

علم المناعة

IMMUNOLOGY

المحاضرة التاسعة

د. أسامة مخزوم

الاختبارات المناعية

إن ارتباط ضد-مستضد هو أساس الاختبارات المناعية، وذلك بفضل نوعية هذا الارتباط المرتفعة جدا.

تطبيقات الاختبارات المناعية :

التحقق من الإصابة بعامل مرض عبر كشف أضداده النوعية في المصل.

متابعة تقدم المرض من خلال تغير عيار الأضداد.

التحقق من وجود أحد المستضدات مثل بروتين معين ضمن عينة أو نسيج ومعرفة تركيزه.

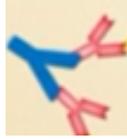
الاختبارات المناعية

عيار المصل: أعلى تمديد للمصل يعطي تفاعل إيجابي لارتباط ضد-مستضد.

أضداد متعددة النسيلة: أضداد مختلفة موجهة تجاه عدة محددات مستضدية للمستضد مشتقة من نسائل مختلفة.

أضداد وحيدة النسيلة: أضداد متماثلة تماما موجهة تجاه محدد مستضدي وحيد مشتقة من نسيطة واحدة من الخلايا البلازمية.

ضد الضد: هو ضد موجه تجاه القطعة **Fc** من الضد الأساسي.



اختبارات التراص AGGLUTINATION TEST

الأكثر شيوعا تعتمد على مبدأ تجمع وتكدس جزيئات كبيرة نتيجة تفاعل ضد-مستضد.

هنا المستضد يكون مثبتا على سطح جزيء كبير، وارتباط الضد به يؤدي لظهور حبيبات نتيجة التكدس تظهر عيانا «برغلة».

مثل المستضدات على سطح الكريات الحمر أو الجراثيم وهذا اسمه **تراص مباشر**.

أما إذا كان المستضد غير مثبت على جزيء كبير يمكن ربطه بجزيئات كبيرة خاملة (كجزيئات اللاتكس) أو بكريات حمر وهذا يسمى **تراص غير مباشر**.

تستخدم تفاعلات التراص للكشف عن ضد أو مستضد.

اختبار التراص المباشر

إما **تراص دموي** لمستضدات على سطح كريات حمر، أو **تراص جرثومي** لمستضدات على سطح جراثيم.

❖ التراص البكتيري :

تستخدم في هذه الاختبارات الجراثيم كحامل للمستضد المتوضع على سطحها. ترتبط الأضداد بالمستضدات على سطح الجراثيم مؤدية لحدوث تجمعات من الجراثيم يمكن رؤيتها بالعين المجردة. مثال: اختبار فيدال ورايت للكشف عن أضداد الحمى المالطية (جراثيم البروسيلا) أو أضداد الحمى التيفية (جراثيم السالمونيلا)..

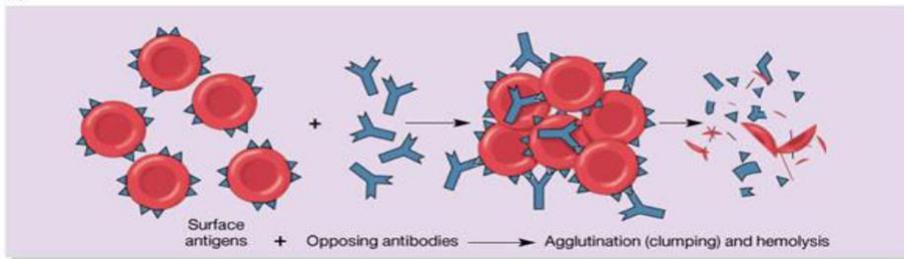
من خلال إجراء **عدة تمديدات** للمصل تكون النتيجة مثلا تراص عند تمديد ١/٨٠ أو عند ١/١٦٠. وإن التراص عند تمديد مصل ١/١٦٠ يعني الأضداد أعلى منها عند تمديد ١/٨٠ وهي قيمة تشخيصية.

اختبار التراص المباشر

التراص دموي يقسم لقسمين : أضداد كاملة أو أضداد غير كاملة.

• Complete Antibodies :

عبارة عن غلوبولينات مناعية من نمط IgM، ترتبط مع المحددات المستضدية على سطح الكريات الحمراء وتعرض تفاعل التراص مباشرة ويعزى السبب في ذلك إلى بنيتها الخماسية Pentameric. مثال: الأضداد المتشكلة ضد مستضدات الكريات الحمراء (تحديد الزمر الدموية).



اختبار التراص المباشر

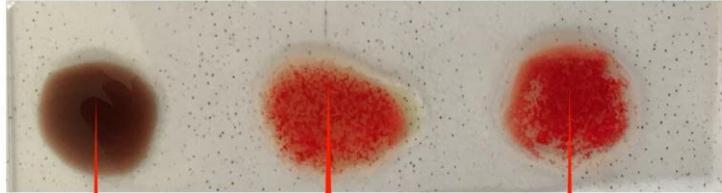
• Incomplete Antibodies:

عبارة عن غلوبولينات مناعية من نمط IgG، ترتبط مع المستضدات على سطح الكريات الحمر ولكنها لا تحرض تفاعل التراص مباشرة، نحتاج في هذه الحالة إضافة supplement (مادة مساعدة) وهي الألبومين أو محلول شاردي وهذا يساعد IgG على تشكيل جسور تسد الفجوة gap بين الكريات الدموية الحمراء وتؤدي إلى تراصها. مثال: الأضداد التي تتشكل ضد مستضد عامل الريزوس Rh+ وهو Anti Rh+.

أو ممكن إضافة ضد الضد كما في اختبار كومبس غير المباشر.

تراص دموي مباشر

BLOOD GROUP DETERMINATION



A Remain Same as Earlier B Shows Agglutination D Shows Agglutination so its +

Final Result- The Blood Group is B+ (B Positive)

اختبار التراص غير المباشر

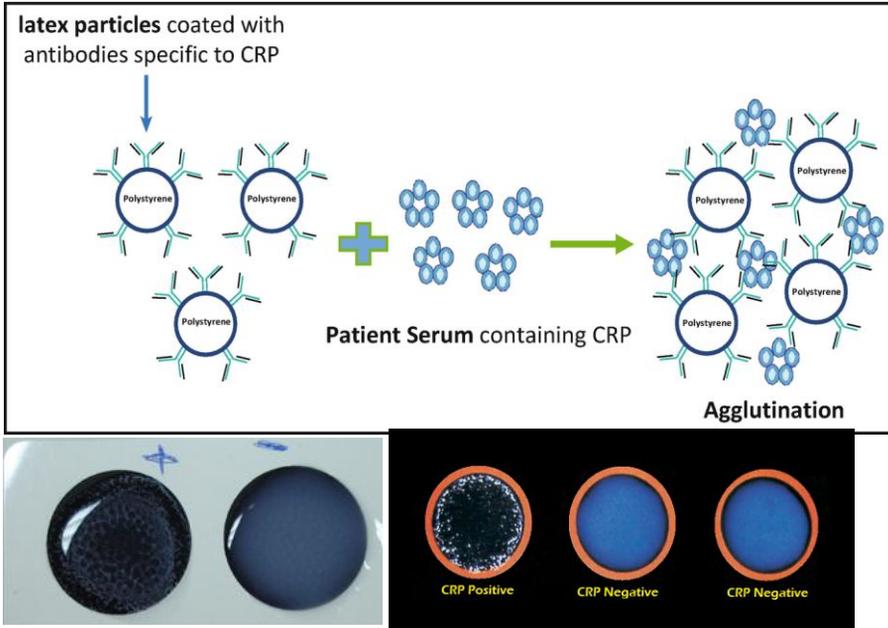
هنا نستخدم وسيط ليحمل عليه المستضدات أو الأضداد.

ممكن كريات حمر يسمى تراص دموي غير مباشر مثل تفاعلات الكشف عن أضداد التوكسوبلازما و الكيسة المائية.

أو جزيئات لاتكس خاملة مثل تفاعلات الكشف عن بروتين CRP في المصل.

حيث نربط أضداد الـ CRP مع حبيبات اللاتكس بالبده ثم نمزج هذه الحبيبات مع مصل المريض، وفي حال احتواء المصل على بروتين CRP سيحصل تراص.

أضداد CRP مثبتة على لاتكس



اختبارات أضداد الغلوبولين اختبارات كومبس

تستخدم للكشف عن وجود انحلال دموي.

اختبار كومبس المباشر:

نكشف فيه وجود أضداد مغلقة سطح الكريات الحمر.

في حال الانحلال تكون الكريات الحمر مغلقة بمعقد ضد-مستضد.

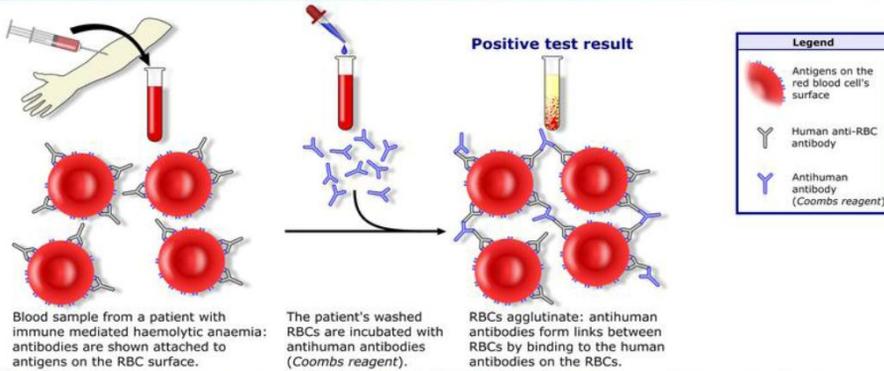
نأخذ عينة دم ونضيف لها كاشف كومبس يحوي محلول ضد الضد، مما يؤدي لتراص هذه الكريات في حالة وجود الأضداد على سطحها «أي معقد ضد-مستضد».

يستخدم لتشخيص فاقات الدم الانحلالية مثل انحلال الدم المناعي الذاتي أو انحلال الدم المسبب بالأدوية أو الداء الانحلالي الولادي (عدم توافق RH).

ضد الضد هو ضد موجه تجاه القطعة FC من الضد الأساسي.

تفاعل كومبس المباشر

Direct Coombs test / Direct antiglobulin test



اختبارات أضداد الغلوبولين اختبارات كومبس

اختبار كومبس غير المباشر:

نكشف فيه وجود أضداد (IgG) في المصل لشخص أول ممكن أن ترتبط مع المستضدات على سطح الكريات الحمر لشخص آخر وتتسبب بحلها.

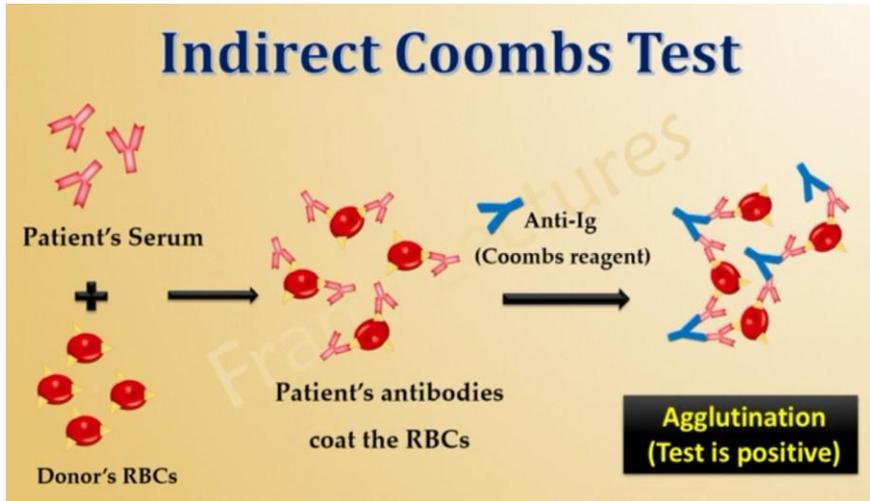
نأخذ عينة مصل من أول شخص ونمزجها مع عينة دم من ثاني شخص.

في حال وجود أضداد في مصل الأول سترتبط على سطح الكريات الحمر للشخص الثاني (لن ترتص لأنها من نوع IgG).

نضيف لها كاشف كومبس يحوي محلول ضد الضد، مما يؤدي لتراص هذه الكريات في حالة وجود الأضداد على سطحها، في حين لن يحدث ترصص في حال عدم وجود هذه الأضداد.

يستخدم لتحديد امكانية نقل الدم بين شخصين من ناحية الريزوس، أو لكشف وجود أضداد لدى الأم ممكن أن تسبب بحل كريات جنينها.

تفاعل كومبس غير المباشر



اختبار التآلق المناعي

بعض المواد عندما تتعرض لضوء بطول موجة معين مثل أشعة UV، تمتص بعض الضوء وتتألق بلون مرئي.

صبغ الفلوريسينين هو الأشهر يتألق بطول موجة ٤٥٠-٥٠٠ نم ويعطي لون أخضر.

مجهر التآلق :

فلتر يعطي ضوء بطول موجة معين، يسقط على العينة الموسومة بالفلوريسينين، تتعرض وتتألق، وبالتالي نرى العينة بلون أخضر.

اختبار التآلق المناعي

اختبار التآلق المناعي المباشر:

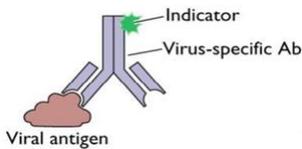
نثبت العينة النسيجية بالميتانول، ونزيد نفاذيتها لتسهيل عبور الأضداد.

نضيف ضد الموسوم بالفلوروسينين الموجه تجاه المستضد النوعي، ففي حال وجود المستضد الهدف سيرتبط به، وإلا سيبقى حراً.

نغسل لإزالة الأضداد الموسومة غير المرتبطة.

وجود التآلق تحت مجهر الفلورة دليل على وجود المستضد.

الطريقة غير كمية.



اختبار التآلق المناعي

اختبار التآلق المناعي غير المباشر:

نثبت العينة النسيجية بالميتانول، ونزيد نفاذيتها لتسهيل عبور الأضداد. نضيف ضد النوعي للمستضد الهدف، ففي حال وجود المستضد الهدف سيرتبط به، وإلا سيقى حرا.

نغسل لإزالة الأضداد غير المرتبطة.

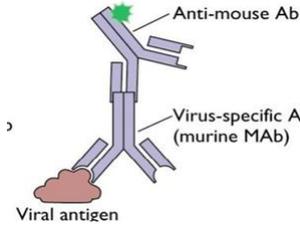
نضيف ضد الضد الموسوم بالفلوروسنين، ففي حال وجود الضد مثبتا فسيرتبط به.

نغسل لإزالة الأضداد الموسومة غير المرتبطة.

وجود التآلق تحت مجهر الفلورة دليل على وجود المستضد.

الطريقة غير كمية.

(وسم ضد الضد هو دائما أسهل من وسم الضد النوعي)



ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

اختبار مقياسة الممتز المناعي المرتبط بالأنزيم

هي تقنية مخبرية مناعية تعتمد على حدوث تفاعل ضد - مستضد، يُستدل عليه بتفاعل أنزيم معين مع ركيزته معطيا مركب ذو لون معين. تُقاس شدة هذا اللون بواسطة مقياس الطيف الضوئي و تتناسب طردا مع تركيز الضد أو المستضد المراد الكشف عنه في العينة المدروسة (غالبا مصل المريض).

يوجد أنواع من هذه التقنية:

غير مباشرة Indirect ELISA (للتحري عن الأضداد).

مباشرة Direct ELISA (للتحري عن المستضدات).

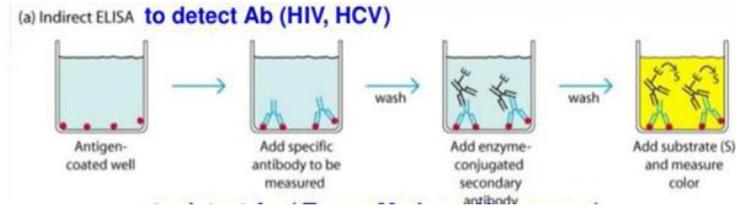
Sandwich ELISA (للتحري عن المستضدات).

Competitive ELISA (للتحري عن المستضدات).

INDIRECT ELISA

• الاليزا غير مباشرة Indirect ELISA (للتحري عن الأضداد).

تعتمد على وضع المستضدات المعطلة على سطح آبار الصفيحة الصلبة (المعايرة) ثم إضافة المصل الحاوي على الأضداد المراد الكشف عنها. يتم الحضان حتى يحدث تفاعل ضد مستضد يليها عملية الغسل للتخلص من الفائض. يتم إضافة الضد الثانوي (ضد الغلوبولين البشري) الموسوم بأنزيم فيرتبط مع الغلوبولين (الضد) البشري يليها الحضان ثم الغسل. تُضاف الركازة التي يتغير لونها عندما تتفاعل مع الأنزيم. تتناسب شدة اللون طردا مع تركيز الأضداد المراد البحث عنها في العينة.



DIRECT ELISA

تهدف للكشف عن المستضدات.

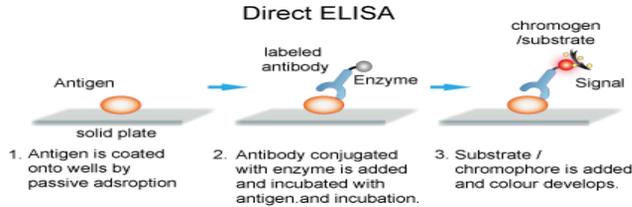
نضيف المصل الذي يحتمل احتواؤه على المستضد الهدف على سطح آبار الصفيحة الصلبة. هذا المستضد سوف يتثبت بالادمصاص ضمن الآبار لذا **يشترط لهذه الطريقة مستضد بوزن جزيئي مرتفع.**

نغسل لإزالة المستضدات الأخرى.

نضيف ضد مرتبط بأنزيم فيرتبط الضد بالمستضد.

نغسل لإزالة الأضداد غير المرتبطة.

نضيف ركازة الأنزيم التي تعطي لونا في حال وجود الارتباط يتناسب مع كمية المستضد.



مزايا وعيوب

تتميز:

قلة المراحل وبالتالي قلة الأخطاء.

يعيبها:

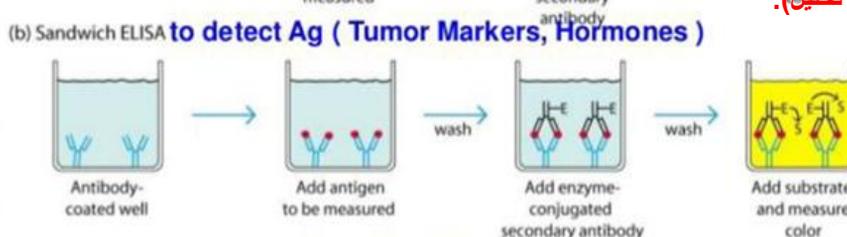
ضعف الإشارة الناتجة.

نحتاج لكل تحليل ضد نوعي موسوم بأنزيم.

SANDWICH ELISA

تعتمد على وضع الأضداد النوعية للمستضد المراد البحث عنه على سطح آبار الصفيحة الصلبة (المعايرة) ثم إضافة المصل الحاوي على المستضد المراد الكشف عنها. يتم الحضان حتى يحدث تفاعل ضد مستضد يليها عملية الغسل للتخلص من الفائض. يتم إضافة الضد الثانوي الموسوم بأنزيم فيرتبط مع المستضد يليها الحضان ثم الغسل. تُضاف الركيزة التي يتغير لونها عندما تتفاعل مع الأنزيم. تتناسب شدة اللون طردا مع تركيز المستضد المراد البحث عنه في العينة.

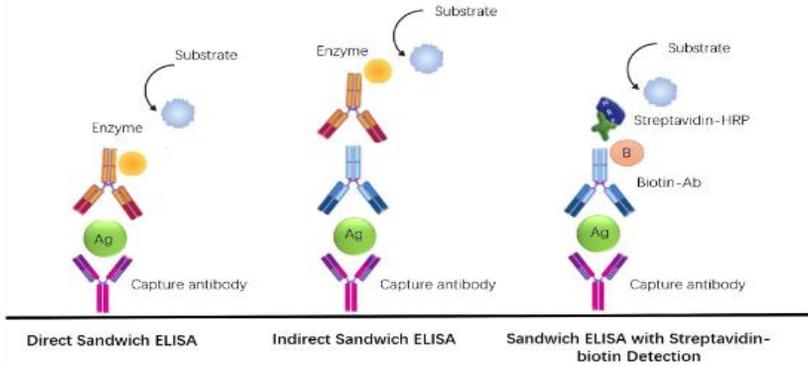
يشترط وجود محددين مستضديين على الأقل (ونحتاج ضد نوعي موسوم لكل تحليل).



SANDWICH ELISA TYPES

لحل موضوع وسم الضد النوعي بالإنزيم تستخدم الساندويش غير المباشرة باستخدام ضد الضد الموسوم.

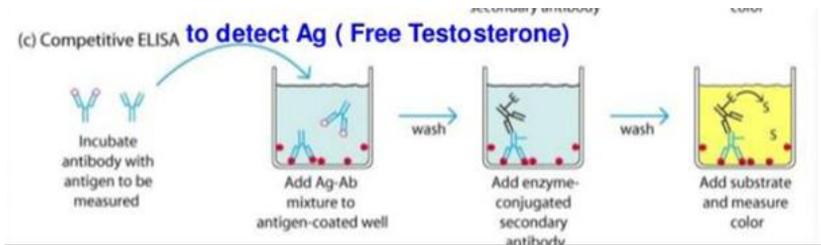
البيوتين الواسم للضد والستربتافيدين المربوط بالإنزيم خطوة لتضخيم الإشارة.



COMPETITIVE ELISA

تعتمد على مزج الأضداد النوعية مع العينة الحاوية على المستضد المراد البحث عنه و الحضن . ثم يضاف المزيج على سطح آبار الصفيحة الصلبة (المعايرة) المغلفة بالمستضدات المراد البحث عنها ، يتم الحضن و الغسل ثم إضافة الضد الثانوي (ضد الغلوبولين البشري) الموسوم بأنزيم فيرتبط مع الأضداد يليها الحضن ثم الغسل. تُضاف الركيزة التي يتغير لونها عندما تتفاعل مع الأنزيم. تتناسب شدة اللون عكسا مع تركيز المستضد المراد البحث عنه في العينة.

نلجأ لها عندما لا يكون مرتفع الوزن الجزيئي أو لا يوجد أكثر من محدد مستضدي واحد.



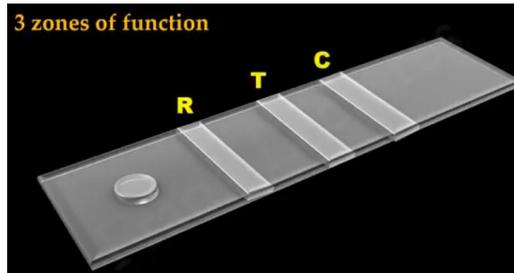
مزايا ELISA

- حساسة للكشف عن تراكيز قليلة جدا.
- تستخدم كواشف قليلة.
- طريقة كمية
- يمكن الكشف عن الضد أو المستضد.
- لا تستخدم مواد مشعة.

كاشف الحمل

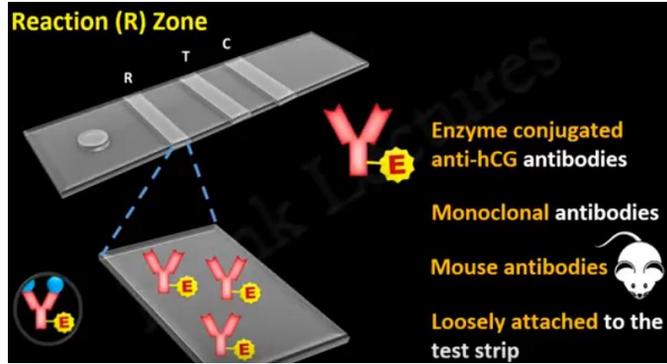
يكشف مستضد عبارة عن هرمون HCG وهو هرمون يفرز من المشيمة بعد الإخصاب.

الكاشف عبارة عن ٣ مناطق C-T-R



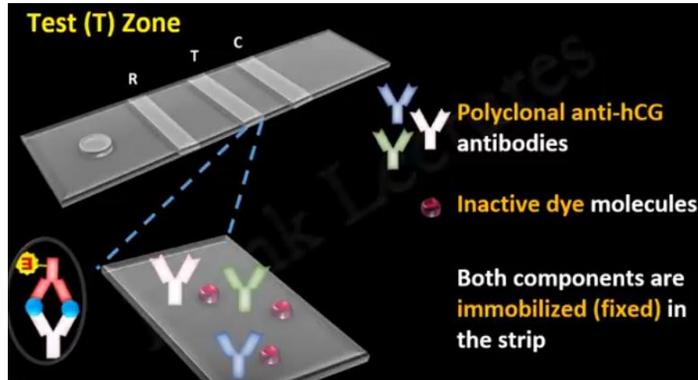
كاشف الحمل

اول منطقة R تحوي اعداد وحيدة النسيلة مشتقة من الفئران تجاه مستضد HCG موسومة بانزيم، وهذه الأعداد غير مثبتة بقوة بمكانها.



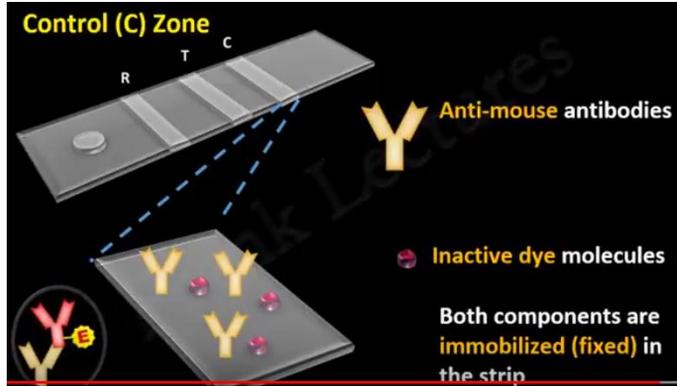
كاشف الحمل

ثاني منطقة هي منطقة الاختبار T تحوي اعداد متعددة النسيلة تجاه HCG مع صبغة غير فعالة مثبتين بقوة.

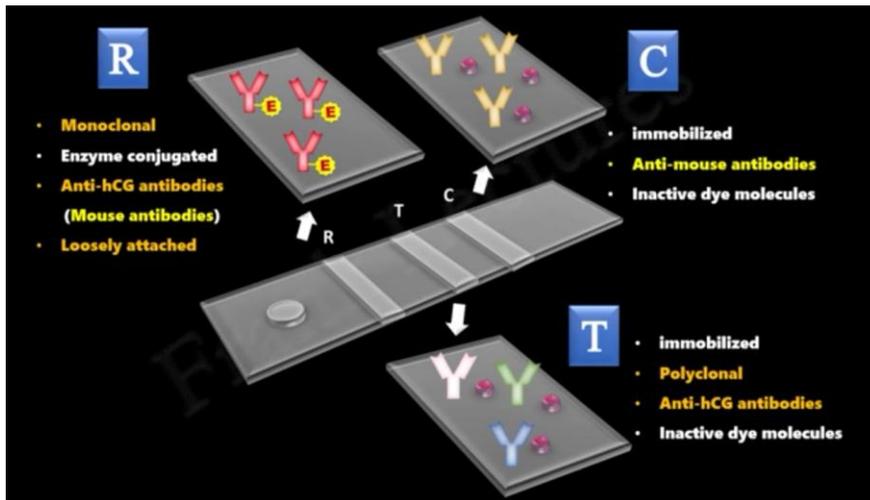


كاشف الحمل

ثالث منطقة هي منطقة الشاهد C تحوي ضد تجاه أضداد المنطقة R «ضد الضد» مع صبغة غير فعالة مثبتين بقوة.



كاشف الحمل



كاشف الحمل

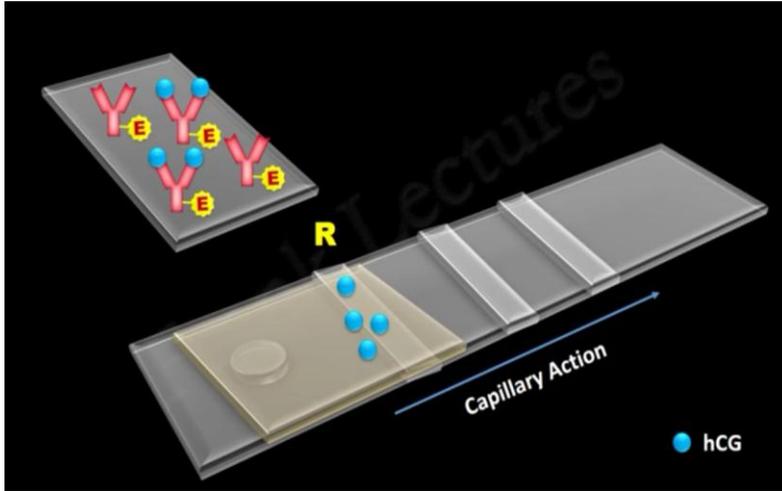
نضع نقطة البول التي تحوي مستضد HCG في حال الحمل إيجابي.
 المستضد سوف يرتبط بأضداد المنطقة R، والتي ستتحرك نتيجة دفع السائل للمناطق الأخرى لأنها غير مثبتة كفاية.
 تصل معقد ضد موسوم بانزيم مستضد إلى المنطقة T وسترتبط أضداد المنطقة T بهذا المستضد المربوط بالضد الموسوم وستشكل معقد مثل معقد ساندوش إيزا «ضد-مستضد-ضد موسوم».
 سيقوم الضد الموسوم بتفعيل الصبغة واعطاء لون في المنطقة T يدل على إيجابية الحمل.

تواصل أضداد المنطقة R مسيرتها لتصل للمنطقة C وسترتبط مع الضد الموجه تجاهها « ضد موسوم- ضد الضد» وستفعل الصبغة وتعطي لونا دليلا على سلامة وصحة الكاشف.

كاشف الحمل

في حال الحمل سلبي لن يوجد مستضد HCG في البول.
 أضداد المنطقة R ستتحرك نتيجة دفع السائل للمناطق الأخرى لأنها غير مثبتة كفاية.
 تصل أضداد المنطقة R إلى المنطقة T ولن يحصل أي ارتباط لغياب المستضد وبالتالي لن يتشكل أي لون وهذا دليل سلبي الحمل.
 تواصل أضداد المنطقة R مسيرتها لتصل للمنطقة C وسترتبط مع الضد الموجه تجاهها « ضد موسوم-ضد الضد» وستفعل الصبغة وتعطي لونا دليلا على سلامة وصحة الكاشف.

كاشف الحمل



كاشف الحمل

