلا به SLE

عیارسرم	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$
حساسیت(درصد)	۴۵/۲	۴۵/۲	۴۳/۹	۴۲/۵	۳۰/۳	۱۷/۸	۸
ویژگی(درصد)	۳۸/۹	۴۱	۵۱	۶۳	۷۹/۳	۸۲/۱	۸۵/۱

مقادیر فوق براساس فرمول‌های زیر به دست آمده است

$$\text{Specility } \frac{TN}{TN+FP}\times 100 \qquad \text{Senditivity } \frac{TP}{TP+FN}\times 100$$

FP=مثبت کاذب، TP=مثبت حقیقی، FN=منفی کاذب، TN=منفی حقیقی

یافته‌ها

نتایج مربوطه به بهینه سازی آزمایش پادتن‌های ضد سیتوپلاسم نوتروفیل (ACNA)

عوامل متعددی از قبیل نوع تثبیت کننده ، زمان تثبیت ، طریقهٔ شستشوی لام‌ها و عیار پادتن کونژوگه و غیره در آزمایش سنجش ANCA مؤثر می‌باشند. این عوامل می‌توانند نتیجه تست را بین دوحد منفی کاذب تا مثبت کاذب تغییر دهند. در این قسمت مهم‌ترین عوامل و شاخص‌هایی راکه برحسب اطلاعات موجود در مقالات و بررسی‌های تجربی خود ، در بهینه سازی آزمایش ANCA دخالت دارند ، ذکر می‌کنیم.

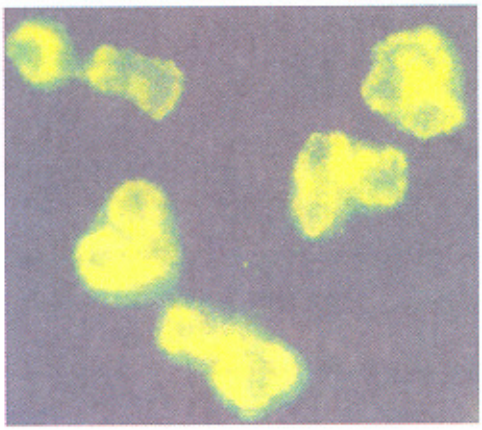
۱ - نوع تثبیت کننده : در این جا از دو نوع تثبیت کننده به نام‌های اتانل ۹۶درصد و فرمالین ۰/۵درصد برای تثبیت کردن نوتروفیل‌ها روی لام‌ها استفاده کردیم.

با روش IFA ، دو الگوی متفاوت رنگ پذیری در تست ANCA مشاهده گردید. یکی شکل P-ANCA یا حاشیه هسته‌ای ، و دیگری شکل C-ANCA یا سیتوپلاسمیک.

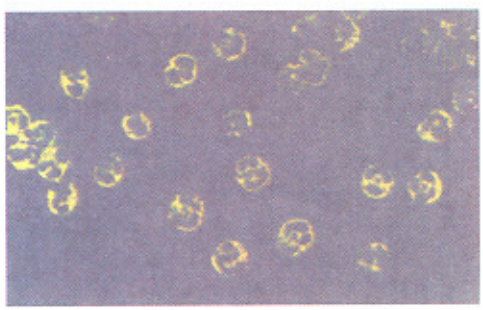
الگوی حاشیه هسته‌ای ، در نتیجه توزیع مجدد یا اتصال آنتی‌ژن‌های سیتوپلاسمی نوتروفیل‌ها (میلوپراکسیداز پروتئیناز-۳) به ناحیه حاشیه هسته یا لبه خارجی غشاء هسته می‌باشدکه در طول تثبیت نوتروفیل‌ها با اتانل رخ می‌دهد (تصویر ۱) و الگوی سیتوپلاسمیک در نتیجه بی‌حرکتی پروتئین‌های کاتیونی یا آنتی‌ژن‌های سیتوپلاسمی نوتروفیل‌ها در هنگام تثبیت نوتروفیل‌ها با بخار فرمالدئید یا فرمالین مایع رخ می‌دهدکه اغلب رنگ‌آمیزی در مرکز سیتوپلاسم تشدید شده و هسته را متمایز ساخته و این الگو را باعث می‌شوند (تصویر ۲).

۲ - زمان تثبیت : زمان تثبیت یکی از مهم‌ترین مراحل کار در تثبیت نوتروفیل‌ها روی لام‌ها می‌باشد. بر این اساس بهترین زمان لازم برای تثبیت نوتروفیل‌ها با اتانل ۵ دقیقه و برای فرمالین حدود ۴ دقیقه تعیین گردید.

۳ - انتخاب میزان رقت‌های سرم : با توجه به نتایج به دست آمده ، عیار اولیه برای سنجش ANCA ، عیار یک دوم تعیین شد ، هر چندکه می‌توان آن را برای بیماران مختلف برای تعیین



تصویر ۱ (منبع ۶)



تصویر ۲ (منبع ۷)

عیاربندی ، از یک دوم الی یک صدوبیست‌وهشتم یا حتی بالاتر هم انجام داد (جداول ۱ و ۲).

۴ - زمان انکوباسیون سرم : در آزمایش IFA بهترین زمان انکوباسیون سرم حدود ۳۰ دقیقه می‌باشد.

۵ - شرایط انکوباسیون سرم : بهترین شرایط انکوباسیون سرم ، در حرارت آزمایشگاه ۲۵°c و محیط مرطوب انجام شده ، تا ضمن ایجاد شرایط لازم برای واکنش پادگن - پادتن ، سرم روی لام خشک نشود.

۶ - شستشوی سرم پس از طی زمان انکوباسیون : مناسب‌ترین روشی که طی آزمایش‌های مکرر مورد قبول قرار گرفت این بود که ابتدا ، سرم بیمار روی لام را با جریان ملایمی از محلول PBS به کمک پیپت شستشو دادیم ، سپس لام را در یک ظرف محتوی PBS به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم. در مرحله بعد ، ظرف حاوی لام را به ظرف دیگری که حاوی محلول PBS بوده و قبلاً استفاده نشده بود ، منتقل کردیم و ۵ دقیقه در ظرف دوم نگه داشتیم. سپس

لام را از ظرف حاوی PBS خارج کرده و در دمای آزمایشگاه خشک نمودیم.

۷ - میزان عیار آنتی هیومن گلوبولین : بر اساس نتایج و آزمایش انجام شده ، عیار یک بیستم از آنتی هیومن گلوبولین شرکت مورد استفاده جواب‌های بهتری را به دست آورد (جدول ۳).

جدول ۳: نتایج مربوط به استاندارد کردن (آنتی هیومن گلوبولین) ANA با FITC در رابطه با لام‌های ANA شرکت VIRGO

عیار سرم / عیار AHG	$\frac{۱}{۲۰}$	$\frac{۱}{۴۰}$	$\frac{۱}{۸۰}$	$\frac{۱}{۱۰۰}$
$\frac{۱}{۲۰}$	+	+	+	+
$\frac{۱}{۴۰}$	+	+	+	-
$\frac{۱}{۱۰۰}$	+	+	-	-

FITC = Flaorescin Isothiocyanate
ANA = Anti-Nuclear Antibody
AHG = Anti-Human Globulin

۸ - زمان انکوباسیون لام‌ها با آنتی هیومن گلوبولین : در آزمایش IFA ، بهترین زمان انکوباسیون با آنتی‌هیومن گلوبولین شده با FITC[1] ، حدود نیم ساعت می‌باشد که بایستی در تاریکی انجام شود ، زیرا مواد فلورسنت به نور حساس می‌باشند.

۹ - نحوه بررسی میکروسکوپی لام‌ها : پس از آماده شدن لام ، با ، استفاده از محلول مونته گلیسیرین ۱۰درصد در PBS یک قطره روی لام‌ها ریخته و بعد لامل‌گذاری شد و بلافاصله مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت ، زیرا گذشت زمان ، موجب کاهش شدت نور فلورسنت لام‌ها می‌شود.

۱۰ - مدت زمان نگهداری و پایداری لام‌ها : لام‌های تهیه شده را می‌توان به خوبی برای مدت زمان ۶-۴ ماه در داخل یخچال و یا برای مدت بیشتر در داخل فریزر (۲۰°c-) نگهداری کرد.

روش تعیین دقت در تست پادتن‌های ضدسیتوپلاسم نوتروفیلی (ANCA)

برای این کار به روش Inter assay عمل کردیم و برای هر کدام از سرم‌هایی که تست ANCA در آن‌ها مثبت می‌شد ، ۲۱ بار آزمایش را در فواصل زمانی مختلف ، ولی به طور هم‌زمان انجام دادیم و در نهایت به دقت ۹۱درصد رسیدیم.

برای گروه شاهد سالم (۴۰ نفر) نیز آزمایش ANCA انجام شد و در عیارهای انجام گرفته (یک‌دوم الی یک‌صدوبیست‌وهشتم) از افراد سالم تست ANCA مثبت نشد.

عیار انتخابی برای AHG در آزمایش ANCA ، با توجه به نتایج به دست آمده ، یک بیستم پیشنهاد می‌گردد.

بحث

همان طور که گفته شد تست غربالی برای تعیین ANCA ، روش ایمنوفلورسانس غیرمستقیم (IFA) می‌باشد که از نوتروفیل‌های تخلیص شده به عنوان پیش ماده استفاده می‌شود.

استفاده از روش IFA برای سنجش ANCA نسبت به تست‌های دیگر به دلایل زیر است :

اول این که روش IFA بیشتر از روش‌های CELISA و RIA و ایمنوپراکسیداز قابل تعمیم می‌باشد و در آزمایشگاه‌هایی که میکروسکوپ فلورسنت داشته باشند ، قابل اجراء می‌باشد. دوم این که مواد لازم در داخل کشور به راحتی و فراوانی قابل تهیه است. سوم این که ساختمان یا خصوصیات ریخت‌شناسی نوتروفیل‌ها به آسانی در زیر میکروسکوپ قابل مشاهده است و با استفاده از آنتی هیومن گلوبولین شده با FITC ، می‌توانیم پادتن علیه سیتوپلاسم نوتروفیل‌ها را در بیماران مختلف تشخیص دهیم. چهارم این که حساسیت روش IFA نیز مانند CELISA و RIA بیش از ۹۰درصد می‌باشد. همچنین علت استفاده از بیماران مبتلا به R.A ، SLE و W.G در این طرح ، این بوده است که پادتن ضدسیتوپلاسم نوتروفیل‌ها در این بیماران نسبت به دیگر بیماران مبتلا به بیماری‌های روماتیسمی و وسکولیتی شایع‌تر بوده و قابل ردیابی می‌باشند ، به طوری که بنابر مطالعات گوناگون ، گزارش‌های متنوعی از بروز ANCA در این بیماران وجود دارد. به عنوان مثال ، براساس مطالعات آماری که روی ۱۱۴ بیمار مبتلا به SLE و ۴۷ بیمار مبتلا به R.A صورت گرفته است ، به ترتیب ۴۲/۴درصد و ۴۰درصد بیماران ، دارای ANCA مثبت بودند ، ضمن این که این پادتن‌ها در بیش از ۹۵-۹۰درصد بیماران مبتلا به W.G نیز مثبت می‌باشد (۹و۸).

1 - Fluorescin Isothiocyanate (FITC)

در این قسمت مهم‌ترین مسائلی راکه در مورد طراحی ANCA به روش IFA ، باید مورد توجه قرار گیرد توضیح خواهیم داد.

یکی از مهم‌ترین مسائل ، مربوط به نوع تثبیت کننده استفاده شده برای نوتروفیل‌ها روی لام‌ها می‌باشد (۷و۵و۴). همان طور که در بخش نتایج ذکر شد ، در روش IFA برای بررسی ANCA ، با استفاده از اتانل و فرمالین ، دو الگوی رنگ پذیری ، یکی شکل حاشیه هسته‌ای و دیگری شکل سیتوپلاسمیک مشاهده می‌شود.

وقتی که ، فقط از اتانل به عنوان تثبیت کننده استفاده کنیم ، با توجه به زیر اختصاصیت‌های پادتن‌ها ، هر دو شکل حاشیه هسته‌ای و سیتوپلاسمیک را مشاهده می‌کنیم.

ولی وقتی که از فرمالین به عنوان تثبیت کننده نوتروفیل‌ها استفاده می‌کنیم در مشاهدات فقط شکل سیتوپلاسمیک را می‌بینیم و شکل حاشیه هسته‌ای را دیگر مشاهده نمی‌کنیم ، چون اتانل باعث حرکت گرانول‌های آزروفیلیک داخل سیتوپلاسمی می‌شود و آنتی‌ژن‌ها یا همان گرانول‌ها به حاشیه هسته کشیده می‌شوند و رنگ یکنواختی را در هسته و سیتوپلاسم ایجاد می‌کنند و بنابراین باعث ایجاد همان شکل حاشیه هسته‌ای می‌شوند ، ولی تثبیت کننده دیگر ، یعنی فرمالین (یا استن در صورت استفاده) ، قادر به حرکت دادن این گرانول‌ها نمی‌باشد و بنابراین گرانول‌های اولیه یا آزروفیلیک را داخل سیتوپلاسم بی حرکت و ثابت نگه می‌دارد و شکل سیتوپلاسمیک راکه باعث تشدید رنگ در داخل سیتوپلاسم و تمایز از هسته سلول می‌شود ، ایجاد می‌کند.

یکی دیگر از مسائل مورد بحث ، زمان تثبیت نوتروفیل‌های روی لام می‌باشد (۱۰و۵و۴). تثبیت طولانی مدت نوتروفیل‌ها ، بیشتر یاکمتر از مقادیر ذکر شده (زمان ۱۰-۵ دقیقه برای استفاده از اتانل ۹۶درصد و حدود ۴-۳ دقیقه برای استفاده از فرمالین) ، دو الگوی رنگ‌پذیری حاشیه هسته و سیتوپلاسمی را ازبین می‌برد و از طرفی نیز تثبیت ناقص باعث می‌شود که تبدیل شکل حاشیه هسته‌ای به شکل سیتوپلاسمی را نشان ندهد. این مسأله در مورد نوتروفیل‌هایی که ما تثبیت کرده بودیم ، صادق بود. چون فرمالین و اتانل دو تثبیت کننده نسبتاً قوی می‌باشند ، بنابراین تثبیت کردن طولانی مدت (بیش از زمان ۴ دقیقه با فرمالین و ۱۰ دقیقه با اتانل) باعث می‌شد که ساختمان سلولی نوتروفیل‌ها بهم ریخته و از بین برود و به همین خاطر دیگر شکل حاشیه هسته‌ای یا شکل سیتوپلاسمی مشاهده نمی‌شد. همچنین تثبیت کوتاه مدت (کمتر از زمان ۳ دقیقه با فرمالین و ۵ دقیقه با اتانل) ، باعث می‌شد که نوتروفیل‌ها به خوبی روی لام‌ها تثبیت نشده و در مراحل بعدی شستشوها ، از روی لام جدا شوند. به همین خاطر دیگر هیچ شکلی را مشاهده نمی‌کردیم.

مسأله مهم بعدی ، استفاده از آنتی هیومن گلبولین (AHG) استاندارد شده می‌باشد که در جدول ۳ اشاره شد. چون از آنتی‌هیومن‌های داخلی (شرکت بهار) استفاده کرده بودیم ، بایستی قبلاً آن‌ها را استاندارد می‌کردیم تا جواب‌های مثبت یا منفی کاذب ایجاد نشود. برای این منظور ما از سرم کنترل مثبت و منفی و همچنین لام‌های مربوط به کیت‌های ANA شرکت خارجی VIRGO ، استفاده ، و عیار آنتی‌هیومن مناسب را انتخاب کردیم. بهترین عیار یا رقت به دست آمده برای آنتی‌هیومن مورد استفاده ، عیار یک بیستم ، تعیین گردید.

مطلب بعدی در مورد افراد شاهد سالم بودند که تست ANCA در آن‌ها انجام شد و تست ANCA در همگی آن‌ها منفی شد.

مطلب قابل بحث دیگر ، تکرارپذیری آزمایش و تعیین دقت مناسب برای تست ANCA می‌باشد. ما برای تأیید روش طراحی شده ، طبق روش Inter assay عمل نمودیم که بر این اساس ، آزمایش را روی سرم‌های در دسترس ، به تعداد ۲۱ بار دیگر در زمان‌های مختلف و به طور همزمان ، تکرار کردیم و در نهایت به دقت ۹۱درصد دست یافتیم که این خود نشان‌دهندهٔ دقت نسبتاً زیاد روش طراحی شده می‌باشد.

مطلب مورد اشاره بعد ، در مورد جداول ۱ و ۲ می‌باشد. ما این آزمایش را روی سرم بیماران مبتلا به RA و SLE با استفاده از لام‌های طراحی شده به‌کار بردیم و حساسیت و اختصاصیت این تست را در عیارهای مختلف سرم این بیماران ، به دست آوردیم که با نتایج به دست آمده از دیگر محققین در این زمینه همخوانی

دارد (۹و۸).

تشکر و قدردانی

از کلیه اعضاء محترم هیأت علمی و پرسنل زحمتکش آزمایشگاه تخصصی ایمونولوژی مستقر در بیمارستان امام‌رضا(ع) و بیمارستان قائم (عج) مشهد ، که در اجرای مراحل مختلف کار ، همکاری بی‌دریغ داشته‌اند ، سپاسگزاریم.

منابع

1- Savige YA. Davies DY. Anti-Neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA). Aust NZY Med. 1990 ; 20:271-274.

2- Segelmark M. Baslund B. Some patients with anti-Myoloperoxidase antibodies have a C-ANCA pattern. Clin EXP Immunol. 1994 ; 96:458-465.

3- Gerdbran M. Csernok E. Schmitt WH. Incidency target Antigen and clinical Implication of Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies in Rheumatoic Arthritis. The Journal of Rheumatology. 1996; 23 (5) : 826-830

4- Lewis G. Roger L. The effect of various cell separation procedures on assay of Neutrophil Function. AM Y Clin Pathol. 1990 ; 93: 622-669.

5- Inamura K. Fuldase S. Ohta N. Detection of Anti-Neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) using the Immunoperoxidase method. Acta Otolaryngolgica. supplement. 1994 feb ; 3: 218-220.

6- Bosch X. Lena Y. Collado A. Occurrence of Anti-Neutrophil cytoplasmic and Anti-neutrophil (Peri) Nuclear Antibodies in Rheumatoid Arthritis. The Journal of Rheumatology. 1995 ; 22 (11): 2038-45

7 - Lee SS. Lawton YWM. Chak W. Distinction between anti-nuclear antibody (ANA) and P-ANCA. Journal of Clinical Pathology. 1991 feb; 44(2): 962-963.

8- Csernok E. Gron WL. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) inflamatory rheumatic disease. Zeitschrift fur Rheumatologie. 1995 feb; 54(13): 26-38.

9- Debandt M. Meyer O. Halm T. Anti-neutrophil cytoplasmic Antibodies in Rheumatoid Arthritis Patients. British Journal of Rheumatology. 1996; 35: 38-43.

10- Schnabel A. Csernok E. David A. Anti-neutrophil cytoplasmic Antibodies in systemic lopus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism. 1995 May; 38(5):633-637.