محاضرات
علم المصول Serology
ب ٤٦٥
ا. د .وفاء سعدون شاني

المحاضرة الرابعة

Radioactive binding technique -2
Radioimmuno assays (RIA)

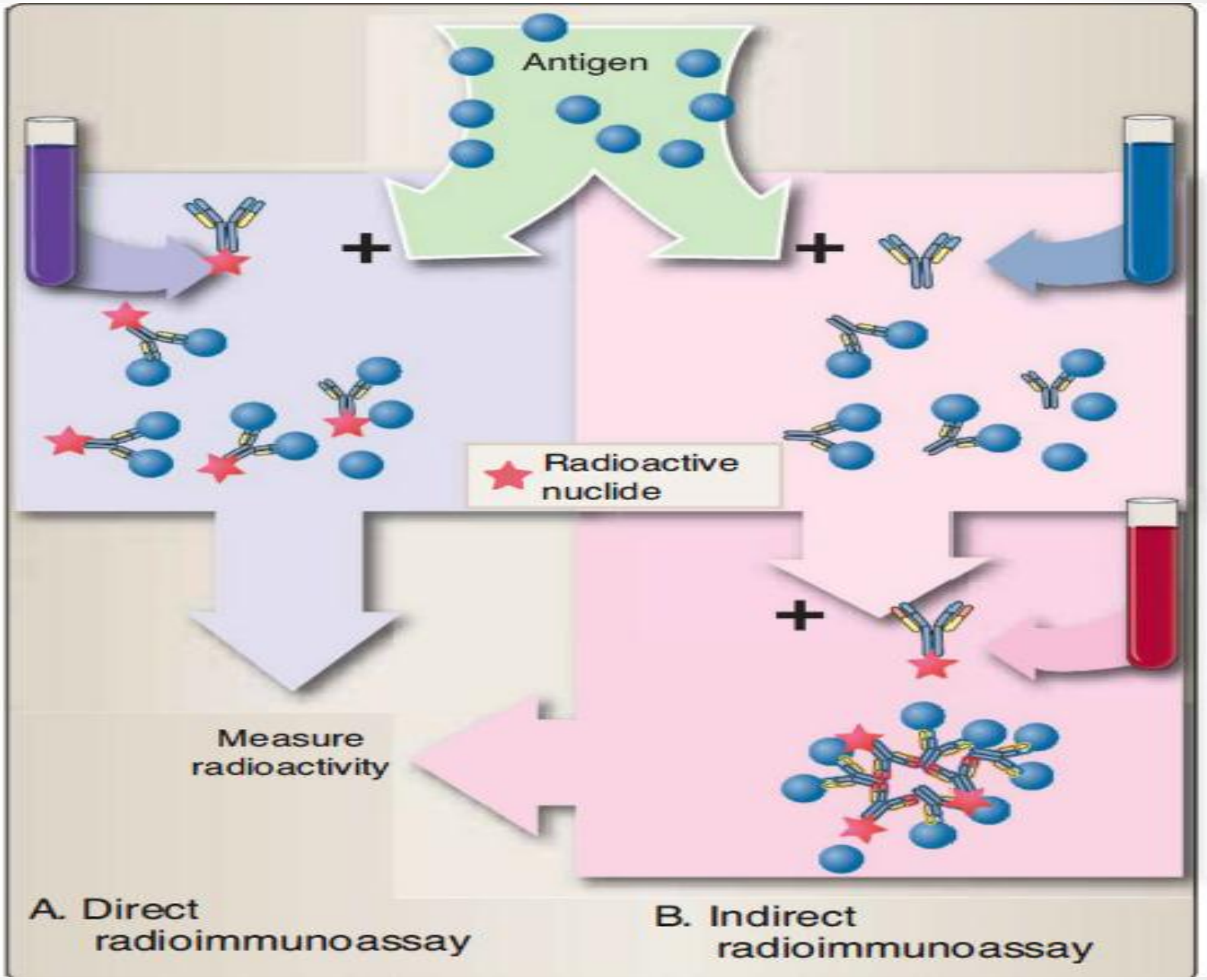
ان مبدأ هذا التفاعل هو تفاعل تنافسي competitive reaction بين اثنين من Agsمع Ab متخصص احداهما يعلم بمادة مشعة والأخر لا يعلم كما في حالة قياس الهرمونات فعلى سبيل المثال:-

في حالة التحري عن هرمون FSH فان حفر الصحيفة تكون محاطة او مغطاة بالـ FSH والذي يكون معلم بالـ radioactive substance مثل (C^{35}, P^{40}, I^{125}) والذي يأتي مع عدة التشخيص ويعتبر هنا كـ Ag ، يضاف المصل الذي يراد الكشف عن احتواءه على FSH والذي يعتبر هنا كـ Ag ثاني. ثم يضاف anti – FSH والذي يعد هنا كـ Ab والذي يأتي أيضا مع عدة العمل.

ثم تقرأ النتائج باستخدام gamma counter والذي يعطي النتيجة بحساب count per minute او cpm ثم باستخدام منحنى قياسي توضع فيه cpm مقابل التركيز لعدد من المحاليل القياسية التي تأتي مع العدة . ثم نستخرج التركيز للهرمون تحت التجربة بنفس الطريقة

اما في حالة البحث عن Ag معين او أي عامل ممرض غير الهرمونات فان طريقة التفاعل تكون شبيهة بالـ ELSA ما عدا استخدام مادة مشعة بدل الانزيمات و substrate حيث ان مصل المريض يضاف الى الحفرة التي يكون فيها الـ Ag الهدف مرتبطاً او مغطي للحفرة ثم يضاف anti – human γ globulin (anti- HGG) ومعلم بالـ radioisotope (وهو Ab صنع في حيوان اخر ضد قطعه FC للـ Ab الانسان والذي تربط به كيمياوياً المادة المشعة) والذي يرتبط بعدها مع معقد Ab – Ag . وهنا تكون كمية معقد Ab -Ag متناسقة مع درجة الاشعاع المقاسة وبنفس الطريقة أعلاه.

وهي طريقة حساسة لدرجة عالية وبإمكانها الكشف عن الكميات النزرة من Ab, Ag وتأخذ وقت قصير اما مآخذها انها خطرة إضافة الى عدم الثباتية للـ isotype أي المواد المشعة.


Antigen
Radioactive nuclide
Measure radioactivity
A. Direct radioimmunoassay
B. Indirect radioimmunoassay

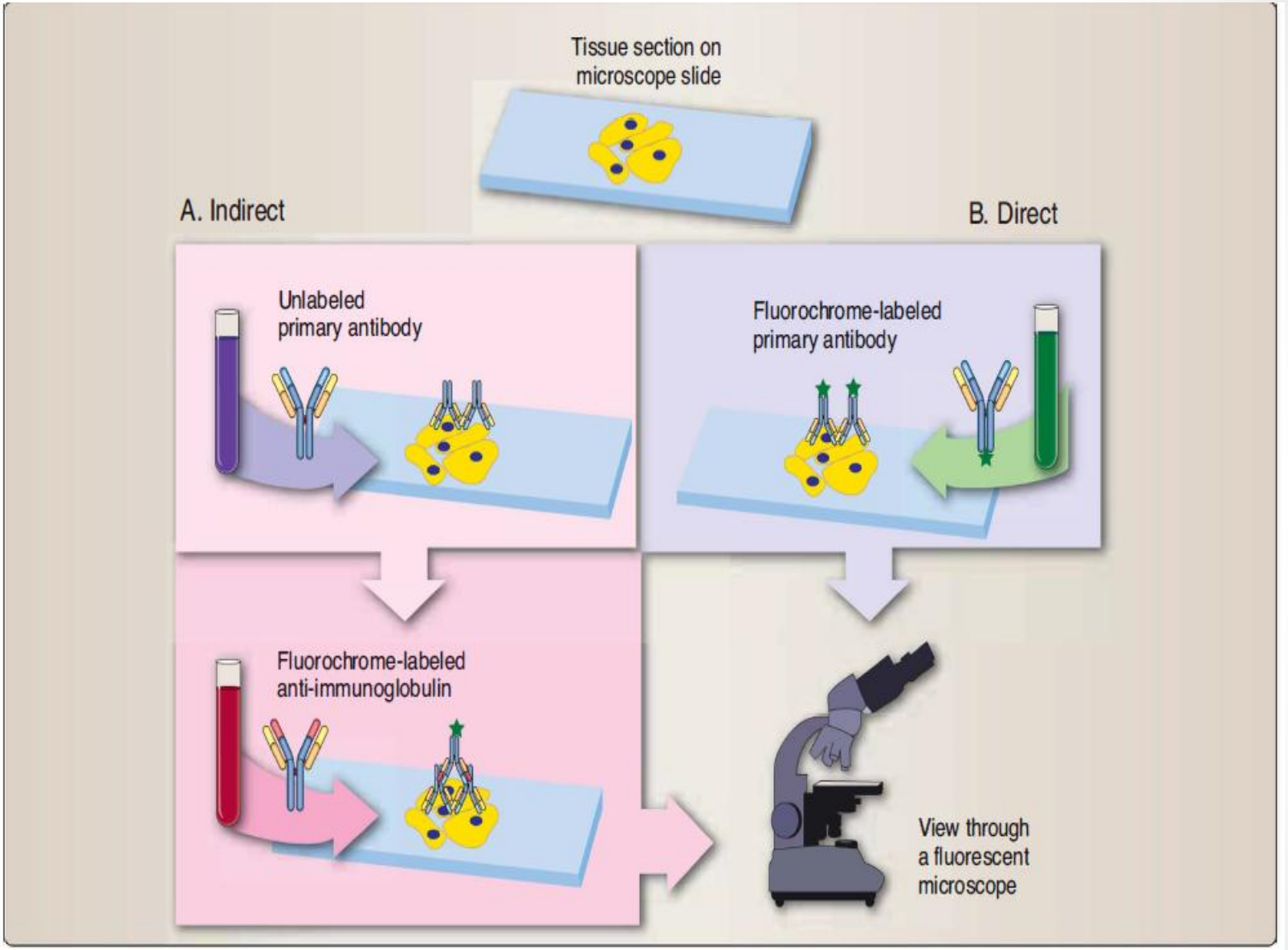
Fluorescent antibody technique -3
Immunofluoresconce assays (IFA)

وفي هذه الطريقة فان Ab متخصص عادة ما يكون (m Abs) مرتبط مع fluorescent labels والتي تستخدم كدليل للكشف عن Ag في العينات لأنسجة المرضى او خلايا المرضى وفي كلا الحالتين فان ارتباط الـ Ab بالأنسجة او الخلايا يكشف عنه باستخدام مجهر مشع Fluorescent microscope . وعند الفحص بالمجهر المشع يلاحظ بان الخلفية تكون معتمة و Fluorescent Abs المرتبطة بشكل متخصص مع Ag يمكن ملاحظتها بسبب لونها البراق اللامع.

ان فائدة هذه الطريقة هو الكشف عن Ags ضمن أنواع متخصصة من الخلايا او حتى ضمن المكونات الخلوية فمثلا تستخدم هذه الطريقة لتمييز Ags Cyloplasmic عن Ags nuclear وان استخدام Ab المشعة للكشف عن المستضدات الخلوية او النسيجية يشار له بالـ direct IFA.

كما ان العملية يمكن ان تستخدم للكشف عن Abs في مصول المرضى التي تتفاعل مع Ags المتخصصة او Cross reactions – مع مستضدات الانسجة.

حيث ان Ag يجب ان يوضع أولا ويثبت على شريحة او حتى النسيج المراد فحصه ثم يخفف المصل وتضاف التخافيف المختلفة منه على الـ Ags وبعدها يحضن ثم تغسل الشريحة لازالة Ab غير المرتبطة، ثم يضاف fluorescently labelled anti-Ig أي anti-Ig اي المرتبطة بمادة مفلورة مثل FITC او flourescien isothiocynateوتستخدم هذه الطريقة لتحديد Abs الموجهة ضد herpes simplex virus وكذلك بـ Toxoplasmaوتسمى الطريقة هنا indirect IFA حيث ان FITC تعطي لون اخضر.


Tissue section on microscope slide
A. Indirect
B. Direct
Unlabeled primary antibody
Fluorochrome-labeled primary antibody
Fluorochrome-labeled anti-immunoglobulin
View through a fluorescent microscope

Nephelometry

وفي هذه الطريقة فان تكوين المعقدات المناعية في المحلول يكشف باستخدام Spectrophotometerوان تبعثر الضوء الساقط يستخدم لتحديد المعقدات في المحاليل المخففة من المستضدات وAbs وفي المحاليل الأكثر تركيزاً للمواد المتفاعلة فان المعقدات المناعية تحيل المحلول الى شكل ضبابي والذي يقاس بامتصاص الضوء او بواسطة قياس العكورة.

التحديد النفلومتري للـ Ags يتم بإضافة كميات ثابتة من antisera عالية النقاوة وصافية ضوئيا الى كميات متغايرة من Ag ويتم الخلط في انبوبة صغيرة تعرف بالـcuvette وخلال مرور حزمة من الضوء والتكوين السريع للمعقدات المناعية والتي تقاس بواسطة خلايا photoelectric والقياس يكون بال optical destiny(OD) فالعينات ذات التراكيز العالية من Ag تحتاج الى تخفيف لغرض القياسات الصحيحة.

وان كمية OD يمكن ان تقاس بحالة واحدة أي بعد إضافة Ab للـAg أي ما يسمى بالـ end pointللتفاعل. وان معدل تكوين المعقدات يشار له بزيادة تبعثر الضوء.

وهناك عقبة او عائق في هذه الطريقة وهي ان المصل يحتوي على العديد من المكونات مثل الدهون او المعقدات المناعية قبل تكوينها تعمل كخلفية للضوء المبعثر او تبعثر الضوء. ولتجنب هذه المشكلة فان الجهاز الحديث يطرح او يسقط خلفية الضوء المبعثر قبل إضافة antisera ثم يقاس تكوين المعقدات المناعية.

ويستخدم Nephelometry لتحديد مستويات العديد من مستضدات المصل وبروتينات المصل ceruloplasmin,α 1 antitrypsin, com3, 4 , Igs

complement assays

ان فحوصات المتمم في المصل تقسم الى

- تلك الفحوصات التي تميز طبيعة مكونات المتمم ،
- وتلك التي تقيس الفعالية الوظيفية مثل التحلل الخلوي

1- Assays of individuals complements

ان القياس الكيمياوي المناعي للـ c3 ،c4 يعتبر من الفحوصات المهمة وان قياس غيرها من المكونات يمكن ان تعمل لكنها نادراً ما تكون هناك حاجة اليها، ما عدا في المرضى اللذين لديهم نقص وراثي وكذلك فحوصات وظيفية غير طبيعية.

فالمستويات القليلة لمكونات المتمم تكون منتشرة ومعروفة سريرياً اكثر من المستويات العالية. كما ان مكونات المتمم يمكن ان تؤثر ك acute phase reaction فان معدل صناعتها يزداد في اي حالة التهابية وان التأثير العام لزيادة صنعها يمكن ان يغطي او يحجب معدل استهلاكها وبذلك تظهر وكأنها تملك معقدات طبيعية او قيم طبيعية لذلك بعض الأحيان فان الضروري النظر او قياس غيرها من acute phase protein او بروتينات الطور الحاد مع الوقت.

لفهم تغيرات المتمم في المرض يجب اعتبار او معرفة ثلاث مجاميع من مكونات المتمم:

١- المكونات المبكرة للطريق الكلاسيكي

٢- المكونات المبكرة للطريق المتناوب

٣- المكونات النهائية لكلا الطريقتين

وعمليا فان

- المستوى المنخفض من c3, c4 ومعدل طبيعي من factor B يعني ان هناك تنشيط للطريق الكلاسيكي فقط في حالة SLE
- اذا كان الثلاثة مستواهم منخفض يعني انه من الممكن هناك تنشيط لطريق الكلاسيكي والمتناوب, وفي حالات الاصابة gram – ve وبعض حالات SLE

- واذا كانت مستويات طبيعية للـ c4 ومنخفض للـ c3 و factor B يوجد هناك تنشيط للطريق المتناوب مثل حالة مرض c3 Nef autoantibody

- وان كان الثلاثة مرتفعين يعني زيادة في صنع كل المكونات كما في حالة الالتهاب الحاد والمزمن.