Lab -12

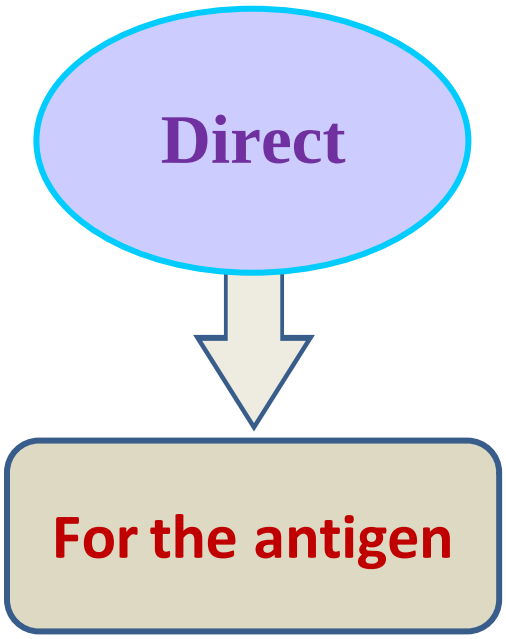
التفاعلات المناعية

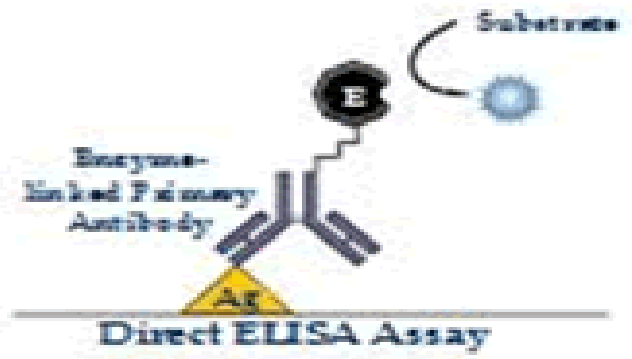
ويقصد بها تفاعل الأجسام المضادة مع المستضدات الخاصة بها لتكوين المعقدات المناعية (complex Ag-Ab) .

ثالثا: اختبار الاليزا أو اختبار مقياسة الممتز المناعي المرتبط بالانزيم Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

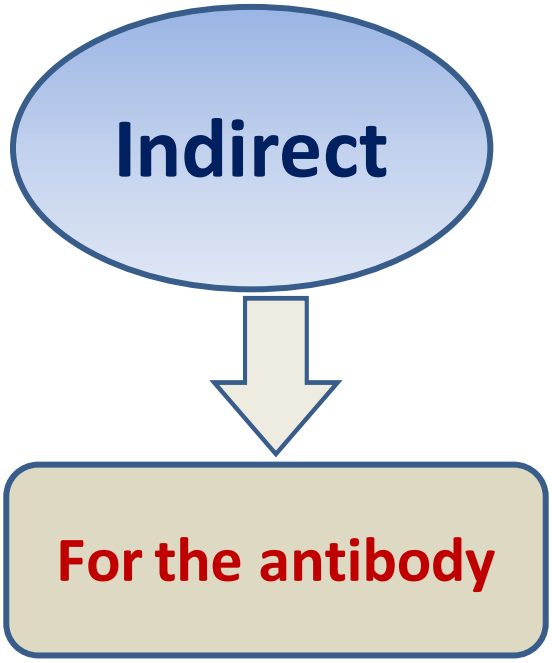
اختبار يستخدم على نطاق واسع بسب كونه عالي الحساسية extremely sensitive كما ان له القابلية على تحليل عدد كبير من العينات samples بسرعة مستخدما عينة ومواد متفاعلة قليلة جدا وهناك نوعان من هذا الاختبار وهما:

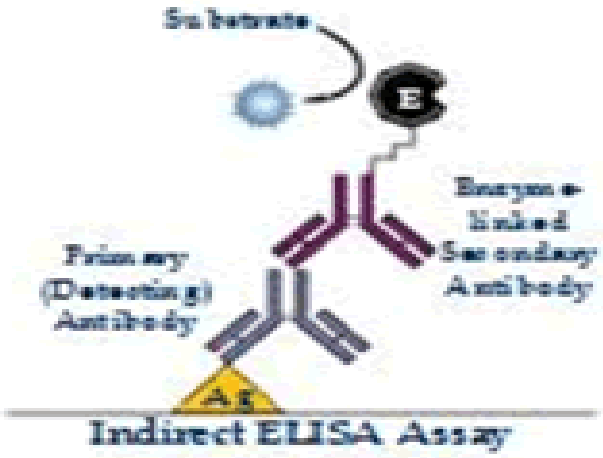
1- **الإليزا المباشرة Direct ELIZA :** وفيها يتم استخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة monoclonal antibodies للكشف عن وجود **المستضد antigen** في العينة





2- **الإليزا غير المباشرة Indirect ELIZA** : وهي النوع الثاني وفيها يتم الكشف عن **وجود الأجسام المضادة**.

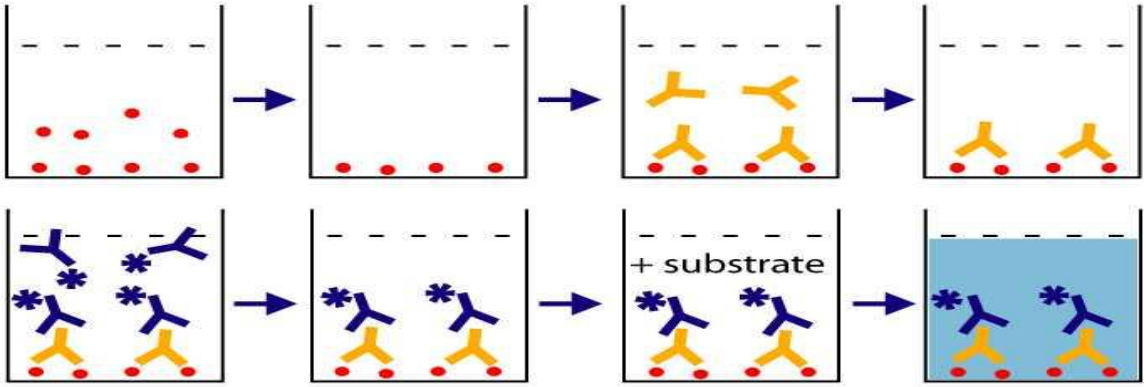


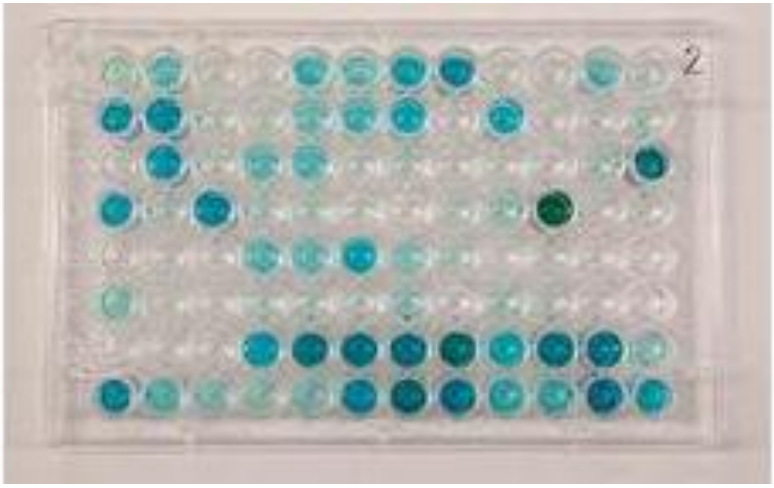


مبدأ الاختبار Test principle

يتضمن مبدأ فحص اختبار الاليزا التقدير الكمي لمستوى الأجسام المضادة في حفر الطبق Microplate well والتي تتألف من 96 حفرة wells .إذ يتم تثبيت مستضد antigen على السطح الداخلي الصلب the solid phase لكل حفرة من حفر الطبق ، ثم بعد ذلك تضاف عينة المصل المراد فحصها فإذا احتوت عينة المصل على أجسام مضادة antibodies الخاصة بذلك المستضد سوف ترتبط مع ذلك المستضد ، تغسل جميع حفر الطبق بمحلول الغسل washing solution الخاص لا إزالة الأجسام المضادة غير المرتبطة أو غير المقترنة ، بعد ذلك يضاف محلول الاقتران conjugate solution والذي هو عبارة عن محلول حاوي على أجسام مضادة مرتبطة بإنزيم (مضادة للأجسام المضادة الموجودة في المصل) ، تغسل جميع حفر الطبق بمحلول الغسل الخاص لا إزالة الأجسام المضادة غير المرتبطة أو غير المقترنة ، بعدها تضاف المادة الأساس (الركيزة) substrate إلى كل حفر الطبق التي تتفاعل مع الإنزيم المرتبط مع الأجسام المضادة في محلول الاقتران ، ظهور اللون الأزرق هو دليل على وجود

الأجسام المضادة مما يعني إن النتيجة موجبة . يضاف بعد ذلك محلول الإيقاف stopping solution لغرض إيقاف التفاعل وقراءة النتيجة . يتم قراءة شدة اللون بالعين أو باستخدام جهاز قراءة طيفي (ELISA reader) حيث تكون هناك علاقة طردية بين كمية الأجسام المضادة بالعينة و شدة اللون.



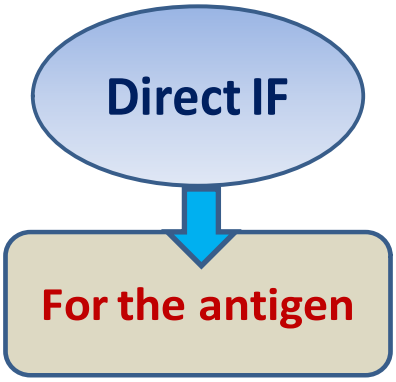


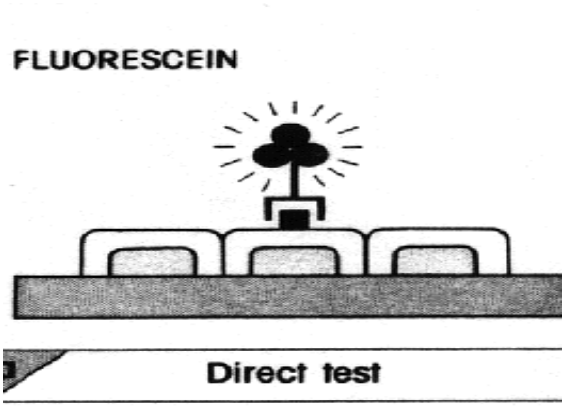
رابعا : اختبار التألق المناعي
Immunoflourecent test
Fluorescent Antibody

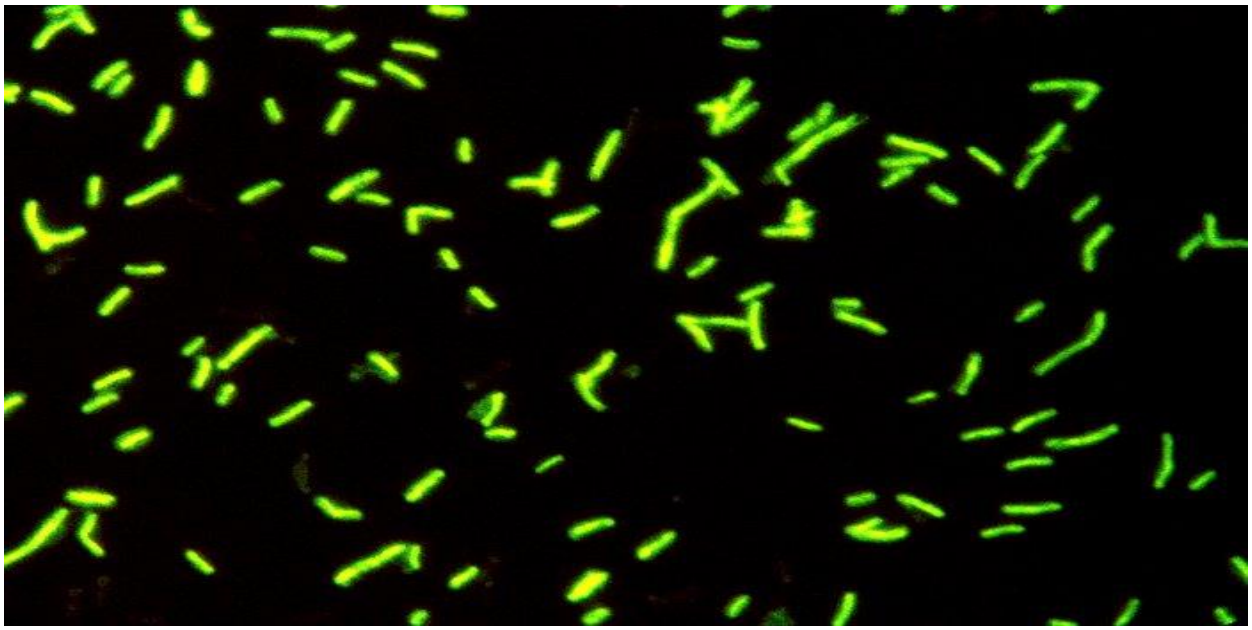
احد اختبارات تفاعلات الجسم المضاد – المستضد وفيها يتم استخدام أجسام مضادة معلمة بصبغة fluorescein dyes و هي مواد كيميائية تمتص الأشعة فوق البنفسجية غير المرئية وتعيد بثها في صورة ضوء مرئي تحت المجهر المتألق Fluorescent microscope الضوء المرئي يختلف لونه باختلاف المادة ومن أشهر المواد Fluorescein isothiocyanate (FITC) و Rhodamine isothiocyanate (RITC) حيث تنتج الأولى ضوء أخضر بينما تنتج الثانية ضوء أحمر عند وضعها في مسار أشعة فوق بنفسجية (المجهر المتألق). وهناك نوعان من الاختبار :

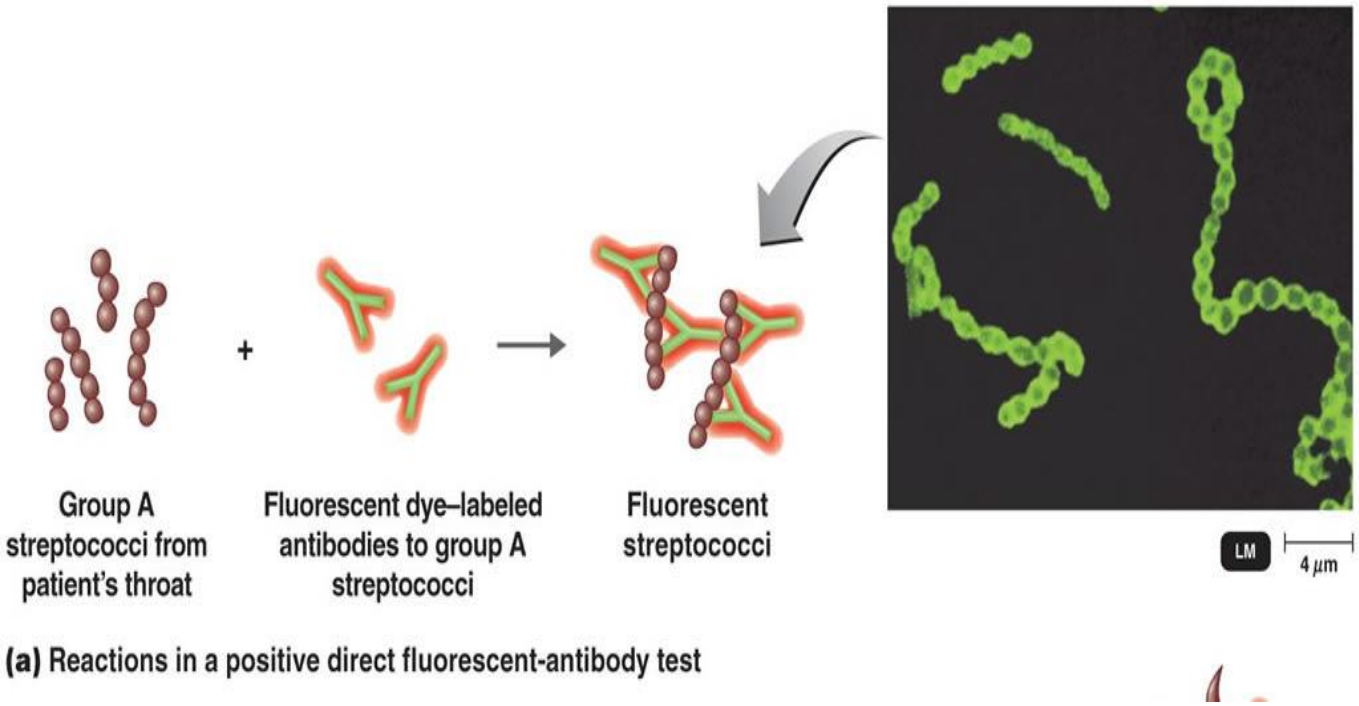
1- اختبار التألق المناعي المباشر Direct Fluorescent-Antibody Tests :

يستخدم هذا الاختبار للكشف عن **المستضدات antigens** وتكون الأجسام المضادة الموجهة ضد المستضدات المراد الكشف عنها والموجودة على سطح الكائن الحي ألمجهري مثل بكتيريا streptococci معلمة بصبغة الفلورسين fluorescein dye ، في هذا الاختبار يتم إضافة الأجسام المضادة المتألقة Fluorescent Antibody مع العينة أو مصل الشخص المريض على الشريحة، تحضن الشريحة، في حالة وجود المستضدات في العينة سوف ترتبط الأجسام المضادة المتألقة مع تلك المستضدات، بعد ذلك يتم غسل الشريحة لإزالة المواد غير المرتبطة . يتم قراءة النتيجة باستخدام المجهر المتألق Fluorescent microscope أو plate reader أو fluorescence-activated flow cytometer


Direct IF
For the antigen


FLUORESCEIN
Direct test





(a) Reactions in a positive direct fluorescent-antibody test

2- اختبار التألق المناعي غير المباشر Indirect Fluorescent-Antibody Tests :

يستخدم هذا الاختبار للكشف عن **الأجسام المضادة** في العينة ، يثبت المستضد المعلوم على السطح الصلب للشريحة ثم يضاف مصل الشخص المريض المراد الكشف عن الأجسام المضادة فيه على الشريحة ليحضن بعد ذلك ، بعد انتهاء فترة الحضن يتم غسل الشريحة وذلك للتخلص من المواد الزائدة غير المرتبطة . يضاف بعد ذلك الأجسام المضادة Anti-human gamma globulin المعلمة بصبغة الفلورسين على الشريحة *الإليزا* fluorescein dye، تحضن الشريحة ، بعد انتهاء فترة الحضن يتم غسل الشريحة لإزالة المواد غير المرتبطة، تفحص الشريحة تحت المجهر المتألق ، يعد ظهور تألق ايجابي تحت المجهر دليلا على وجود الأجسام المضادة في المصل.

A- A known **antigen** is fixed to a **solid phase** (slide).

B- The **serum** of the patient is layered on the slide and incubated.

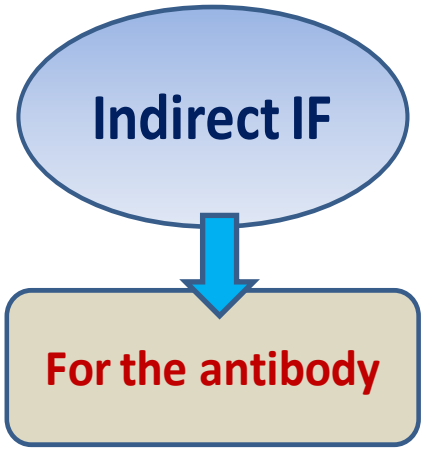
C- **Washing** of the slide is done.

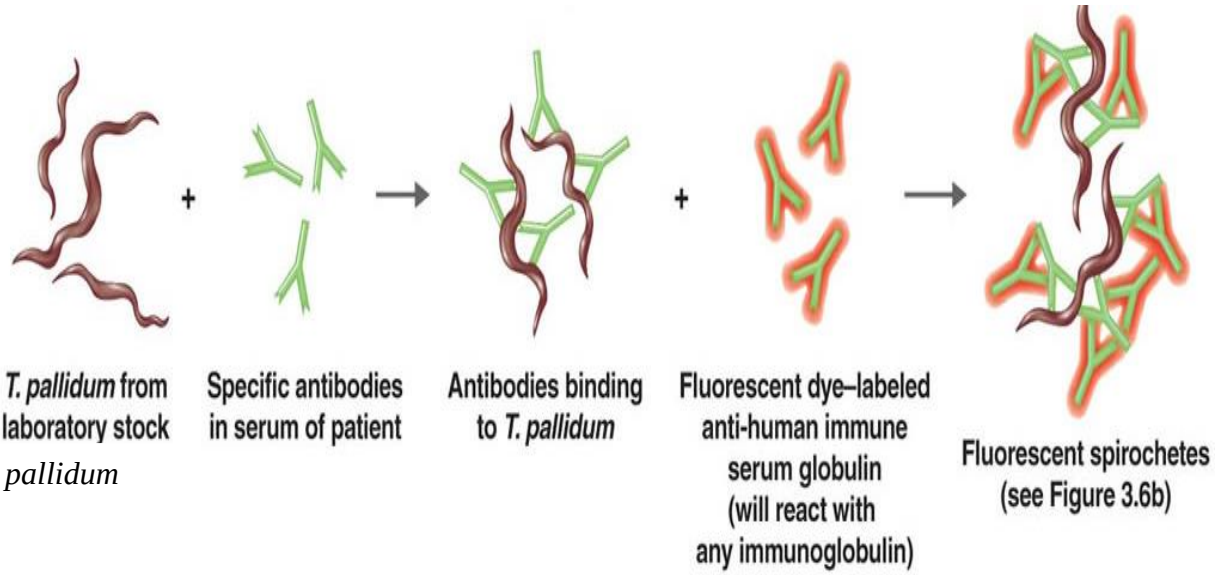
D- **Anti-human gamma globulin** labeled with fluorescein dye is added to the slide and incubated.

E- **Washing** of the slide is done.

F- The slide is then examined under the fluorescent microscope.

G- **Positive fluorescence** under the microscope means **positive** serum.





Treponema pallidum

(b) Reactions in a positive indirect fluorescent-antibody test

Copyright © 2010 Pearson Education, Inc.