Lab 4

علم المناعة العملي

Practical Immunology

التفاعل بين المستضد والجسم المضاد Antigen-Antibody Interaction
(تفاعلات التلازن Agglutination Reactions)

ان ارتباط المستضد Antigen مع الجسم المضاد الخاص به (Specific Antibody) يدعى بالتفاعل بين المستضد والجسم المضاد ويختصر بـ Ag-Ab Interaction وينتج عن هذا الارتباط تكوين المعقد المناعي Immuno-Complex.

Ag+Ab ⇌ Immuno-Complex

ان الاسهم المتعاكسة في المعادلة اعلاه تدل على ان الارتباط بين المستضد والجسم المضاد هو ارتباط ضعيف وتتحكم به قوى ارتباط (Binding Forces) ضعيفة هي:-

1. Van der Waals forces.
2. Electrostatic forces.
3. Hydrogen bonds.
4. Hydrophobic forces.

<u>أنواع التفاعلات بين المستضد والجسم المضاد The types of Ag-Ab reactions</u>

1- تفاعلات التلازن Agglutination.

2- تفاعلات الترسيب Precipitation.

3- تثبيت المتمم Complement fixation.

4- فحص الادمصاص المناعي المرتبط بالإنزيم Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

5- التألق المناعي Immunofluorescence (IM).

Types of Antigens انواع المستضدات

1) Polypeptides & Proteins (enzymes، Cell surface structure، Hormones، Exotoxins).
2) Lipoproteins (Cell membrane).
3) Glycoproteins (Blood cell markers)
4) Nucleoproteins (DNA complexed to protein but not pure DNA).
5) Polysaccharides (Bacterial capsule).

Agglutination Reaction تفاعل التلازن

التلازن او التراص: هو تكتل الجسيمات Clumping of particles وهذا المصطلح مشتق من الكلمة اللاتينية Agglutinare والتي تعني الغراء، ويشترط بالمستضد ان يكون حبيبي (غير ذائب) (Non soluble) Particulate Ag مثل البكتريا، المستضدات الموجودة على سطح كريات الدم الحمر وغيرها.

Particulate antigen + Antibody = Agglutination

Applications of Agglutination reaction تطبيقات تفاعل التلازن

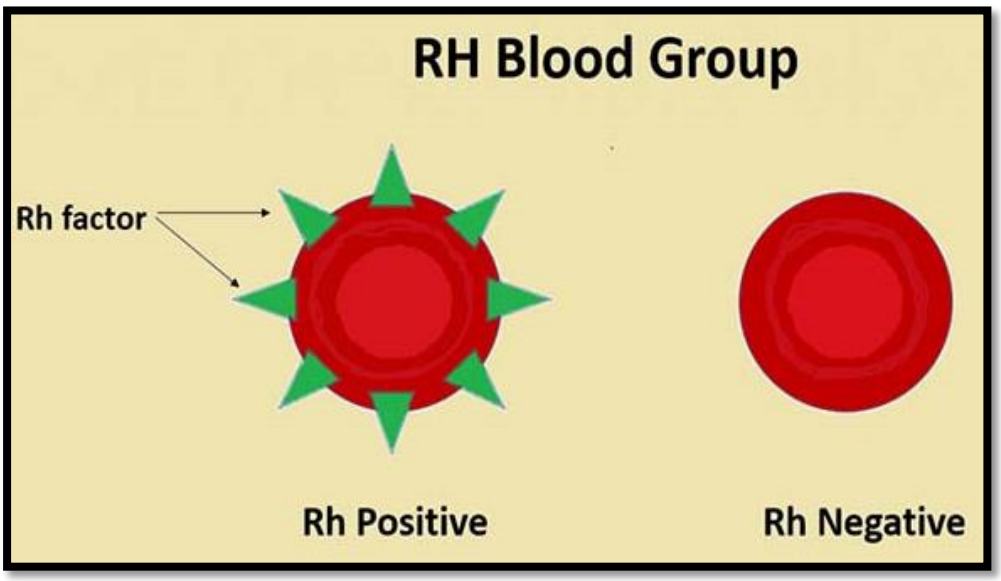
1- مجاميع الدم ABO &Rh Systems

تتميز كريات الدم الحمر للإنسان مثلها مثل اي خلايا بوجود مركبات البروتينات السكرية Glycoproteins والبروتينات الدهنية Glycolipids على سطح الغشاء الخلوي وهذه المكونات لها خاصية مستضدية، ومثال ذلك البروتينات السكرية الموجودة على سطح كريات الدم الحمر للإنسان والتي تنتج نظام الدم او ما تسمى مجموعة الدم ABO. تصنف فصائل الدم بحسب نظام ABO الى الفصائل الموضحة في الشكل التالي:-

	Group A	Group B	Group AB	Group O
Red blood cell type	A	B	AB	O
Antibodies in plasma	Anti-B	Anti-A	None	Anti-A and Anti-B
Antigens in red blood cell	A antigen	B antigen	A and B antigens	None

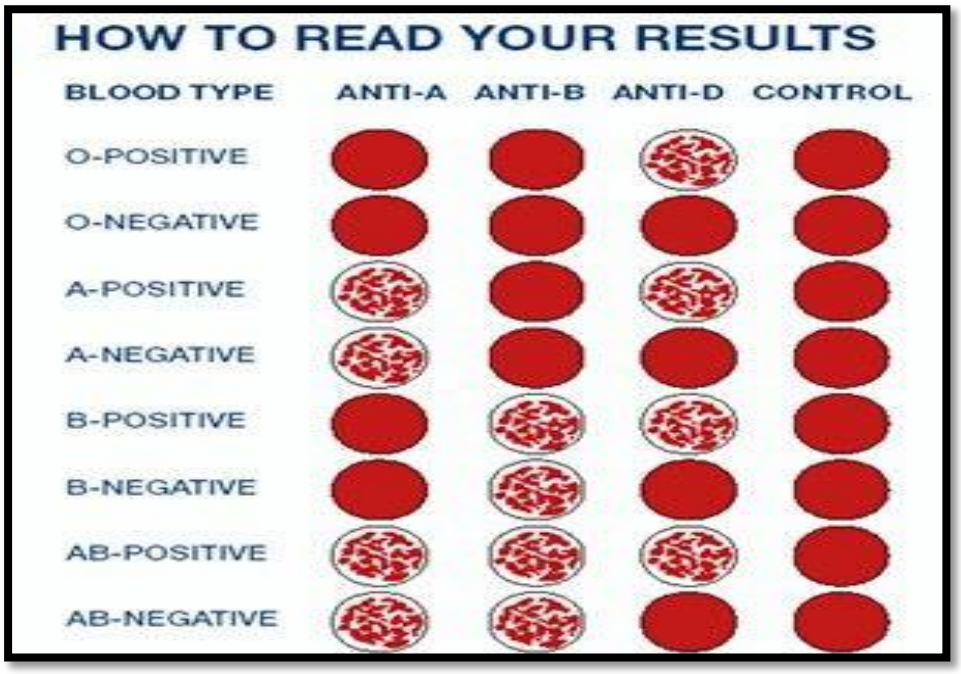
شكل (1): فصائل الدم حسب نظام ABO

اما نظام Rh فيعتمد على وجود او انعدام بروتين يسمى بالمستضد D فعند وجوده على سطح كريات الدم الحمر تعطى فصيلة الدم اشارة موجبة Rh^{+ve} ، وعند انعدامه تعطى اشارة سالبة Rh^{-ve} كما موضح في الشكل التالي:-



شكل (2): نظام Rh

❖ تقسم فصائل الدم اعتمادا على النظامين اعلاه الى ما يلي:-



شكل (3): فصائل الدم اعتمادا على نظامي ABO و Rh حيث تشير المنطقة المحببة الى حدوث التلازن.

المواد المستعملة

1. طبق خاص بالفحص يحتوي على حفر.
2. امصال مضادة Anti A، Anti B، Anti D (ABO kit).
3. عيدان للتحريك.
4. ابر وخز Lancets.
5. كحول وقطن للتعقيم.

شكل (4): ABO kit

طريقة العمل

1. عقم طرف الاصبع بالكحول ثم اعمل وخزا في طرفه للحصول على الدم.
2. ضع قطرة دم في 3 حفر من الطبق (قطرة في كل حفرة).
3. اضف المصل المضاد فوق القطرات (توزع الامصال Anti A، Anti B، Anti D على القطرات) مع الحذر من تلوث القطارة بالدم.
4. امزج الدم مع المصل المضاد باستعمال العيدان ثم حرك الطبق.
5. اقرأ النتيجة كما في الشكل (3).

2- اختبار الحمل Pregnancy test

الهورمون الاكثر شيوعا في تشخيص الحمل هو الهورمون البشري المحرض للقند Human Chorionic Gonadotropin (HCG)، وهو عبارة عن بروتين سكري Glycoprotein يفرز من المشيمة يظهر في دم الحامل بعد 6 ايام من الحمل، اما في البول فيظهر بعد 10-12 يوم. ويعد هذا الهورمون من العلامات الاساسية لتشخيص الحمل في المراحل المبكرة.

1- التشخيص المباشر باختبار التراص على الشريحة Direct Latex Agglutination Slide test

تستعمل في هذا الاختبار كريات اللاتكس Latex beads المغلفة بالمصل المضاد (Anti HCG serum) وتمزج مع مصل او بول المرأة المراد تشخيص الحمل لديها وكما موضح فيما يلي:-

Ab-coated latex + urine with Ag HCG → Agglutination (positive test)

Ab-coated latex + urine without Ag HCG → No agglutination (negative test)

2- التشخيص غير المباشر باختبار تثبيط التراص Agglutination inhibition test

في هذه الطريقة يمزج مصل او بول المرأة المراد تشخيص الحمل لديها مع المصل المضاد (Anti HCG serum) ومن ثم يضاف عالق من كريات اللاتكس المغلفة بهورمون HCG وكما موضح فيما يلي:-

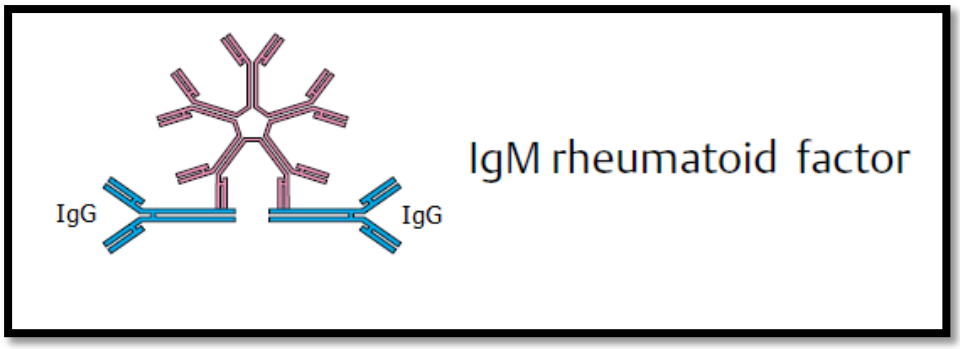
Anti HCG serum + urine with Ag HCG + Ag-coated latex→ No agglutination (positive test)

Anti HCG serum + urine without Ag HCG + Ag-coated latex→ Agglutination (negative test)

3- العامل الرثواني (RF) Rheumatoid Factor

هو الاضداد الذاتية Autoantibody (IgM غالبا) الموجهة ضد Fc portion للجسم المضاد IgG للانسان، حيث يرتبط العامل الرثواني RF مع الجسم المضاد IgG فتتكون معقدات مناعية Immune complexes تؤدي الى تطور الاصابة. يستعمل هذا الاختبار لتشخيص مرض التهاب المفاصل الرثواني (Rheumatoid Arthritis) الذي يعد من امراض المناعة الذاتية، وقد يكون RF دليل للإصابة بأمراض اخرى.

النسبة الطبيعية للعامل الرثواني هي اقل من 14وحدة دولية (IU)/ml.



شكل (5): Rheumatoid factor

عدة الاختبار RF kit

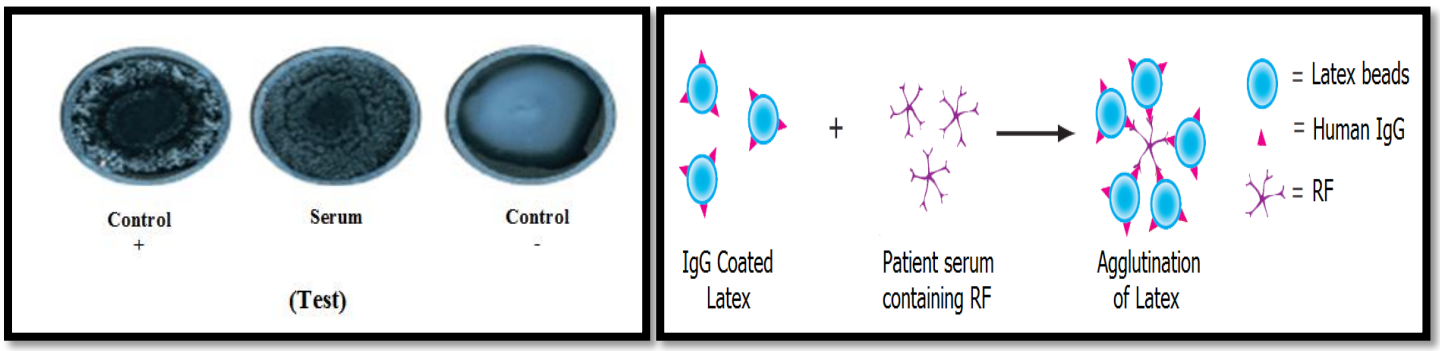
مكونات العدة Contents of RF kit

Reagent: كريات اللاتكس مغلفة بالجسم المضاد IgG للإنسان.

Positive control: مصل عياري موجب يحتوي على العامل الرثواني (IgM).

Negative control: مصل عياري سالب

شكل (6): RF kit



شكل (7): مبدأ عمل اختبار RF

4- اختبار ويدال Widal test

- ❖ يستعمل لتشخيص الاصابة بمرض الحمى التيفوئيدية (Typhoid fever) والحمى الباراتيفوئيدية (Paratyphoid fever).
- ❖ يكشف عن الاجسام المضادة الخاصة ببكتريا *Salmonella* في حالة الاصابة بالمرض.
- ❖ سمي الفحص على اسم الطبيب وعالم الجراثيم الفرنسي Georges Fernand Isidore Widal.
- ❖ تستعمل في هذا الاختبار مستضدات مختلفة محضرة من بكتريا السالمونيلا وكما موضح في الجدول التالي:-

البكتريا	المستضد
Salmonella typhi	*Salmonella typhi* **H** *Salmonella typhi* **O**
Salmonella paratyphi A	*Salmonella paratyphi A*-**H** *Salmonella paratyphi A*-**O**
Salmonella paratyphi B	*Salmonella paratyphi B*-**H** *Salmonella paratyphi B*-**O**

حيث **H** هو المستضد السوطي (Flagellar) للبكتريا، بينما **O** هو المستضد الجسمي (Somatic).

- ❖ هناك طريقتين لإجراء الاختبار وهما:-

1- طريقة الشريحة الزجاجية Slide Agglutination test

طريقة نوعية Qualitative، اي تستعمل لمعرفة نوع الاصابة ولا تحدد شدة الاصابة، ويمكن توضيحها بالشكل التالي:-

شكل (8): Slide Agglutination test

مكونات العدة Widal test kit

Reagent: المستضدات O وH لأنواع جنس السالمونيلا كما موضح في الجدول السابق.

Positive control: مصل عياري موجب.

Negative control: مصل عياري سالب.

شكل (9): Widal test kit

2- طريقة التراص بالانبوب Tube agglutination test

هي طريقة كمية Quantitative تستعمل لمعرفة تركيز الاجسام المضادة في مصل المريض حيث يخفف المصل بطريقة التخفيف المتسلسل (Serial dilutions) وتضاف اليه كمية محددة من المستضد وتؤخذ النتيجة كمقلوب أعلى تخفيف يظهر نتيجة ايجابية او ما يسمى بالمعيار Titer.

(RBT) Rose Bengal Test -5

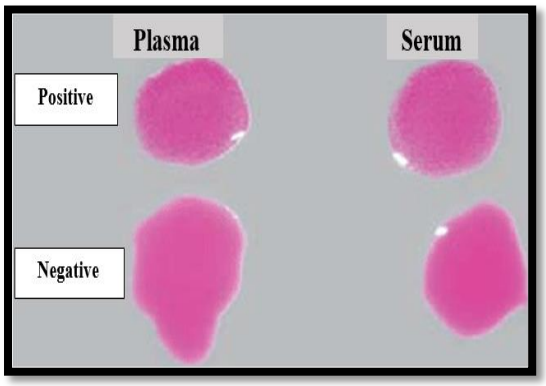
اختبار تراص يستعمل لتشخيص الحمى المالطية (Brucellosis) في الانسان والحيوان، ويوضح الشكل التالي صورة للاختبار وعدة التشخيص الخاصة به:-

مكونات العدةContents of RB kit

Reagent: مستضدات البكتريا المصبوغة بصبغة Rose Bengal.

Positive control: مصل عياري موجب.

Negative control: مصل عياري سالب.



شكل (10): Rose Bengal test

6- اختبارات مضاد الحالَّة العقدية Antistreptolysin O Test (ASOT)

يستعمل هذا الاختبار في تشخيص الاصابة ببكتريا المكورات المسبحية Streptococcal infection وبالأخص *Streptococcus pyogenes* . يوضح الشكل التالي صورة لعدة التشخيص:-

مكونات العدة Contents of ASO kit

Reagent: كريات لاتكس مغلفة بالمستضد Antistreptolysin O Ag.

Positive control: مصل عياري موجب يحوي اجسام مضادة Antistreptolysin O Ab.

Negative control: مصل عياري سالب.

شكل (11): Antistreptolysin O kit

تعاريف مهمة

المعيار Titer: هو مقلوب اعلى تخفيف يعطي نتيجة موجبة.

التخفيف المتسلسل Serial dilution: هو سلسلة من التخفيفات المتسلسلة لمادة في محلول.

معامل التخفيف Dilution factor: هو عدد مرات تخفيف محلول قياسا الى المحلول الاصلي.