

اصول ایمنی‌شناسی پایه و تکنیک‌های رایج تشخیص سرولوژیکی - مولکولی در بیماری‌های عفونی دامپزشکی

نویسندگان

زهرا صلاحی

کارشناس ارشد ویروس‌شناسی و تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی
دانش آموخته دانشگاه تربیت مدرس
مدرس آزمایشگاه ایمونولوژی دانشگاه خوارزمی کرج

رویا حسینی

استادیار و عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات
واکسن و سرم‌سازی رازی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

این دست‌نوشته تقدیم به نخستین آموزگاران و بزرگان زندگیم مادر و پدرم، که نام و یادشان همیشگی و زنده است و تقدیم به همسر مهربانم که همواره با صبر و شکیبایی مشوق و ادامه‌دهنده مسیر زندگیم بوده است.

شابک: ۳-۸-۹۲۵۷۶-۶۰۰-۹۷۸

شماره کتابشناسی ملی: ۳۵۰۹۰۸۸

عنوان و نام پدید آور: اصول ایمنی شناسی و تکنیک های رایج سرولوژیکی - مولکولی در بیماری های

عقونی دامپزشکی / نویسندگان: زهرا صلاحی، رویا صدری

مشخصات نشر: تهران، آوای فهیم، ۱۳۹۳

مشخصات ظاهری: ۱۴۴ صفحه، مصور، جدول، نمودار

یادداشت: کتابنامه

موضوع: دامپزشکی - دست نامه های آزمایشگاهی

موضوع: بیماری های واگیر در حیوانات

موضوع: دامپزشکی - تشخیص

موضوع: ایمنی، شناسی بالینی - دست نامه های آزمایشگاهی

موضوع: ایمنی، شناسی مولکولی

موضوع: سرشناسی

رده بندی یوبی: ۶۳۶/۰۸۹

رده بندی کتره: ۱۳۹۳/۶الف/۸ ص/ ۷۴۵ SF

سرشناسه: صلاحی، زهرا، ۱۳۹۳

شناسه افزوده: صدری، رویا، ۱۳۹۳



شابک: ۳-۸-۹۲۵۷۶-۶۰۰-۹۷۸

تهران: خیابان توحید، خیابان فرصت شیرازی، تقاطع دکتر قریب، پلاک ۸۳، واحد ۱۰۸

تلفن: ۶۵۹۴۸۸۴-۰۹۱۲۲۱۸۱۰۰۴

اصول ایمنی شناسی پایه و تکنیک های رایج تشخیص سرولوژیکی - مولکولی در بیماری های عقونی دامپزشکی

گردآوری و تدوین: زهرا صلاحی، رویا صدری

© حق چاپ: ۱۳۹۳، انتشارات آوای فهیم

نوبت چاپ: اول

مدیر تولید: محمد برخورداری

صفحه آرا: علیرضا مالکی

ناظر فنی چاپ: جواد فینی

شمارگان: ۱۱۰۰

بها: ۱۰۰۰۰ ریال

همه حقوق محفوظ است. هرگونه نسخه برداری، اعم از زیراکس و بازنویسی، ذخیره کامپیوتری، اقتباس کلی و جزئی (به جزء اقتباس جزئی در نقد و بررسی، و اقتباس در گیومه در مستند نویسی و مانند آنها) بدون مجوز کتبی از ناشر ممنوع و از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری است.

فهرست مطالب

- مقدمه
- آزمایشات سرولوژیکی مولکولی آزمایشگاهی رایج در تشخیص بیماری های عفونی دامپزشکی
- آزمایشات سرولوژیکی بانایی کاربرد آنها در تشخیص بیماری های طیور
- تصاویری از آزمایشات مختلف کاربردی سرولوژیکی مولکولی جهت شناسایی عوامل مولد بیماری در دامپزشکی
- منابع

پیشگفتار

در سال‌های اخیر مطالعات ارزشمندی در زمینه بهداشت و سلامت موجودات زنده منتشر می‌شود، لازم بذکر است که علیرغم بروز تغییرات در محیط اطراف زندگی و داشتن رژیم‌های متعدد غذایی امر سلامت و بهداشت موجودات زنده وابسته به عواملی شده است که بابت ثابت محیط داخلی بدن می‌شود و امروزه مقالات متعددی در راستای مکانیسم عمل سیستم ایمنی بدن موجود زنده و درک و شناخت بیشتر عوامل تنظیم کننده آن منتشر می‌شود و نتایج این مطالعات اینست که جایگاه علم ایمنولوژی را مشخص نموده است و نقش سازنده‌ای را در بیان تفسیر و تشخیص بسیاری از بیماری‌های عفونی داشته است. تئوریهایی که نحوه بروز تعداد بیشماری از بیماری‌هایی که در پرده زمان قرار داشتند امروزه آشکار و مبرهن شده است. امروزه با کمک علم ایمنولوژی بسیاری از عوامل مجهول و مشکل آفرین در سلامت موجود زنده میسر و ممکن شده است و با بهره گرفتن از منابع ارزشمند ایمنولوژی و آشنایی با اصول و روش‌های نوین و رایج مولکولی و تفسیر نتایج آزمایش‌های سرولوژی این امر محقق گشته و در دسترس همگان قرار گرفته است. این مجموعه می‌تواند کمک شایان توجهی در زمینه مکانیسم و چگونگی دفاع سیستم ایمنی بدن در برابر ارگانیسم‌های پاتوژن را بر عهد داشته باشد. بطور کلی می‌توان علم ایمنولوژی را به جهت داشتن حساسیت و دقت زیادی که در بررسی‌های علمی از خود نشان داده یکی از اصلی‌ترین روش‌های تشخیص در بیماری‌های عفونی و درمان و پیشگیری از گسترش بیماری‌های نوپدید و باز پدید دانست.

مقدمه :

سرولوژی (Serology) از دو واژه سرم (serum) و لوژی (Logy) به معنای شناختن و شناسایی تشکیل یافته است. به بیان دیگر، سرولوژی به کلیه آزمایشات و مطالعاتی که بر روی سرم انسان و یا حیوانات خنک دیگر انجام می گیرد، اطلاق می شود. امروزه آزمایش های سرولوژی بالینی، یکی از روش های سریع و آسان در تشخیص بیماری ها می باشد. اساس همه آزمایش های سرولوژی، واکنش آنتی بادی اختصاصی (Specific antibody) به آنتی ژن مربوطه می باشد. آنتی ژن مورد نظر می تواند باکتری، ویروس، گلبول قرمز، پروتئین و یا هورمون باشد. اتصال آنتی بادی به آنتی ژن یک واکنش اختصاصی، دو طرفه و برگشت پذیر می باشد، زیرا در اتصال آنتی بادی به آنتی ژن، پیوند های ضعیف (پیوندهای هیدروفوب، هیدروژنی، یونی و واندروالس) مشارکت دارند.



عوامل موثر بر واکنش آنتی بادی و آنتی ژن

۱) قدرت اتصال آنتی بادی به آنتی ژن (Affinity)

هر چه قدرت اتصال و یا میل پیوندی آنتی بادی به آنتی ژن بیشتر باشد، کمپلکس آنتی بادی و آنتی ژن سخت تر از یکدیگر جدا می شوند.

۲) pH محیط

مناسبت‌ترین pH برای واکنش آنتی بادی و آنتی ژن (واکنش‌های سرولوژی) ۷.۲ یا عبارتی pH فیزیولوژیک بدن انسان می باشد. در pH های بالاتر (بازی) و یا پایین تر (اسیدی)، اتصال آنتی بادی به آنتی ژن ضعیف می باشد. در میان کلاس‌های مختلف آنتی بادی‌ها IgE, IgD, IgA, IgG, IgM، آنتی بادی IgD نسبت به pH اسیدی بسیار حساس بوده و در محیط اسیدی، شکل طبیعی خود را از دست می دهد (خشتی می شود).

۳) قدرت یونی محیط (Ionic Strength)

واکنش آنتی بادی و آنتی ژن در محیط فاقد یون (مانند آب مقطر) صورت نمی گیرد. از طرفی قدرت یونی زیاد هم باعث رسوب آنتی بادی و آنتی ژن پروتئینی می شود. در این میان معمولاً استفاده از سرم فیزیولوژی ۰/۱۵ مولار یا ۸/۵ گرم نمک طعام (NaCl) در یک لیتر آب مقطر برای رقیق کردن سرم مورد آزمایش و واکنش‌های سرولوژی، بسیار مناسب است.

۴) تاثیر مواد احیا کننده (Reducing Agents)

در میان کلاس‌های مختلف ایمونوگلوبولین‌ها، آنتی بادی‌های IgE, IgD, IgM نسبت به مواد احیاء کننده ای نظیر ۲ME (۲- مرکاپتواتانول، 2-Mercaptoethanol) و DTT (دی تیوتریتول، Dithiothreitol) حساسیت بیشتری نسبت به IgG و IgA دارند. به عنوان مثال اگر در آزمایشی، تعیین کلاس آنتی بادی مورد نظر باشد، مانند آزمایش 2ME - wright برای تشخیص بیماری تب مالت مرمن، با اضافه کردن مقدار معینی از یک ماده احیا کننده بر روی سرم بیمار، IgM تجزیه شده ولی IgG سالم مانده و اندازه گیری می شود (برای مطالعه بیشتر به آزمایش‌های سرولوژی تشخیص تب مالت (بروسلوز) مراجعه نمایید).

نکته : در غلظت زیاد مواد احیا کننده تمام کلاس‌های مختلف آنتی بادی‌ها، تجزیه می‌شوند.

۵) دما :

مناسب‌ترین دما برای واکنش آنتی‌بادی و آنتی ژن، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (دمای فیزیولوژیک بدن انسان) می‌باشد. در دماهای بالاتر از ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت نیم ساعت آنتی‌بادی‌های IgD و IgE و همچنین کمپلمان سرم، خواص بیولوژیکی خود را از دست می‌دهند. در درجه حرارت‌های بالاتر از ۷۰ درجه سانتیگراد نیز تمام کلاس‌های آنتی‌بادی، خنثی (دناتوره) شده و نمی‌توانند به آنتی ژن متصل شوند.

۶. زمان نهفته (Incubation time)

اتصال و لکول‌های آنتی‌بادی به آنتی ژن، معمولاً با سرعت و در عرض چند ثانیه صورت می‌گیرد، ولی برای تحلیل کمپلکس و رویت واکنش مدت زمانی وقت لازم است که البته این مدت زمان برای هر آزمایش با توجه به نوع آنتی ژن و کلاس آنتی‌بادی متفاوت است. بطور کلی آنتی‌بادی از کلاس IgM ساختمان پنتامری دارد یعنی از پنج منومر تشکیل شده است و در نظر منوی دارای ۱۰ ناحیه اتصال به آنتی ژن می‌باشد، در مقابل کلاس‌های دیگر آنتی‌بادی‌ها، اکثراً ساختار منومری دارند و تنها دارای دو ناحیه اتصال به آنتی ژن می‌باشند و چنانچه لکول‌های آنتی ژن، درشت باشند، زمان لازم برای رویت کمپلکس آنتی‌بادی - آنتی ژن کوتاه‌تر از کلاس IgG است. مانند تعیین گروه خونی ABO در مقایسه با گروه خونی A.

۷) نسبت غلظت آنتی‌بادی و آنتی ژن

اولین بار هایدلبرگر (Heidelberger) و همکارانش نشان دادند که غلظت آنتی‌بادی اختصاصی و آنتی ژن مربوطه باید با یکدیگر متناسب باشد تا تمام آنتی‌بادی موجود در لوله آزمایش به آنتی ژن مجاور متصل شود و حداکثر واکنش سرواژی انجام پذیرد.

در لوله‌های وسط، منطقه ای است که تقریباً تمام آنتی بادی موجود در لوله آزمایش به آنتی ژن متصل شده و رسوب کرده است. به این ناحیه، منطقه تعادل (Equivalence zone) می‌گویند. در لوله‌های سمت راست منحنی سیر نزولی را طی می‌کند و در نتیجه مقدار آنتی بادی که به آنتی ژن متصل شده و رسوب نموده است، کاهش می‌یابد. این ناحیه را منطقه فزونی آنتی ژن (Antigen excess Zone) یا پست زون (Postzone) می‌نامند. کاربرد عملی نمودار ۱ در تمام آزمایش‌های سرولوژی می‌باشد. بر اساس این نمودار، چنانچه درعبارت سنجی سرم بیماری، در لوله‌های اول، جواب آزمایش منفی ولی در لوله‌های وسط مثبت شود و یا بطور غیر یکنواخت لوله‌های آزمایش مثبت و منفی شود، علت آن همین نامتناسب بودن غلظت‌های آنتی بادی و آنتی ژن نسبت به یکدیگر می‌باشد. به این وضعیت در اصطلاح، پدیده منطقه ای (Zone Phenomenon) می‌گویند. از جمله آزمایش‌هایی که پدیده منطقه ای ممکن است در آنها اتفاق بیفتد، می‌توان به آزمایش رایت (برای تشخیص بیماری تب مالت) و CRP اشاره کرد.

انواع واکنش‌های سرولوژی

بوسیله آزمایش‌های سرولوژی، می‌توان یک آنتی ژن یا یک آنتی بادی مجهول را شناسایی و مقدار آن را اندازه‌گیری کرد. وقتی که یک آنتی ژن با آنتی بادی اختصاصی ضد آن، با یکدیگر مخلوط شوند، بر اساس شکل و یا ساختمان مولکول‌های آنتی ژن، کمپلکس‌های آنتی بادی و آنتی ژن به شکل‌های مختلفی تشکیل شده و رسوب می‌کنند. بنابر این بر اساس ماهیت و شکل مولکول‌های آنتی ژن واکنش‌های سرولوژی را به هفت دسته تقسیم می‌کنند:

۱. آگلوتیناسیون (Agglutination)
۲. پرسیپیتاسیون (precipitation)
۳. خنثی‌سازی (Neutralization)
۴. فیکساسیون کمپلمان (Complement fixation)
۵. فلوکولاسیون (Flucclolation)

۶. هماگلوتیناسیون (Hemagglutination)

۱) واکنش‌های آگلوتیناسیون (Agglutination Reactions) :

اگر آنتی‌ژن یک ذره نا محلول مانند باکتری، باشد واکنش را آگلوتیناسیون گویند. اگر آنتی‌ژن نا محلول، گلبول قرمز باشد، اصطلاحاً به آن، واکنش هماگلوتیناسیون (Hemagglutination) گویند. در واکنش‌های آگلوتیناسیون، به آنتی‌بادی، آگلوتینین (Agglutinin)، به آنتی‌ژن، آگلوتینوژن (Agglutigen) و به واکنش صورت گرفته آگلوتیناسیون (Agglutination) گویند. از طرفی خود واکنش‌های آگلوتیناسیون را بر اساس ماهیت شاخص‌های آنتی‌ژنی در مولکول‌های آنتی‌ژن می‌توان به سه دسته تقسیم کرد.

الف) واکنش‌های آگلوتیناسیون فعال (active) یا مستقیم (Direct)

در این دسته از واکنش‌های آگلوتیناسیون، شاخص‌های آنتی‌ژنی (Antigenic Determinants) یا اپی‌توپ، جزء ساختمانی خود آنتی‌ژن نا محلول می‌باشد، مانند آزمایش رایت (Wright) و ویدال (Widal)، که در این آزمایش‌ها از میکروب کشته شده بروسلا (Brucella) و سالمونلا (Salmonella) به ترتیب برای تشخیص بیماری تب مالت و حصبه استفاده می‌شود.

ب) واکنش‌های آگلوتیناسیون غیر فعال (Passive)

اگر آنتی‌ژن محلول را بخواهیم به روش آگلوتیناسیون شناختناییم، باید به روش آگلوتیناسیون مجهول (Passive) عمل نماییم. بدین منظور می‌توانیم آنتی‌ژن محلول را به ذرات غیر محلول متصل کرد. از آنجا که در این دسته واکنش‌های آگلوتیناسیون، شاخص‌های آنتی‌ژنیک، جزء ساختمانی ذره غیر محلول نمی‌باشند، به آنها واکنش‌های آگلوتیناسیون مجهول یا غیر عامل می‌گویند. از ذرات غیر محلول که بیشترین کاربرد را در آزمایش‌های سرولوژی دارند، می‌توان به ذرات لاتکس (از جنس ذرات بسیار ریز پلاستیک است) و گلبول‌های قرمز گوسفند اشاره کرد. از ذرات غیر محلول دیگری که به ندرت استفاده می‌شوند، می‌توان به ذرات بنتونایت (Bentonite) زغال چوب (Characol) اشاره کرد. به عنوان مثال در آزمایش‌های

سرولوژی تشخیص فاکتور روماتیدی (RF) و حاملگی، به ترتیب آنتی بادی IgG و هورمون hCG انسان را که محلول هستند، به ذرات غیر محلول لاتکس متصل کرده اند.

ج) واکنش‌های آگلوتیناسیون غیر مستقیم (Indirect test)

گاهی به علت وجود آنتی بادی‌های ناقص (Incomplete) یا مسدود کننده (Blocking Antibody)، فقط یک بازوی آنتی بادی به آنتی ژن غیر محلول متصل می‌شود که در نتیجه شبکه بین آنتی بادی و آنتی ژن تشکیل نشده و آگلوتیناسیون دیده نمی‌شود. در چنین مواردی برای مشاهده آگلوتیناسیون و در صورتیکه آنتی بادی ناقص، انسانی باشد، از آنتی هیومن (آنتی بادی ضد آنتی بادی انسانی یا آنتی گاماگلوبولین) استفاده می‌شود. مانند آزمایش کومبس رایت. به این روش آگلوتیناسیون غیر مستقیم گویند.

۲) واکنش‌های رسوبی، پرسیپیتاسیون (Precipitation Reactions)

اگر در واکنش‌های سرولوژیکی، آنتی ژن یک ذره محلول باشد (مانند هورمون، پروتئین‌های موجود در سرم و...) واکنش رسوبی یا پرسیپیتاسیون نامیده می‌شود. در واکنش‌های پرسیپیتاسیون، به آنتی بادی Precipitin و به آنتی ژن Precipitinogen و به واکنش صورت گرفته Precipitation گویند. واکنش‌های رسوبی در محیط نیمه جامد مانند ژل، انجام می‌شوند.

۳) واکنش‌های فلوکولاسیون (Flocculation Reaction)

وقتی که در واکنش‌های سرولوژیکی، آنتی ژن به صورت ذرات کلوئیدی باشد مثل کاردیولیپین قلب گاو در آزمایش VDRL (برای تشخیص بیماری سیدیس)، واکنش را فلوکولاسیون می‌نامند. از طرفی، واکنش‌های سرولوژیکی آزمایشگاهی را می‌توان به دو دسته اولیه و ثانویه تقسیم نمود:

واکنش‌های اولیه سرولوژی در واقع، واکنش بین یک مولکول آنتی ژن با یک یا چند ظرفیت، با مولکول آنتی بادی می‌باشند. واکنش‌های اولیه سرولوژی بخودی خود، مستقیماً قابل مشاهده نیستند. برای مشاهده این دسته واکنش‌ها باید آنتی بادی یا آنتی ژن را بوسیله موادی از جمله مواد فلورسنت (مانند FIT و PE)، مواد رادیواکتیو

(مانند ید ۱۲۵) و یا آنزیم (مانند آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز ALP و پیراکسیداز HRP) نشاندار کرد.

این گونه آزمایش‌های سرولوژی را برحسب نوع ماده نشاندار به ترتیب آزمایش‌های ایمونوفلورئوسنت (IFA: Immunofluorescent assay)، رادیوایمونواسی (RIA: Radioimmuno assay) و الیزا (ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent assay) می‌نامند. این دسته از آزمایشات از حساسیت بسیار بالایی برخوردار هستند و مقادیر بسیار جزئی از آنتی‌بادی و یا آنتی ژن را می‌توانند شناسایی کنند. واکنش‌های ثانویه در حقیقت تجلی اجتماع چندین مولکول آنتی‌ژن و آنتی‌بادی است که بر روی سطح پرتاسیون، آگلوتیناسیون و یا فلوکولاسیون، در صورتی که مقادیر کافی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی موجود باشند، دیده می‌شوند.

آنتی ژن‌ها

موادی که قادر باشند پاسخ اختصاصی سیستم ایمنی را تحریک کنند آنتی ژن نامیده می‌شوند. هر چند که برای این تعریف، کلمه ایمونوژنیسیته عنوان شده است اما امروزه آنتی ژنیسیته و ایمونوژنیسیته بجای یکدیگر به کار می‌روند. در تعریف دقیق، هر ماده‌ای که بطور اختصاصی بتواند به مولکول آنتی‌ژن را پذیرنده سلول T متصل شود آنتی ژن نامیده می‌شود و مولکول‌هایی را که سبب پاسخ‌های ایمنی می‌شوند ایمونوژن می‌نامند. این تفاوت بدین سبب است که مولکول‌های کوچکی وجود دارند که به آنتی‌بادی‌ها متصل می‌شوند اما توانایی تحریک سیستم ایمنی را ندارند.

چنین مولکول‌هایی هاپتن (واژه یونانی به معنای چنگ زدن) نامیده می‌شوند و آنتی ژن‌هایی هستند که ایمونوژن نمی‌باشند. در حالت کلی ماکرومولکول‌ها بسیار بزرگتر از ناحیه اتصالی آنتی ژن در یک مولکول آنتی‌بادی هستند بنا بر این، هر مولکول آنتی‌بادی فقط به بخشی از ماکرومولکول که شاخص یا اپی توپ نامیده می‌شود اتصال می‌یابد. این دو واژه مترادف یکدیگر هستند و در تمام این بخش به جای یکدیگر به کار می‌روند. به طور معمول ماکرومولکول‌ها شامل چند شاخص هستند که هر یک از آنها می‌توانند به یک آنتی‌بادی متصل گردند. وجود شاخص‌های یکسان متعدد در یک آنتی

ژن سبب می شود که آن آنتی ژن، یک آنتی ژن چند ظرفیتی نامیده شود. اکثر پروتئین های کروی شامل اپی توپ های متعدد یکسان نبوده و پلی والان نیستند، مگر اینکه بصورت مجتمع درآیند. در مورد پلی ساکاریدها و اسید های نوکلئیک، اپی توپ های یکسانی در فواصل منظم قرار گرفته اند که به این مولکول ها پلی والان می گویند. سطوح سلولی، اغلب آرایش های پلی والان کربوهیدرات ها و یا پروتئین ها را نشان می دهند. آرایش فضایی اپی توپ های مختلف بر روی یک مولکول پروتئینی منفرد ممکن است از بدین طریق بر اتصال آنتی بادی ها تاثیر بگذارد. هنگامی که شاخص ها از نظر فضایی با حوبی از هم جدا شده باشند، دو مولکول آنتی بادی مجزا می توانند به یک آنتی ژن پروتئینی متصل شوند بدون اینکه بر روی یکدیگر تاثیر بگذارند. چنین شاخص هایی با یکدیگر هم پوششی ندارند. زمانی که دو شاخص نزدیک یکدیگر باشند، اتصال آنتی بادی به شاخص اول ممکن است با اتصال آنتی بادی به شاخص دوم تداخل فضایی ایجاد کند، چنین شاخص هایی با یکدیگر هم پوشانی دارند. در موارد نادری، اتصال آنتی بادی اول سبب تغییر در شاخص فضایی آنتی ژن می شود و بر روی اتصال آنتی بادی دوم تاثیر می گذارد. چنین واکنش های متقابل را اثرات آلوستریک می نامند.

شاخص های آنتی ژنیک می توانند بوسیله ساختمان کووالان یک مولکول یا در مورد اسیدهای نوکلئیک و پروتئین بوسیله تاخوردگی غیرکووالانی ایجاد شود. برای مثال شاخص های آنتی ژنیک لیپیدها و کمپلکس کربوهیدرات ها حاصل ساختمان کووالان مولکول می باشند و در مورد پروتئین ها، برخی از شاخص ها، فقط وابسته به ساختمان کووالان مولکول هستند و برخی دیگر ناشی از ساختمان سوم آنها می باشند. اپی توپ هایی که از چندین اسید آمینه مجاور هم بوجود می آیند، که به شاخص های خطی نامیده می شوند. معمولاً جایگاه اتصال آنتی ژن در یک آنتی بادی می تواند به شاخص های خطی بطور تقریبی ۶ اسید آمینه متصل شود. شاخص های خطی در یک پروتئین چین خورده خطی طبیعی، به شرطی می توانند در دسترس آنتی بادی ها قرار گیرند که در قسمت سطحی آن یا در ناحیه ای با ساختار فضایی گسترده واقع شده باشند.