Lab -9

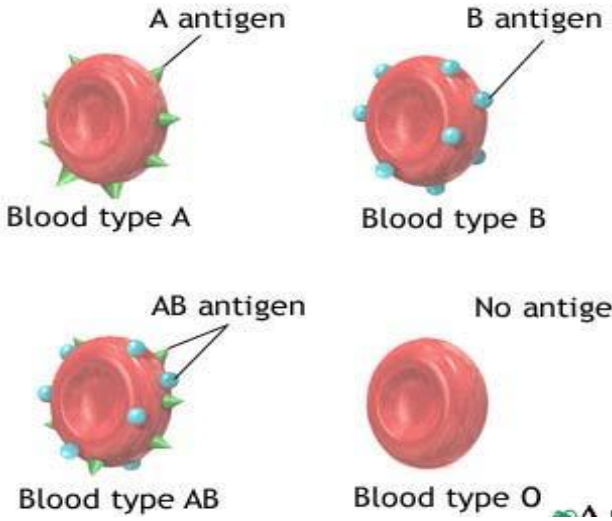
تطبيقات تفاعلات التلازن المباشر Direct Agglutination

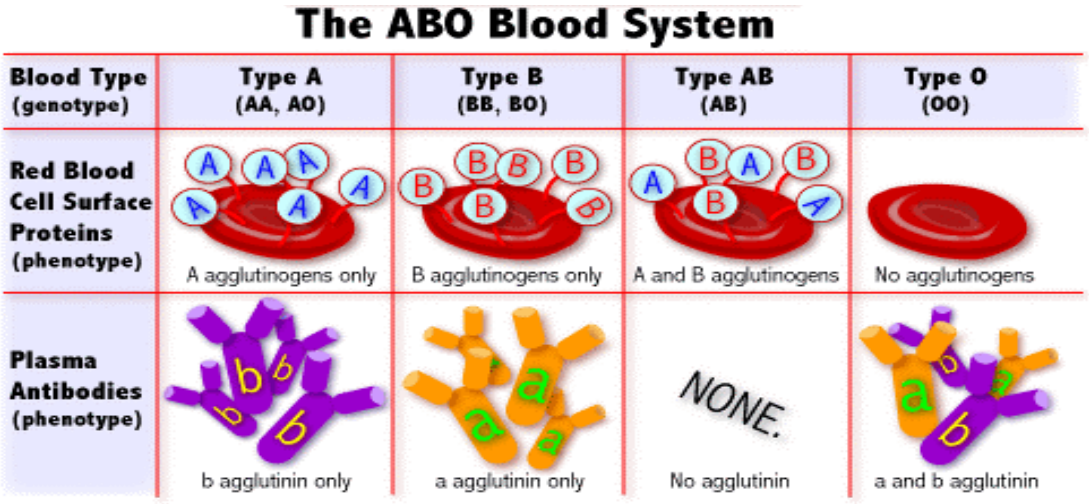
اختبار مجاميع الدم Blood group

هـــو اختبـــار يســـتخدم لتحديـــد فصـــيلة الـــدم للأشـــخاص بحســـب أنـــواع المستضـــدات antigens (ABO and Rh) الموجودة على سطح كريات الدم الحمر RBCs، وهو من الاختبارات المهمة جدا للأشخاص الواهبين للدم Donors والمستلمين Recipient كذلك لتحديد فصيلة الدم بين الأمهات والأطفال ألحديثي الولادة.

نظام مجاميع الدم ABO System

يقسم الدم إلى فصائل ***اعتمادا على وجود أو عدم وجود مستضدات (A or B) antigen*** ، **إذ يحمل سطح الغشاء لكرية الدم الحمراء نمط A على مستضدات A antigens ، في حين يحمل الغشاء السطحي لكرية الدم الحمراء نمط B على مستضدات B antigens ، أما كريات الدم الحمراء نمط AB فتحمل على غشائها السطحي المستضدات A and B antigens ، في حين كريات الدم الحمر نمط O فلا تحمل على سطحها أي نوع من المستضدات.**





❖ Blood group AB (universal recipients)

هو الشخص الذي يحمل فصيلة الدم AB والذي يستطيع استلام الدم من جميع الفصائل الأخرى بسبب عدم امتلاكه لأجسام مضادة في المصل ضد مستضدات A و B

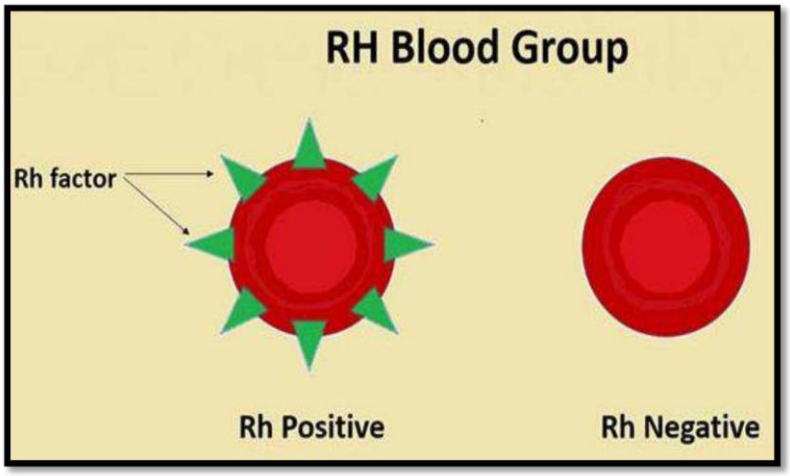
❖ Blood group O (universal donors)

هو الشخص الذي يحمل فصيلة الدم O والذي يستطيع إعطاء الدم إلى جميع الفصائل الأخرى بسبب عدم وجود مستضدات A و B على سح كريات الدم الحمراء الخاصة به

نظام العامل الريسي Rh Factors

يعد العامل الريسي من أنظمة الدم المهمة اكتشف من قبل العالمان الألمانيان Landsteiner and Wiener حيث لاحظ كل من العالمين تكون أجسام مضادة في دم الأرنب عند حقنه بدم نوع من القرود وهو قرد الريس (monkey rhesus) ، بإمكان هذه الأجسام المضادة أن تحدث تجلطا في دم القرد وعليه ***فان RBCs لهذا القرد يحمل مستضد خاص يسمى Rh-Ags أو D-Ags*** وقد وجد إن غالبية البشر 85% منهم يملكون هذا المستضد في دمهم أي إن دمهم من نوع Rh+ وعند انعدام هذا المستضد في دم بعض الأشخاص يقال إن دمهم من نوع Rh- ونسبتهم 15%.

■ **نظام Rh يعتمد على وجود بروتين يسمى بالمستضد D فعند وجوده على سطح كريات الدم الحمر تعطي فصيلة الدم نتيجة موجبة Rh^{+ve}، وفي حال عدم وجوده تعطي نتيجة سالبة Rh^{-ve} كما موضح في** الشكل التالي:



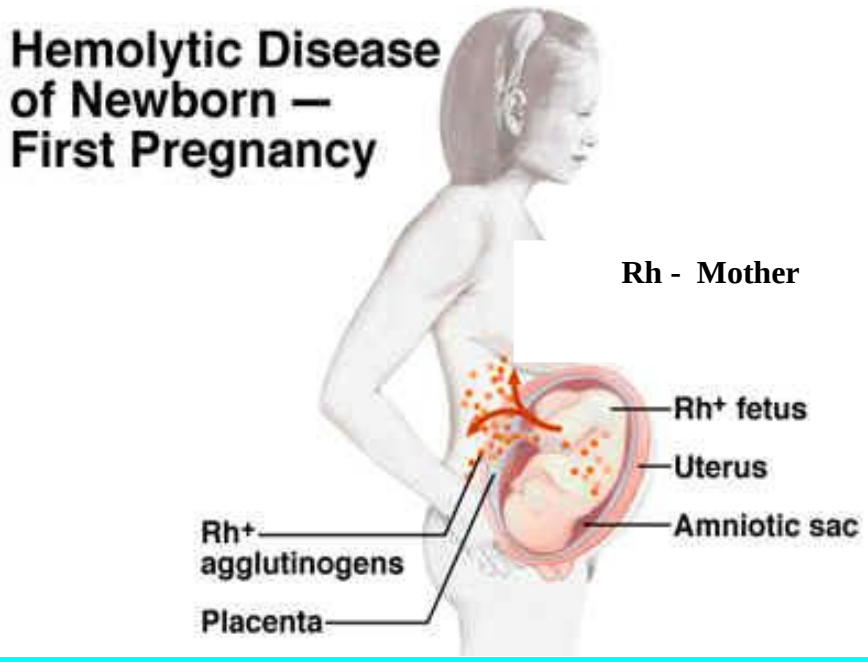
شكل (2): نظام Rh

إن دم الأشخاص من نوع Rh^- لا يحوي ال Rh^-Ags وبالتالي فان مصل دمهم يخلو من الأجسام المضادة لل Rh غير إن بإمكان هولاء الأشخاص إنتاج أجساما مضادة خاصة بهذا العامل إذا نقل إليهم دم من أفراد +Rh، إذ تؤدي عملية نقل الدم للمرة الثانية من شخص +Rh إلى أخر −Rh سبق وتكون في دمه اجساما مضادة للعامل Rh إلى تجلط الدم وبالتالي موت المستلم

يحدث **عدم التوافق في العامل الريسي Rh incompatibility :-** في الزيجات التي يكون فيها الزوج موجب العامل +Rh والزوجة سالبة العامل −Rh (دمها لا يحتوي على المستضد الريسي) والجنين +Rh ، عند حدوث تشقق في المشيمة أو عند فصلها عن جدار الرحم خلال عملية الولادة الأولى يحدث نزيف يسمح بانتقال الدم من الجنين إلى الأم التي يبدأ دمها بتكوين اجساما مضادة لتنتقل هذه الأجسام المضادة إلى الجنين إذا كان العيب مشيميا وتعمل على تدمير كريات الدم الحمراء الحاملة للمستضد او ان تبقى في دم الأم ليظهر تأثيرها على الحمل الثاني وقد لا تحدث الوفاة بالنسبة للطفل الأول لان تراكم الأجسام المضادة في دم الأم يكون بطيئا فيتأثر بذلك الجنين التالي.

تؤدي تلك الحالة إلى موت الجنين لان الشعيرات الدموية في الكبد تنسد ببقايا ال RBCs المتجلطة مما يسبب مرض اليرقان وقد تحدث الوفاة قبل الولادة او بعدها مباشرة إذا لم تتخذ الإجراءات المناسبة حالا وتسمى هذه الحال Hemolytic Disease of Neonates (HDN)

وجد العالم كلارك إن حقن الأم عقب الولادة مباشرة بمادة مضادة Anti−Rh عقب الولادة يساعدها على التخلص من أي دم قد تسرب إليها من الجنين وبذلك لا ينتج دمهم أجساما مضادة بمعنى اخر (يوقف إنتاج الأجسام المضادة لعامل Rh) ويزول الخطر في الحمل الثاني

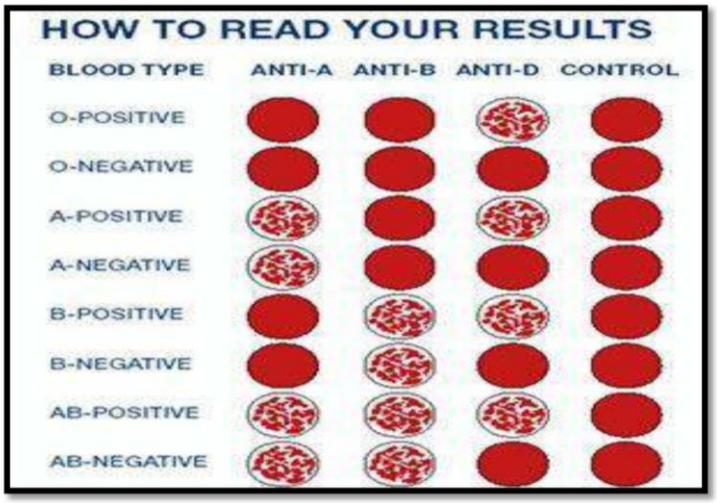


الأشخاص سالبي العامل الريسي Rh– ينتجون أجساماً مضادة له إذا ما تعرضوا له في إحدى الحالتين التاليتين أو كليتهما :-

1- نقل الدم ، كأن ينقل دم شخص موجب العامل الريسي إلى دم شخص سالب العامل الريسي.

2- تبادل الدم بين الأم والجنين ، كأن يكون دم الأم من نوع (Rh–) ودم الأب من نوع (Rh+) والجنين (Rh+).

■ تقسم فصائل الدم اعتمادا على نظام ABO و Rh ، اذا **يمثل التحبب الظاهر في الشريحة او االحفر** على حدوث التلازن



المواد المستعملة :

1- شريحة زجاجية slide او طبق خاص يحوي على حفر

2- عدة تشخيصية ABO kit حاوي على امصال تتضمن اجساما مضادة Anti D, Anti B, Anti A

3- عيدان للتحريك

4- لانسيتة او ابرة وخز Lancets

5- قطن طبي وكحول للتعقيم.

طريقة العمل:

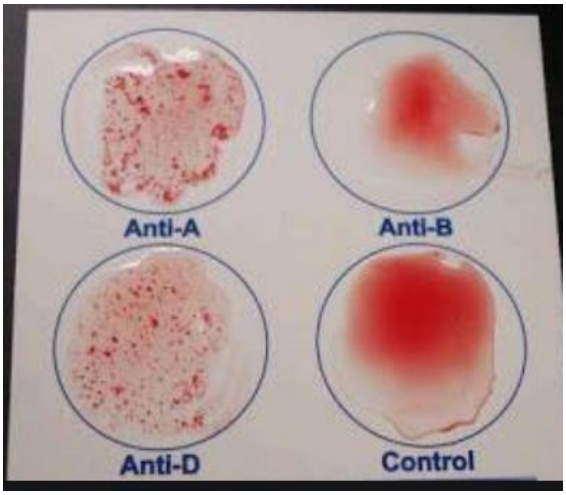
1- يتم تعقيم طرف اصبع الابهام ثم عمل وخزة فيه للحصول على قطرة دم.

2- يتم وضع 3 قطرات دم بحيث تكون متباعدة على السلايد او في الحفر.

3- إضافة Anti A على إحدى القطرات واضافة Anti B على القطرة الثانية وعلى القطرة الثالثة Anti D .

4- تمزج القطرات جيداً كلاً على حده بواسطة عود خشبي نظيف في حالة استخدام الطبق يتم تحريكة بعد المزج بالعيدان

5- يلاحظ حدوث (Agglutination) في القطرات من عدمه وبعد ذلك تحدد الفصيلة بعد مرور دقيقتين من التقليب كما في الشكل السابق او الشكل الاتي.



تطبيقات تفاعلات التلازن غير المباشر Indirect Agglutination

اولا : اختبار بروتين C التّفاعليّ / المفاعل C-Reactive Protein (CRP)

هو عبارة عن بروتين يتم انتاجه في الكبد استجابة لوجود التهاب في اجسم، اكتشف هذا البروتين من قبل العالمين Tillet and Francis في العام 1930 .

مميزات بروتين CRP

1- هو عبارة عن بروتين غير طبيعي يوجد في مصل الأشخاص المصابين بالحالات الحادة Acute لمختلف الأمراض الحمية Febrile diseases و يعد دليلا على وجود التهاب حاد , ولا يوجد هذا البروتين في مصل الأشخاص الأصحاء.

2- يتم إنتاجه في الكبد.

3- غير مستقر حراريا thermolabile.

4- لا يمر من خلال المشيمة.

5- يزداد هذا البروتين بدرجة سريعة بعد الإصابة ويصل إلى أعلى مستوى له بعد 14-16 ساعة بعد هجوم المرض ويختفي بعد الشفاء من الحالة المرضية .

مبدأ الفحص Test principle :

مبدا عمل هذا الاختبار هو التلازن غير المباشر اذ يعتمد هذا الفحص على اعتبار هذا البروتين هو مستضد antigen ، و بإضافة الأجسام المضادة antibody المرتبطة بجزيئات اللاتكس يحدث التلازن في حال وجود بروتين C التفاعلي في المصل وحسب المعادلة التالية :

(Latex particles coated with anti- CRP antibody (Ab) + CRP antigen (Ag) in the serum)

طريقة العمل Procedure :

1- توضع جميع مواد العدة التشخيصية kit وعينات المصل في درجة حرارة الغرفة

2- تنقل 50 مايكروليتر من محلول السيطرة الموجب positive control و تنقل 50 مايكروليتر من محلول السيطرة السالب negative control على طرفي الشريحة الزجاجية

3- تنقل 50 مايكروليتر من مصل الشخص المريض وتوضع على وسط الشريحة (الدائرة المخصصة لها)

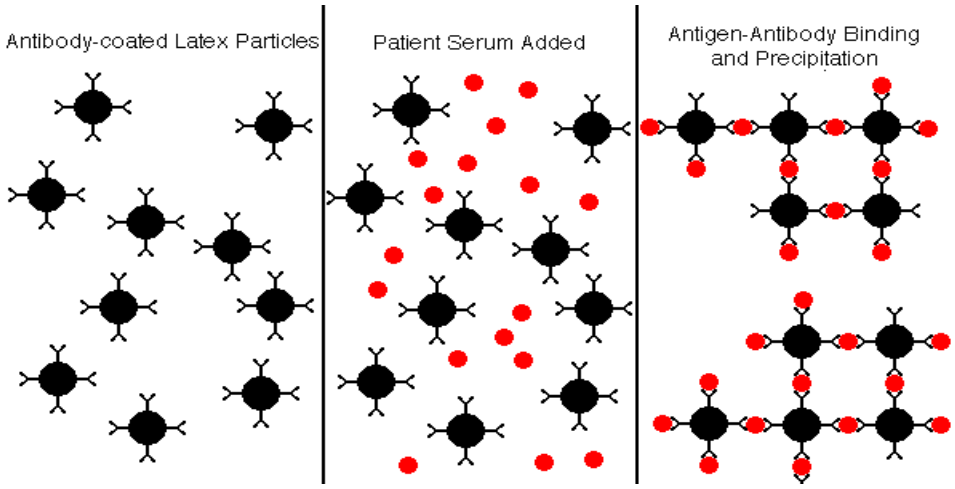
4- يتم رج كاشف اللاتكس (Latex particles coated with anti-CRP antibody) ثم توضع قطرة باستخدام القطارة dropper من هذا الكاشف على قطرة المصل المراد فحصها

5- امزج القطرات جيدا باستخدام أعواد نبيذه مع التأكيد على إن يكون الخليط ضمن دائرة الشريحة

6- بلطف وبانتظام حرك الشريحة حركة دائرية لمدة دقيقتين اما باليدين او باستخدام جهاز الهزاز Shaker بعد ذلك يتم ملاحظة إذا ما كان هناك تحبب يدل على نتيجة موجبة أو عدم وجود تحبب والذي يدل على نتيجة سالبة .

عند مزج الاجسام المضادة المرتبطة بجزيئات اللاتكس مع مصل المريض وبعد التحريك، في حالة حدوث التلازن agglutination فذلك يدل على إن الفحص موجب (+) ، أما عند عدم ظهور التحبب أو التلازن فذلك يدل على إن الفحص (-)

❖ **يرجى مشاهدة الفيديو على الرابط التالي لشرح اجراء الاختبار** https://youtu.be/xfvdGHx3U_s



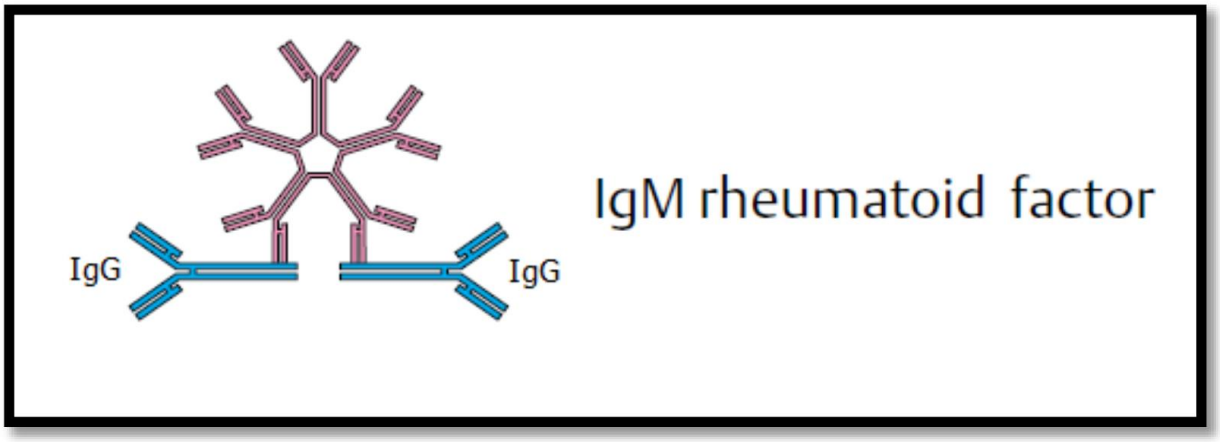
ملاحظة :النتيجة الموجبة للفحص تدل على وجود هذا البروتين وبالتالي وجود الالتهاب لكن لا يكشف عن المسبب المرضي للالتهاب

ثانيا : اختبار العامل الرثوي Rheumatoid Factor (RF)

هي الاجسام المضادة الذاتية Autoantibodies (من نوع IgM غالبا واحيانا IgA, IgG) والتي القابلية على الارتباط مع الأجسام المضادة الأخرى اذ ترتبط تلك الاجسام المضادة او العامل الرثوي RF مع الاجسام المضادة نوع IgG في منطقة Fc portion ونتيجة لهذا الاتباط تتكون معقدات مناعية immune complex التي تودي الى حدوث الاصابة. يستخدم هذا الاختبار لتشخيص مرض التهاب المفاصل الرثوي (Rheumatoid Arthritis) الذي يعد احد الامراض المناعية المهمة ، النسب

النسبة الطبيعية للعامل الرثواني هي اقل من 14 IU/ml.

سبب ظهور الأعراض المرضية يعود إلى التفاعل الذي يحصل بين العامل الرثوي (الأجسام المضادة الذاتية) بالأجسام المضادة من صنف IgG ومن الموقع المتبلور Fc مما يؤدي إلى تكوين معقد مناعي immune complex الذي يؤدي إلى تنشيط نظام المتمم Complement مما يؤدي إلى تجمع الخلايا في منطقة التفاعل مؤدية إلى ظهور الحالة الالتهابية وتكون عموما في منطقة إل synovium حيث تتجمع الخلايا الالتهابية granulocytes and monocytes مؤدية إلى تكون الوسادة الأسفنجية في نهاية العظم حيث تعمل على تأكل نهايات العظم بالتالي حدوث الألم عند حركة المفصل.



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

مبدأ الفحص Principle of the method :

يعتمد مبدأ الفحص على التفاعل الذي يحصل ما بين الكلوبيولين المناعي البشري human immunoglobulin الجسم المضاد (IgG) المغطى بجزيئات اللاتكس latex particles مع مصل المريض الحاوي على العامل الرثوي RF (IgM) في المصل بسبب التراص غير المباشر لجزيئات اللاتكس المحسسة .

طريقة العمل Procedure :

7- توضع جميع مواد العدة التشخيصية kit وعينات المصل في درجة حرارة الغرفة

8- تنقل 50 مايكروليتر من محلول السيطرة الموجب positive control و تنقل 50 مايكروليتر من محلول السيطرة السالب negative control على طرفي الشريحة الزجاجية

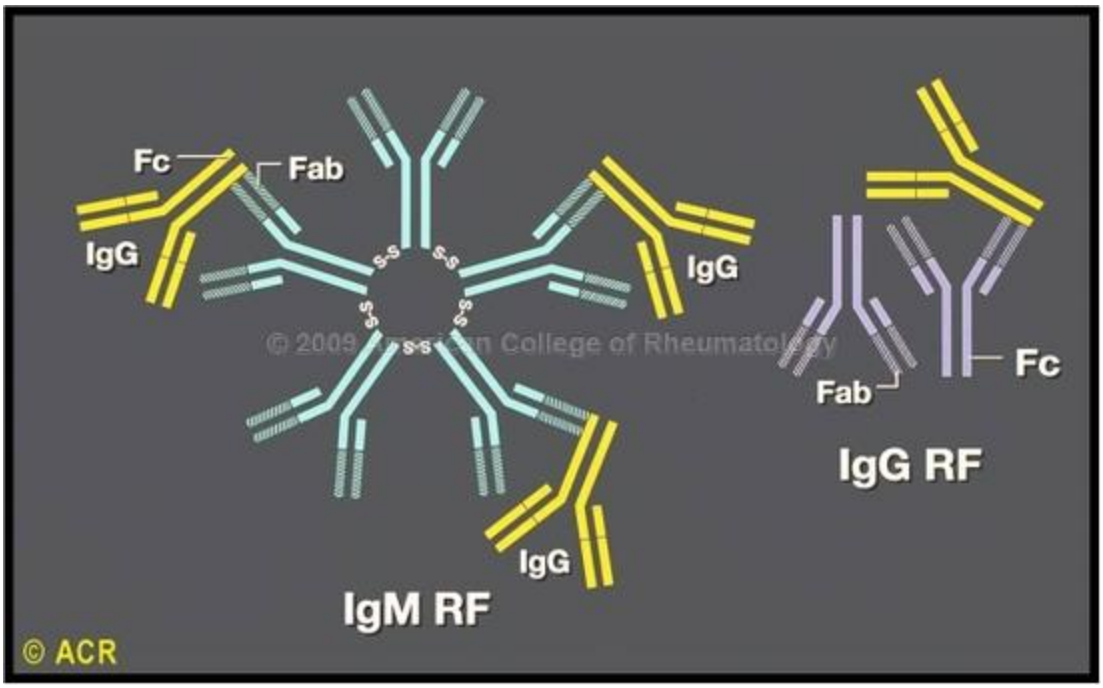
9- تنقل 50 مايكروليتر من مصل الشخص المريض وتوضع على وسط الشريحة (الدائرة المخصصة لها)

10- يتم رج كاشف اللاتكس (الأجسام المضادة IgG المرتبطة بدقائق اللاتكس) ثم توضع قطرة باستخدام القطارة dropper من هذا الكاشف على قطرة المصل المراد فحصها

11- امزج القطرات جيدا باستخدام أعواد نبيذه مع التأكيد على إن يكون الخليط ضمن دائرة الشريحة

12- بلطف وبانتظام حرك الشريحة حركة دائرية لمدة دقيقتين اما باليدين او باستخدام جهاز الهزاز Shaker بعد ذلك يتم ملاحظة إذا ما كان هناك تحبب يدل على نتيجة موجبة أو عدم وجود تحبب والذي يدل على نتيجة سالبة .

❖ **يرجى مشاهدة الفيديو على الرابط التالي لشرح اجراء الاختبار** https://youtu.be/vXaMGklC5HU


Fc
Fab
IgG
IgG
IgG
IgM RF
Fab
Fc
IgG RF
© ACR