

محاضرات

علم المصوب Serology

ب ٤٦٥

ا. د. وفاء سعدون شاني

المحاضرة الثانية

Antigen - Antibody binding

ان الطريقة التي يتم بها ارتباط **Ag** مع **Ab** او تكوين المعقدات المناعية هي التي تتضمنها العديد من الفحوصات المناعية . وبتعبير اسهل فان **Ab** المتخصص يستعمل كي يبحث عن محدد مستضدي مفرد **single antigenic epitope** ومن ثم تكوين المعقد المناعي والذي يلاحظ اما بترسيب المعقد او بوجود مواد مشعة **radioactive** او مفلورة **fluorescent** او انزيمية **enzymatic** مع **Ab** . وعليه فان تفاعلات الضد مع المستضد يمكن الكشف عنها في المختبر بعدة طرق وتقنيات ومن هذه التقنيات والتي تستخدم بصورة شائعة هي :

1 - Agglutination التلازن

هو تعبير يستخدم لوصف تجمع المستضدات الدقائقية وتغطيتها بواسطة Ab متخصص (يعرف بالضد الملازن او agglutinin) وبوجود ايونات محددة . ويحدث هذا التفاعل على سطح الجزيئات غير الذائبة ويشمل المستضدات الواقعة على سطح الخلايا .

وتعتمد نوعية نتائج فحص التلازن على عدة عوامل هي :

- وقت الحضان مع مصدر ال Ab
- كمية ودرجة ارتباط المستضد بال carrier
- ظروف بيئة الفحص مثل (PH وتركيز البروتين)

وهناك العديد من فحوصات التلازن والتي تستخدم بشكل روتيني مثل فحوصات بنك الدم لغرض تصنيف انواع خلايا الدم وكذلك . autoimmune anti RBC Abs .
وبرغم ان فحوصات التلازن سهلة العمل او الاداء الا انها جميعا تعاني من حقيقة كونها شبه كمية اي انها لا تحدد كمية Ab بالضبط لكنها حساسة .

وتعتمد فحوصات التلازن على وجود عوامل يحمل عليها المستضد او carriers وهذه اما ان تكون

• **Biological carrier**

مثل كريات الدم الحمر RBCs مثل فحص فصائل الدم

• **Artificial carrier**

مثل حبيبات اللاتكس latex او جزيئات الفحم او charcoal والتي تحاط بالمستضد صناعيا وبوجود Ab المتخصص تتجمع الجزيئات وتعطي تلازنا واضحا ، وان هذا التجمع يمكن ان يكون مرئي اما في انبوب او microtiter plate او حتى في سلايد او شريحة زجاجية . ومن انواع التلازن هو

١- التلازن الدموي Hemagglutination

وهي طريقة لكشف ال Ab ضد مستضدات RBC اي عند مفاعلة مصل مخفف مع معلق RBC فاذا كان هناك Ab ضد Ag الموجود في ال RBC يحدث تلازن واذا كان المصل لا يحتوي على Ab لا يحدث تلازن . والتلازن الدموي نوعان

a. مباشر direct ويحدث كما في حالة فحص فصائل الدم

b. غير مباشر indirect ويحدث عند تجمع RBC المحاطة بمستضدات مايكروبية محددة والتي ترتبط مع بعضها بوجود Ab في المصل المتخصص

ومن الامثلة على التفاعلات او الفحوصات التي تستخدم التلازن

هي :

1 - Pregnancy test

2 - Widal test

3 - ABO blood group

4 - Infectious mononucleosis

5 - C - Reactive protein

1 - Pregnancy test

ان فحص الحمل التقليدي هو classic latex test حيث ان الفحص في الادرار او المصل يعتمد على وجود هرمون human chorionic gonadotropin او HCG والذي ينتج من قبل المشيمة بعد تخصيب الحيامن للبيوض بعد 72 ساعة تقريبا وان مبدأ الفحص هو

HCG + anti- HCG → visible agglutination

In urin as adsorbed on
an Ag latex particles

وان الفحص يمكن ان يتم بعد (15-20) يوم من الاخصاب
وممكن ان يتم بعد (5) او (35) يوم ويعطي نتيجة موجبة
او +ve reaction

-2 Infectious mononucleosis (IM)

خلال الاصابة بال (IM) المتسببة من قبل Epstein-Barr virus
(EBV) فإن الجسم ينتج heterophile Abs وهذه ال Abs هي
IgM وهي غير موجودة في المصل الطبيعي ، و هذه Abs ممكن ان
تسبب تلازن RBC للخيلول والاعنم ، حيث عندما يتم اضافة مصل
الشخص المريض يحدث تلازن لكريات دم الخيلول والمعاملة بصورة
خاصة والتي تعتبر هنا ك Ag معروف .

-3 C-Reactive Protein (CRP)

وهو بروتين غير طبيعي ينتج في الكبد الى مجرى الدم و ذلك في حالات
خاصة مثل الالتهابات والاصابات والحمل وكذلك السرطان (وقد سمي
كذلك لأنه يترسب مع مادة (C) او (Somatic polysaccharide of
pneumococci) وهو ليس Ab او gamma globulin وانما هو
بروتين استثنائي ينتج خلال حالات الصحة الضعيفة .

مبدأ التفاعل

Antibodies from experimental + sera containing CRP

animals attached to latex particle

⇒⇒ agglutination of CRP

The RPR test for syphilis -4

ان السفلس هو من الامراض المنتقلة جنسياً وينتج عن الاصابة بـ

Rapid plasma regain او RPR وان *Treponema pallidum*

card test يعتبر presumptive serologic screening test

للسفلس ، حيث ان مصل الشخص المصاب بالسفلس يحتوي

nonspecific anti-lipid Ab واصطلاحياً يعرف بالـ (regain)

والذي لا يوجد في المصل الطبيعي ، وان الطبيعة الحقيقية لهذا الـ Ab غير

معروفة لكن يعتقد بأن الاصابة بالسفلس تؤدي الى تحطيم خلايا المريض

و المواد الدهنية المطلقة تتحد مع بروتين *T.pallidum* لكي تكون Ag

الذي يحفز الجسم على انتاج Abs ضد دهون انسجة الجسم

(nonspecific or non treponemal) و كذلك بروتين

T.pallidum (specific or treponemal) وان RPR card test

يستعمل للكشف عن Anti-lipid Ab ويشار له بالـ

. non treponemal test for syphilis

وان مثل هذه الـ Abs ممكن ان تتواجد نتيجة لوجود امراض اخرى
مثل : الملاريا ، SLE ، viral pneumonia والحصبة ولذلك
يمكن ان يعطي نتيجة موجبة خاطئة ضد *T.pallidum* لذلك فإن
الفحص النهائي الذي يحدد الـ specific Abs هو

Flourescent treponemal Ab absorption test (FTA-ABS)

وعموماً فإن Ag في فحص (RPR) يتكون من / lecithin
cardiolipin والـ cholesterol المرتبطة بجزيئات الـ
charcoal لكي تجعل التفاعل مرئي بالعين المجردة حيث أن الـ
Anti-lipid Ab الموجودة في المصل تتفاعل مع الـ lipid Ags
وتعطي تجمع مرئي لجزيئات الـ charcoal

Precipitation test- 2

يعتمد فحص الترسيب على التفاعل بين Ag الذائب مع المصل المضاد له (والحاوي على ضد المرسب والمسمى بال pricipitin) و بوجود الايونات . حيث ان الاتحاد بين ال Ag و Ab ينتج عنه راسب غير متبلور يشبه الطحين . و ان الترسيب يتكون في المنطقة التي يكون فيها اعلى نسبة لالتقاء Ag-Ab .

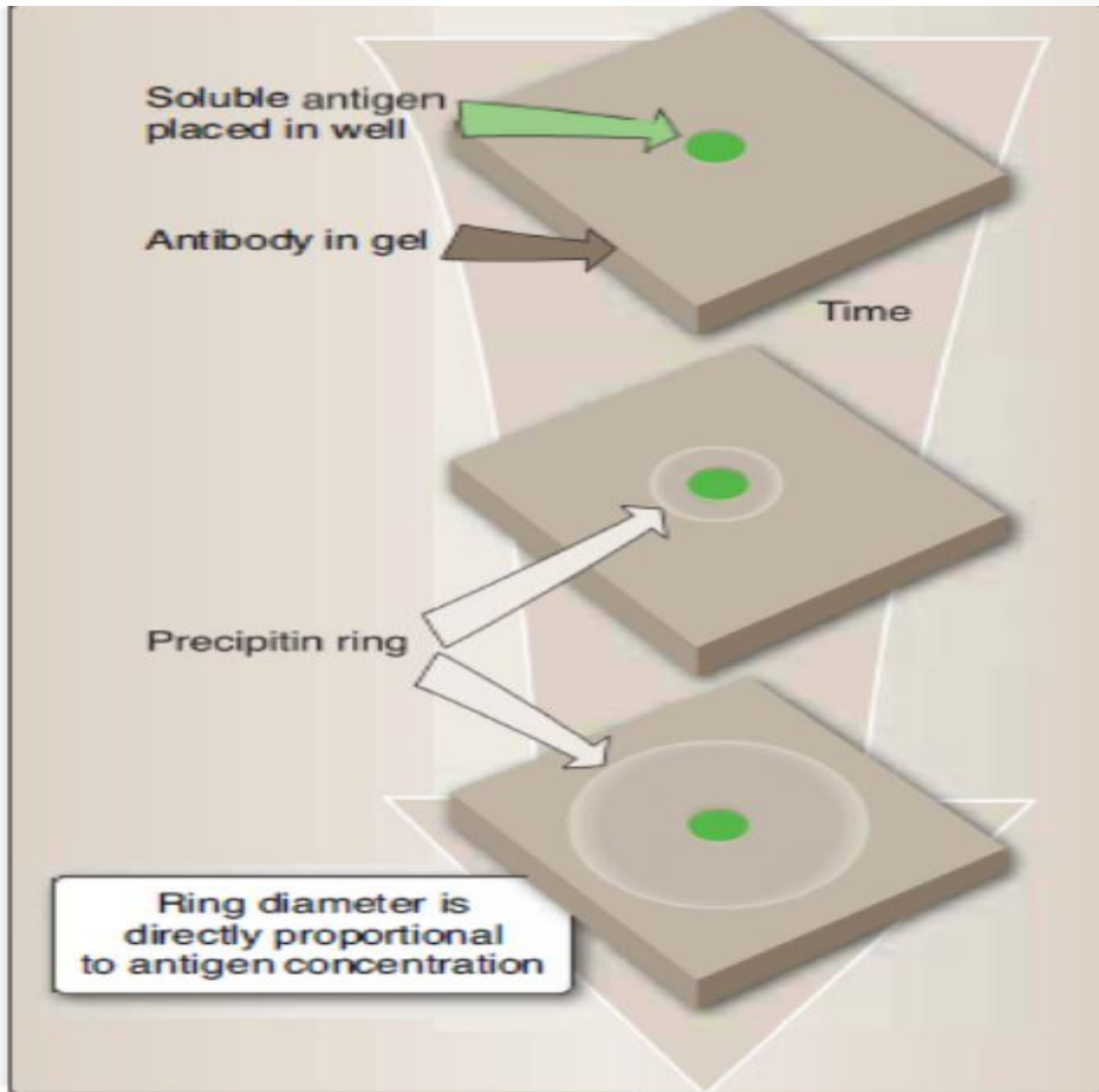
وعندما يتم هذا التفاعل في agar gel فيسمى بال immunodiffusion وهو فحص يستخدم لتحليل معقدات المستضدات و Abs و الذي يتم في ال gel او cellulose- acetate membrane حيث ان انتشار ال Ag او Ab خلال semi solid media يحدث من الهجرة من منطقة التركيز العالي الى مناطق التركيز الاوطأ .

و ان ال immunodiffusion يكون بنوعين

1- (SRID) single radial immunodiffusion الانتشار

المناعي القطري البسيط (Mancini test)

و هي طريقة تجيز لنا حساب كمية المستضدات و تتم باضافة Ab الى agar gel اي يخلطان معا ثم يصب على سلايدات لكي يستقر ثم تعمل حفر في ال gel و يضاف حجم قياسي او كمية قياسية من ال Ag و بتراكيز مختلفة في الحفر ، ثم تترك الصفائح او السلايدات لمدة 24 ساعة على الاقل و خلالها يتم انتشار Ag خارج الحفرة لكي يكون معقدات دائية مع ال Ab ، و الذي يستمر بالانتشار للخارج متحدا مع جزيئات اكثر من ال Ab حتى يصل نقطة التكافؤ حيث تترسب المعقدات المناعية بهيئة حلقة ترسيبية precipitin ring و قياس قطر الحلقة يكون متناسب مع تركيز ال Ag حيث يستخرج التركيز من المنحني القياسي standard curve .
و ممكن ان تعكس العملية باستخدام هلام او gel حاوي على Ag لتحديد تراكيز Ab



Single radial immunodiffusion (SRID)

-2 (Ouchterlony test) immune-double diffusion

حيث يصب الهلام الى ان يستقر و تعمل حفرة وسطية يوضع فيها ال Ab او ال Ag و كذلك حفر دائرية حول الحفر الوسطية يوضع فيها ال Ag او ال Ab بعدها تنتشر المحاليل للخارج وفي النقطة التي يلتقي بها Ag و Ab يتم اتحادهم ببعضهم وتترسب محدثة ما يسمى بال precipitin lines or bands ويمكن توضيح خطوط او حزم الترسيب هذه بغسل الهلام لأزالة البروتينات الذائبة ثم تصبغ حزم الترسيب بصبغة بروتينية commassie blue

وان هذه الطريقة ممكن ان تستخدم لتحديد العلاقة بين Ags و Ab اي مقارنة عدد من ال Abs باستخدام Ag واحد ، وهناك ثلاثة انواع من خطوط الترسيب :

line or arc of identity -1

وتتكون هذه الخطوط بين Ab واثنين من ال Ags المفحوصة وتكون متحدة مما يعني ان Ab قد رسب اثنين من ال المحددات المستضدية epitopes المتشابهة في كلا Ag المستضدين المحضرين .

وهذا لايعني بالضرورة ان المستضدين Ag هنا تكون متشابهة وانما هي فقط متشابهة بحيث ان هذا Ab لايستطيع تمييز الفارق بينهما

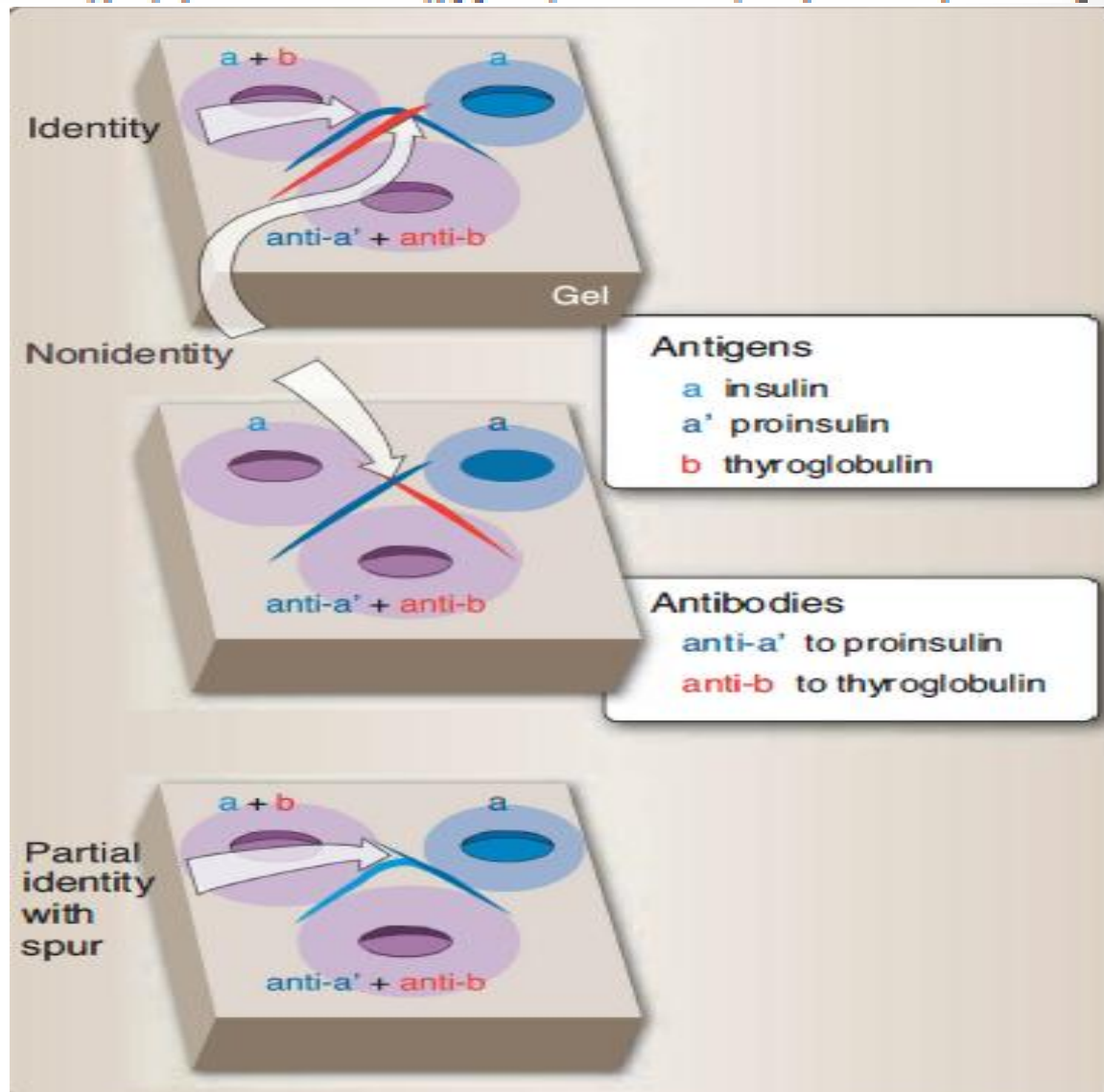
lines or arcs of non-identity - 2

وفي هذا النوع من التفاعل يستطيع Ab تمييز الفارق بين المستضدات المفحوصة حيث تنتج اقواس متقاطعة غير متحدة او independent arcs اي ان المحددات المستضدية او المستضدات غير متماثلة .

lines or arcs of partial identity – 3

في هذا التفاعل تتشارك المستضدات المفحوصة بالمحددات المستضدية حيث ان احد المحددات متشابه في المستضدين والمحدد الاخر موجود في احد المستضدين المفحوصين وفي هذه الحالة يستطيع Ab التمييز بينهم حيث يتفاعل Ab ويكون خط التماثل مع المحدد المتماثل لكن يظهر خط اخر يسمى المهاز او spur نتيجة تفاعل Ab مع المحدد المستضدي الاخر غير المتماثل لذلك يكون التشابه جزئي وليس كلي في المستضدات المفحوصة .

Double-diffusion or Ouchterlony technique.



وبالرغم من ان immunodiffusion بسيطة لكنها محددة بسبب قلة حساسيتها وكذلك احتياجها الى كميات كبيرة من Ag و Ab المترسبة كما ان معدل الترسيب قد يجعل الفحص مستهلكا للوقت .

لكن يمكن حل هذا الاشكال بوضع الهلام في حقل كهربائي والذي يحرك كل من Ag و Ab سوية بتقنية تدعى counter current immunoelectrophoresis حيث يصب الهلام وتعمل حفرة قرب القطب الموجب يوضع فيها Ab اما ال Ag المفحوص باتجاه القطب السالب وبامرار التيار الكهربائي وتضبط الفولتية يتحرك Ag و Ab كل واحد باتجاه الاخر الى ان يتم ترسيب خط بينهم