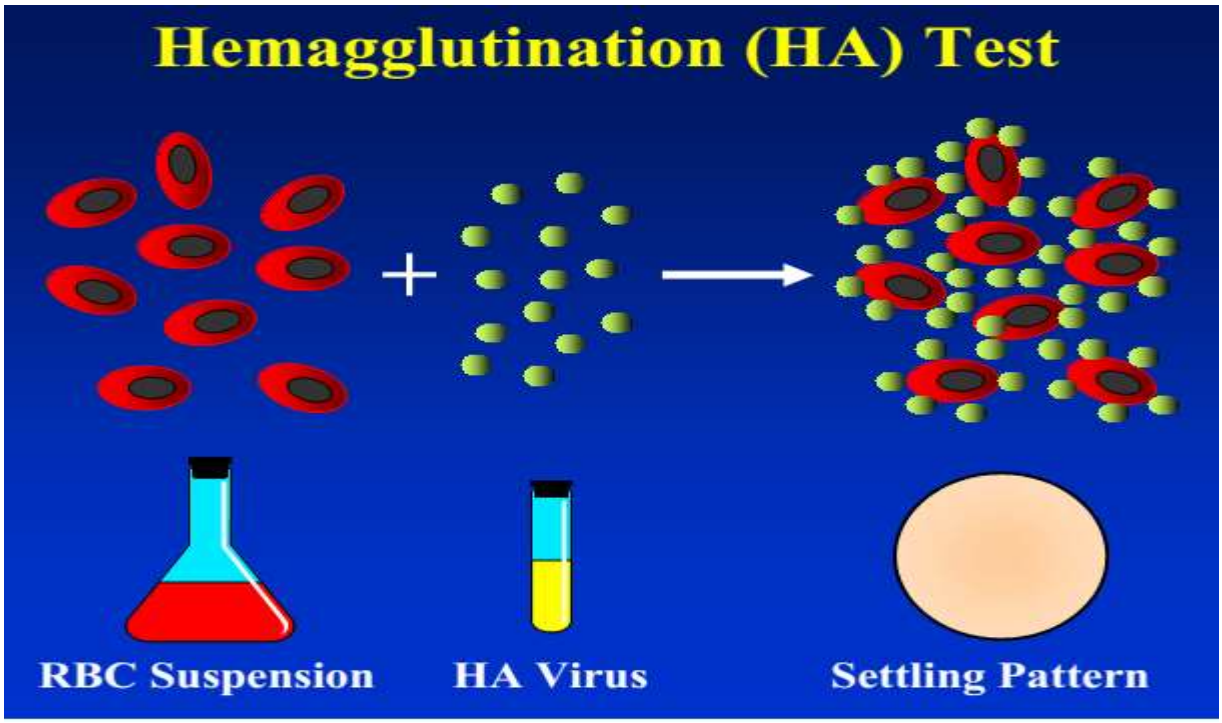
المختبر الثامن :

2. فحص التلازن الدموي Heamagglutination Assay (HA)

هـي طريقـة شـائعة وسـريعة وبسـيطة لقيـاس معيـار الفيـروس او التقـدير الكمـي لفيـروس معـين مثـل **Adenoviruses, Parvoviruses, Togaviruses (Rubella), some Coronaviruses, Orthomyxoviruses (Influenza) , Paramyxoviruses (Parainfluenza), Alphaviruses, Bunyaviruses, Flaviviruses ,some strains of Picornaviruses and Newcastle Disease Virus**،لان بعض الفيروسات لها بروتينـات سـطحية تسبب تخثر وتـلازن الـدم . ويـتم مـن خـــــلال استخدام نظـام التخفيـف الثنـائي **Two-fold serial dilutions** وغالبا **(1:2 to 1:1024)**، لعالق الفيروس في اطباق المعايرة الدقيقة لغرض تحديد **نقطـة القطع End Point** او **معيـار التلازن الدموي HA titer**،ويمكن استخدام هذه النتائج في تحديد كمية **انـزيم التلازن Hemagglutinin** في العالق الفيروسي لكي يتم تهيئتـه لغرض فحوصـات **تثبيط التلازن الدموي Heamagglutination Inhibition Test** .



تحضير المصل المراد فحصه

بعد جمع الدم وتركة لكي يتخثر خـلال دقـائق ينفصـل المصـل عن الخثـرة ويمكـن استخدام جهـاز الطـرد المركـزي للتسـريع بعمليـة الفصـل وترسـيب خلايـا الـدم بشـكل تـام ، ولكـي يـتم جمـع اكبـر كميـة ممكنـة مـن المصـل. ويجـب التاكـد مـن عـدم حـدوث تكسـر بخلايـا الـدم الحمـراء ، حيـث ان تكسـر او تحلـل خلايـا الـدم

الحمراء يؤدي الى تحرير مادة **الهيمولايسين Hemolysin** التي تؤثر في نتائج المعايرة . يتم نقل المصل بواسطة الماصة الاوتوماتيكية الى انابيب اختبار نظيفة ومعقمة ويمكن الاحتفاظ بالمصل هذا بالتجميد (20- م)، مع وضع المعلومات الكاملة على كل عينة.

تحضير عينة دم مغسول Washed RBC

يؤخذ **1 مل** من **الدم** ويضاف الى كمية **300 مايكروليتر** مانع التخثر سترات الصوديوم . يكمل الحجم الي **10 مل** باضافة المحلول الفسلجي المتعادل. ترسب خلايا الدم بجهاز الطرد المركزي ويهمل الراشح . تعاد العملية باضافة المحلول الفسلجي المتعادل ثلاثة مرات . في الغسله الاخيرة يتم التخلص من الراشح ويكمل الحجم الى **10 مل** حيث يؤخذ **1 مل** الذي يمثل **1 %** من عالق خلايا الدم المغسول.

طريقة العمل Method

يجب اولا تثبيت مواقع العينات على شكل مخطط يشبه طبق المعايرة من نوع **V-shaped or U-shaped 96 -well microtitre plate** (**حسب شكل قاعدة الحفرة**)المكون من 96 حفرة.

1. توزيع **50 مايكروليتر (0.05 مل)** من الـ **PBS** او المحلول الفسلجي المتعادل على كل حفر طبق المعايرة.

2. اضافة **50 مايكروليتر** من عينة الفيروس (المصل) في الحفرة الاولى.

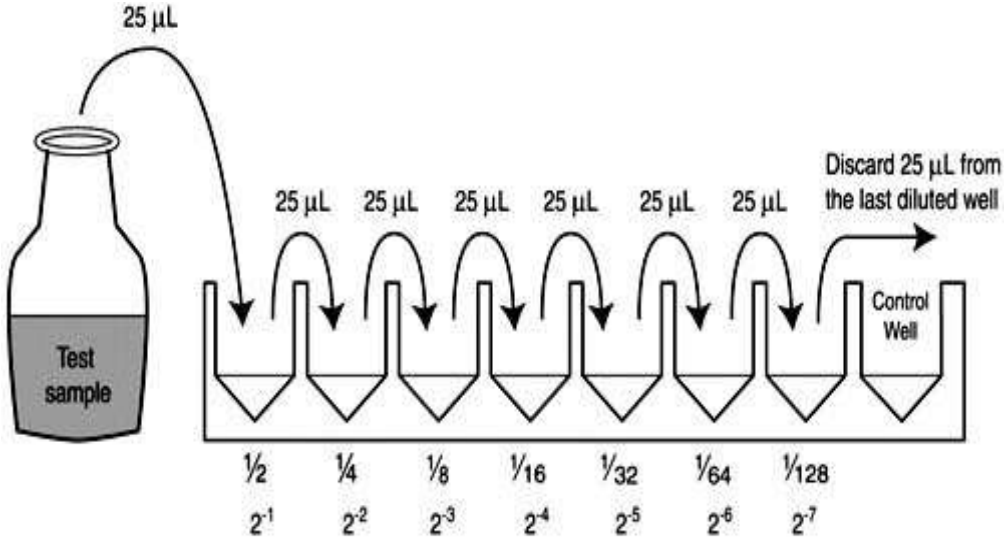
3. باستخدام الماصة المتعددة الفتحات ينقل **50 مايكروليتر** من الحفرة الاولى الى الحفرة الثانية في طبق المعايرة وصولا الى الحفرة رقم **12**.

4. اضافة **50 مايكروليتر** من محلول **1%** من عالق خلايا الدم المغسول لكل حفرة بالاضافة الى حفر السيطرة التي لاتحوي على عينات مصل.

5. يتم رج طبق المعايرة بلطف لغرض مزج محتوياتها بصورة جيدة ، ووضع الغطاء عليها.

6. ترك طبق المعايرة لمدة **10-15 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة (22 – 25 ْم)** لغرض ثبات محتويات الحفر.

7. قراءة وتسجيل النتائج لكل حفرة ، حيث جميع حفر السيطرة غير حاوية على الفيروس هي سالبة النتيجة.

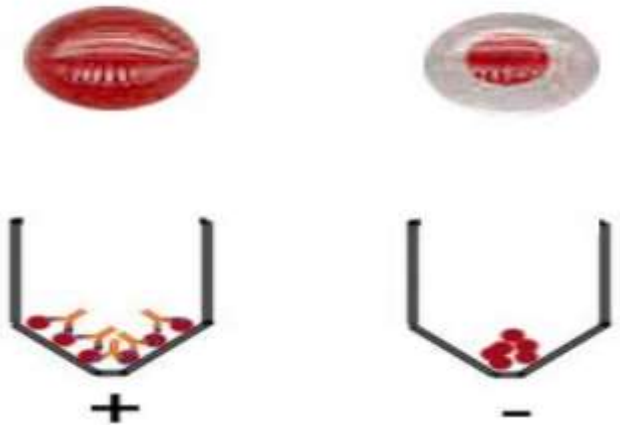


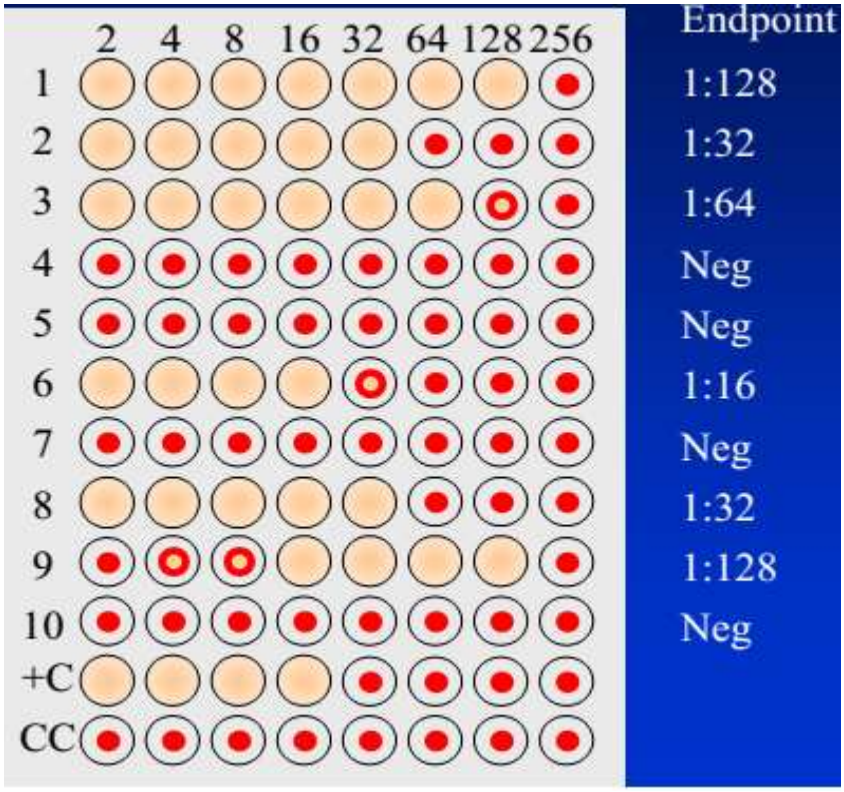
النتيجة السالبة HA Negative تتمثل بوجود راسب خلايا الدم الحمراء بشكل دائرة في قعر حفر طبق المعايرة .

النتيجة الموجبة HA Positive تتمثل بوجود غيمة او شبكة من خلايا الدم الحمراء غير متجانسة الحدود في الحفرة ولايوجد ترسب لخلايا الدم الحمراء في قعر الحفرة (في بعض الحالات يحدث ترسب للخلايا لكن بشكل قليل).

للتعرف على **نقطة النهاية End Point** يتم من خلال تعيين اخر حفرة يظهر بها التلازن والذي يمثل **HA titer units/ml ، وهو مقلوب اعلى تخفيف من المصل الذي يعطي التلازن الدموي الفيروسي الكامل.**

1 HA unit (HAU) is defined as the highest dilution of antigen that gives complete haemagglutination of cells.





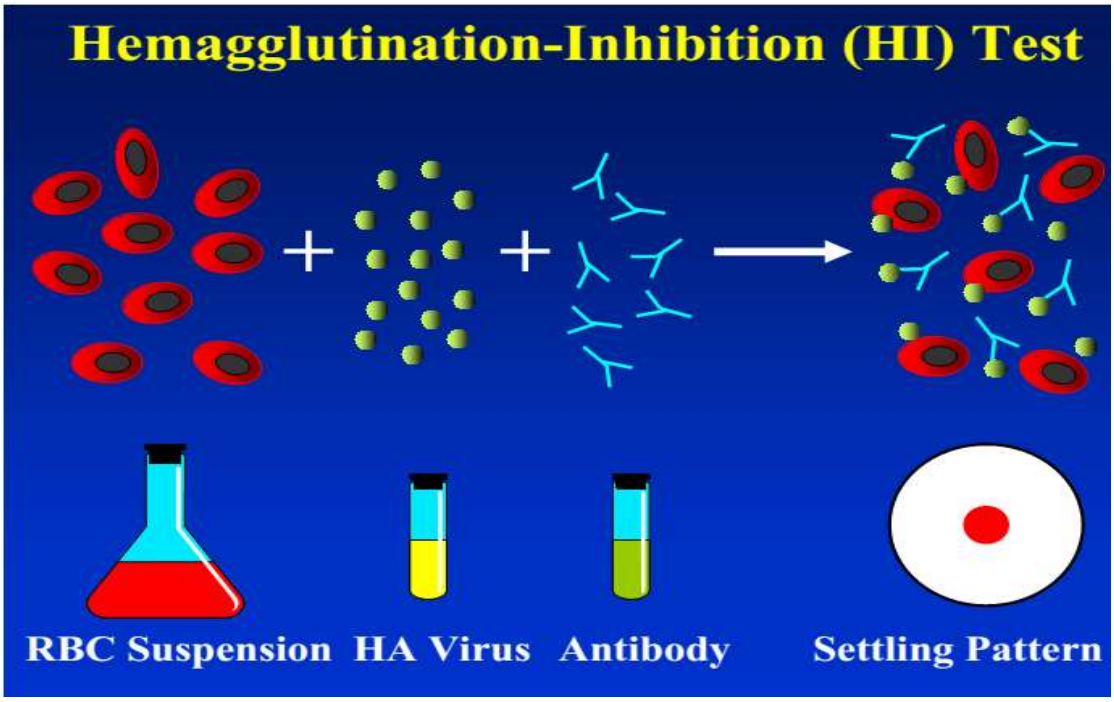
3. فحص تثبيط التلازن الدموي Heamagglutination Inhibition (HI) Test

هي طريقة الغرض منها قياس كمية الاجسام المضادة المتخصصة لمستضدات الفيروس في العينة . ومبدا العمل ان وجود كمية قليلة من المستضدات في العينة يؤدي الى حصول التلازن اما عند تواجد الاجسام المضادة **Ab** في عينة الفحص فهذا يؤدي الى تثبيط التلازن الدموي **HI** ، اي يؤدي الى ترسب خلايا الدم في قعر الحفر. لكن في حالة عدم تواجد الاجسام المضادة في العينة فهذا يؤدي الى تلازن كريات الدم الحمراء . ان **نقطة نهاية المعايرة End Point of the Titration** تتمثل بالحفرة التي تظهر **تثبيط تلازن تام Complete Heamagglutination Inhibition**. في بعض الاحيان لا يمكن تشخيصة بسهولة ، ولكن بالنظر الى حجم كتلة خلايا الدم الحمراء يمكن تشخيص تثبيط التلازن . وان استخدام حفر السيطرة كمقارنة مهم جدا بالتشخيص .

طريقة العمل Method :

اولا تثبيت ارقام ومواقع العينات في طبق المعايرة على قصاصة ورق مخططة بحيث تشابة طبق المعايرة **microtiter plate من نوع U or V-Shaped.**

1. اضافة **25 مايكروليتر (0.025 مل)** من الـ **PBS**او المحلول الفسلجي المتعادل الى كل الحفر في طبق المعايرة.



2. ترج كل عينة مصل جيدا ويؤخذ **25 مايكروليتر** منها وتوضع في الحفرة الاولى.

3. باستخدام الماصة يتم نقل **25 مايكروليتر**من عينات المصل بعد مزجها مع محتويات الحفرة بشكل جيد الى الحفرة الثانية وهكذا حتى الوصول الى الحفرة الاخيرة بحيث يتم استبدال الـ Tip مع كل حفرة وذلك للمحافظة على التراكيز عند النقل ، بالتالي نحصل على تخفيف ثنائي لعينات المصل.

4. اضافة **25 مايكروليتر** من التخفيف الفيروسي الحاوي **4HAU** لكل حفرة في الطبق ما عدا حفر السيطرة.

5. يتم بلطف الضرب على حافات الطبق وذلك لتجانس محتوياتة ، ثم يغطى ويترك لمدة **30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة (22 – 25°م)**، ان الغرض من ذلك هو اعطاء الفرصة الكاملة لاحداث التفاعل بين الاجسام المضادة **Ab** الموجودة في المصول مع مستضد الفيروس **Ag**المضاف.

6. يضاف **25 مايكروليتر** من **1 %** عالق خلايا الدم الحمراء المعدة سابقا لكل حفر طبق المعايرة شاملة حفر السيطرة.

7. رج طبق المعايرة بشكل لطيف لاجراء التجانس لمكونات الحفر. ويغطى الطبق ويترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة **10 - 15 دقيقة** .

8. قراءة النتائج من خلال تعيين الحفر التي اظهرت ترسب لخلايا الدم.

ان حدوث الترسيب لخلايا الدم الحمراء تعني عدم وجود الفيروس بشكل حر وذلك نتيجة التفاعل الذي جرى مع الاجسام المضادة في عينة المصل وهي **نتيجة موجبة** ، والعكس هو تكون الشبكة يدل على عدم وجود الاجسام المضادة بشكل كاف لاحداث التفاعل وبقى الفيروس حرا في الوسط مما ادى الى حدوث حالة التلازن مع كريات الدم الحمراء في الحفرة وهي **نتيجة سالبة** . ان نقطة التغير بين تكون راسب خلايا الدم الحمراء و الغيمة او الشبكة يعرف بالـ **End Point** والذي يمثل **HI titer /ml** ، **وهو مقلوب اعلى تخفيف من المصل يثبط التلازن الدموي الفيروسي.**

ويمكن ان تستخدم هذه الطريقة في **تشخيص حالة المريض** ،ونحتاج في هذه الطريقة نموذجين من المريض، واحد اثناء الطور الحاد والاخر في مرحلة النقاهة . وتجرى التخافيف للعينة ثم يحسب **Titer** ،ثم يتم تطبيق المعادلة التالية لتشخيص حالة المريض :

Covalence phase titer/ Acute phase titer

> Or = 4 = Recent infection, < 4 = Immunity, if not =Not exposed