١_ الاجسام المضاد Antibody

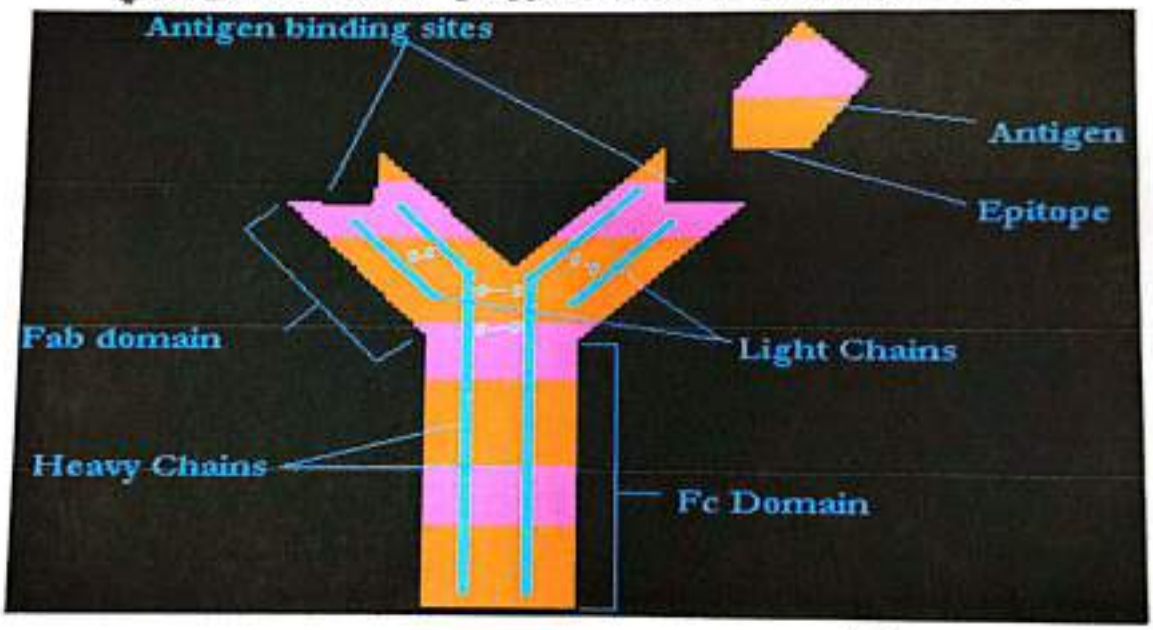
هي بروتينات متخصصة لها شكل حرف Y، ترتبط بالأجسام الغريبة التي تدخل إلى الجسم كالفيروسات والجراثيم والفطريات والطفيليات بآلية مشابهة للقفل والمفتاح يرتبط بال Antigen من جهة ويرتبط بخلايا المناعة من جهة اخرى اي يعمل كوسيط لل Antigen وخلايا المناعة .

٢_ شكل الجسم المضاد

يكون بشكل حرف Yويتكون من سلسلتين ترتبط مع بعضها بروابط كبريتيدية ثنائية وهذه السلاسل هي

1 - **سلسلة خفيفة Light chain** : تتكون من 220AA حامض اميني ويكون على نوعين اما Kappa مكان تصنيعه على كروموسوم 2 ويشكل حوالي 60% ، او Lanbda مكان تصنيعه على كروموسوم 22 ويشكل حوالي 40 % .

2 - **سلسلة ثقيلة Heavy chain** : تتكون من 440AA حامض اميني



وتتكون من خمس انواع وهي

1 - IgA : هي واحدة من الاجسام المضادة الاكثر شيوعا في الجسم حيث توجد بتركيزات عالية في الاغشية المخاطية ولاسيما في بطانة الممرات التنفسية وتوجد ايضا في الجهاز الهضمي واللعاب والدموع ومتوفر في حليب الام لتزود الطفل به لتحميه من الامراض في المراحل الاولى من عمره .

2 - IgM : ويوجد في الدم والسائل اللمفاوي تصل نسبة تواجده في الدم الى 8% وهو اول جسم مضاد يصنع من قبل الجسم لمحاربة عدوى جديدة وهو اول

الاجسام التي تنتج في جسم الجنين وهذا الجسم غير قابل للانتشار لضخامة حجمه .

3 - IgG : هو النوع الاكثر وفرة من الاجسام المضادة ويحتل حوالي 80% من الاجسام المضادة يمتاز بقدرته الفائقة على الانتشار بين الانسجة له عدة وظائف منها ابطال مفعول السموم ومعادلتها وطردها من الجسم ، التمسك بالفيروسات والبكتريا ومنعها من التمسك في خلايا جسم الانسان ، تخترق المشيمة وتزود الجنين بحماية من الميكروبات ، تساعد الخلايا القاتلة على التخلص من الخلايا المريضة .

4 - IgE : يوجد في الرئتين والجلد والاغشية المخاطية وارتباطه الاساسي بالحساسية ويقوم الجهاز المناعي المبالغة بإنتاجه وذلك عند وجود مستضدات بيئية مثل حبوب القمح او وبر الحيوانات الاليفة ويطلب اختبار IgE كصورة اولية للحساسية .

5 - IgD : وجد على سطع الخلايا البائية B cells نسبته ١% تركيزه في المصل 0.03 g/l ولم يحدد دوره الاساسي لحد الان .

عند استخدام انزيم papain يتم كسر Antibody الى منطقتين المنطقة العليا تدعى *fragment Antibody binding domain* وترمز *Fab* والمنطقة السفلى تدعى Fragment crystal domain وترمز FC ، في حين تدعى منطقة اتصال Antigen مع Antibody ب Antigen binding sites وترمز ABS.

٣_ نظام المناعة المستمدة من السوائل الدموية والمناعة بواسطة الاجسام المضادة

The Humoral Response or Activation phase

تبدأ العملية بان تبلع الخلايا البالعة ل Antigen او البكتريا داخل الخلية وتقوم Lysosome بتحليل Antigen ويتحد جزء من المواد المتحللة بمستقبلات خاصة ويتم تمثيله على سطح الخلية ، وسوف يبدأ بطور تنشيط الخلايا المساعدة في هذا الطور يتحد T- cell مع مستقبلات الخلايا البالعة ويتم افراز cytokines ويحفز خلايا T- cell التي تقوم ايضا بإفراز cytokines ثم تنقسم الخلايا المحفزة T-Cell ، ويبدأ عندها الطور الثاني وهو الطور

الفعال وهي في خلايا B – lymphocyte ويقوم بابتلاع نفس الجسم المضاد الذي تم ابتلاعه من قبل خلايا البالعة ويحدث نفس العملية بان يقوم بتحليل هذا الجسم واتحاده مع مستقبلات خاصة وتمثله على سطح الخلية ، تتحد الخلية Tcell التي تم تنشيطها مع خلايا B cell وهذا الاتحاد يؤدي الى افراز cytokines وبالتالي تنقسم خلايا B cell وتتمايز الى نوعين من خلايا

1 – خلايا الذاكرة memory cell التي تحفظ ذاكرة طويلة المدى لهذا النوع من Antigen .

2 – Plasma cell : تقوم بإفراز اجسام مضادة .

Antigen

وهو الجسم المسؤول عن اثارة الجهاز المناعي للجسم وبالتحديد اثارة الاجسام المضادة .

٤_تحليل ELISA

تحليل الإليزا أو ما يُعرف بالمقايسة الامتصاصيّة المناعيّة للإنزيم المرتبط (بالإنجليزية: ELISA/ enzyme-linked immunosorbent assay)، وهو اختبار يقيس ويكشف عن وجود أجسام مضادة معينة في الدم.

٥_ أنواع تحليل ELISA

هنالك نوعان رئيسان لتحليل الإليزا، وفيما يأتي شرح لكلّ منهما

١- تحليل الاليزا المباشر: وفي هذا النوع يتمّ قياس نسبة وجود المستضد في عينة الدم؛ وهو مُسبّب المرض، فيكون طبق الإليزا مطليّاً بالأجسام المضادة التي ترتبط بالمستضد في حال وجوده والكشف عنه.

٢- تحليل الاليزا غير المباشرIndirect ELISA: يعمل على قياس وجود الأجسام المضادة التي ينتجها الجسم نتيجة دفاعه ضد المستضد، حيث يعمل عكس طريقة الاليزا المباشرة، فالطبق يحتوي على المستضد ليكشف عن وجود أجسام مضادة في العينة المأخوذة من المريض أو عدمها.

٦_ إيجابيات وسلبيات ELISA

هنالك بعض الإيجابيات والسلبيات لاستخدام طريقة الإليزا للكشف عن مسببات الأمراض، وفيما يأتي ذكر لبعض منهم:

ميزات تحليل الإليزا:

١- حساسية الفحص ودقته العالية؛ حيث تعمل تقنية الإليزا على اكتشاف المستضدات حتى وإن كانت بكميات قليلة جداً على مستوى البيكوجرام.
٢- إنتاجية مرتفعة؛ حيث إنّ أغلب الأشكال التجارية للإليزا توفر ألواحاً بـ ٩٦ حجرة.
٣- سهولة الاستخدام، فجميع الخطوات سهلة المتابعة.
٤- إمكانية اختبار أنواع مختلفة من العينات، مثل؛ مصل الدم، والبلازما، والأنسجة، والبول، واللعاب.

سلبيات تحليل الإليزا:

١- يُعطي قراءات محددة بفترة زمنية؛ وذلك لأنه يعتمد على تفاعلات الإنزيم، وبالتالي يجب الحصول على النتائج والقراءات خلال فترة زمنية قصيرة.
٢- يُعطي معلومات محدودة عن المستضد المسبب للمرض، فهو يكشف فقط عن وجوده أو كميته في العينة

٧_ الأدوات المستخدمة في تحليل ELISA

يُستخدم لفحص Elisa عدة مواد وأدوات، وفيما يأتي تفصيل لذلك:
١- قارئة الإليزا ELISA Readers : ويجب أن تحتوي على طول موجي ما بين ٤٥٠-٦٥٠ نانومتر.
٢- ماصة pipette : وتتوفر بأشكال مختلفة، منها ما يكون قابلاً لتعديل سعتها لسحب كميات مختلفة.
٣- نظام الغسيلWashing system ، قد يكون نظام الغسيل نظاماً يدوياً؛ يغسل صفاً أو عموداً واحداً في نفس الوقت، أو نظاماً شبه آلي؛ يغسل شريطاً أو لوحة واحدة في وقت واحد، أو أنظمة آلية بالكامل؛ يمكنها غسل ألواح متعددة.

٤- ألواح مطلية well microtiter plate : مكونة من well 96 تتكون من عمود يحتوي على well 8 وهي حروف، وصف يتكون من well 12 وهي ارقام ، مغلّفة إما بمستضد غير نشط أو جسم مضاد.

٥- ضوابط control : للتحقق من صحة الفحص، ولحساب نتائج العينة، فهنالك نوعين من الضوابط لكل مجموعة، وهما؛ الإيجابي والسلبي.

٦- محاليل السيطرة القياسية standards: والذي يتكون من ٦ او اكثر من standars وذات تراكيز من الادنى الى الاعلى او standard واحد ذات تركيز عالي يتم تخفيفه للحصول على تراكيز ادنى .

٧- إنزيم مقترن Conjugated Enzyme :وهي عبارة عن إنزيم مرتبط بأجسام مضادة ثانوية للاجسام المضادة الاولية بالعينة تتفاعل بطريقة خاصة مع العينة.

٨- محلول الغسيل Wash Concentrate : الذي يعمل كمحلول لغسل المواد غير المرتبطة من اللوحة.

٩- محلول substrate : وهو محلول لوني ويتم وضعه في قنينة مظلمة لشدة فعاليته .

١٠- محلول وقف التفاعل Stop solution : وهو محلول يتمّ إضافته لوقف التفاعل وإيقاف تغير اللون.

٨- خطوات عمل Sandwich ELISA

١- قبل الشروع في العمل يجب قراءة التعليمات بدقة شديدة لان أي خطأ قد يؤدي الى فساد التجربة وخسارة قيمة kit وهي مكلفة جدا .

٢- يتم ترقيم الطبق الخاص المكون من ٩٦ خانة (well) بدقة وتستخدم الخانات wells الاولى لرسم المنحنى القياسي Standard curve .

٣- ثم يتم وضع العينة المراد فحصها في الطبق ويفضل تكرار كل عينة مرتين او ثلاث مرات Duplicate or triplicate .

٤- تستخدم عينة standards وهذه العينة تاتي مع مجموعة المحاليل (kit) وهي ذات تركيز محدد من قبل الشركة المصنعة وتعامل تماما مثل العينه المفحوصة .

٥- تترك العينات لفترة زمنية محددة حتى يلتصق Atigen or antibody بالطبق بعد ذلك يغسل الطبق لإزالة ماتبقى من العينة

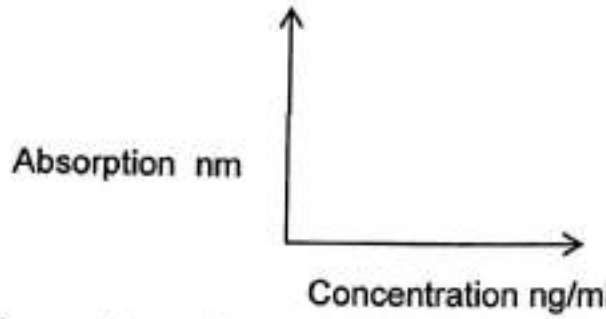
٦- تتم اضافة محلولConjugated Enzyme .

٧- يتم اضافة المادة الاساس substrate للانزيم المرتبط بالاجسام المضادة الثانية فيقوم الانزيم بتحويل المادة الاساس الى ناتج ملون .

٨- تحسب كمية ناتج التفاعل ضوئيا باستخدام جهاز الحاسوب وتكون كمية ناتج التفاعل متناسب طرديا مع كمية Antibody or Antigen في العينة .

٩-النتائج

بعد قراءة نتائج الامتصاص في جهاز قارئ الاليزا نقوم برسم المنحني القياسي على ورق الرسم البياني بحيث نستخدم المحور السيني X-aris للتركيز Concentration والمحور الصادي y-axis للامتصاص Absorption



نقوم بتحديد تركيزات المحاليل القياسية standardsعلى المنحنى السيني x-axis ثم نحدد قراءة كل محلول قياسي على المنحنى الصادي y-axis ونرسم المنحنى القياسي

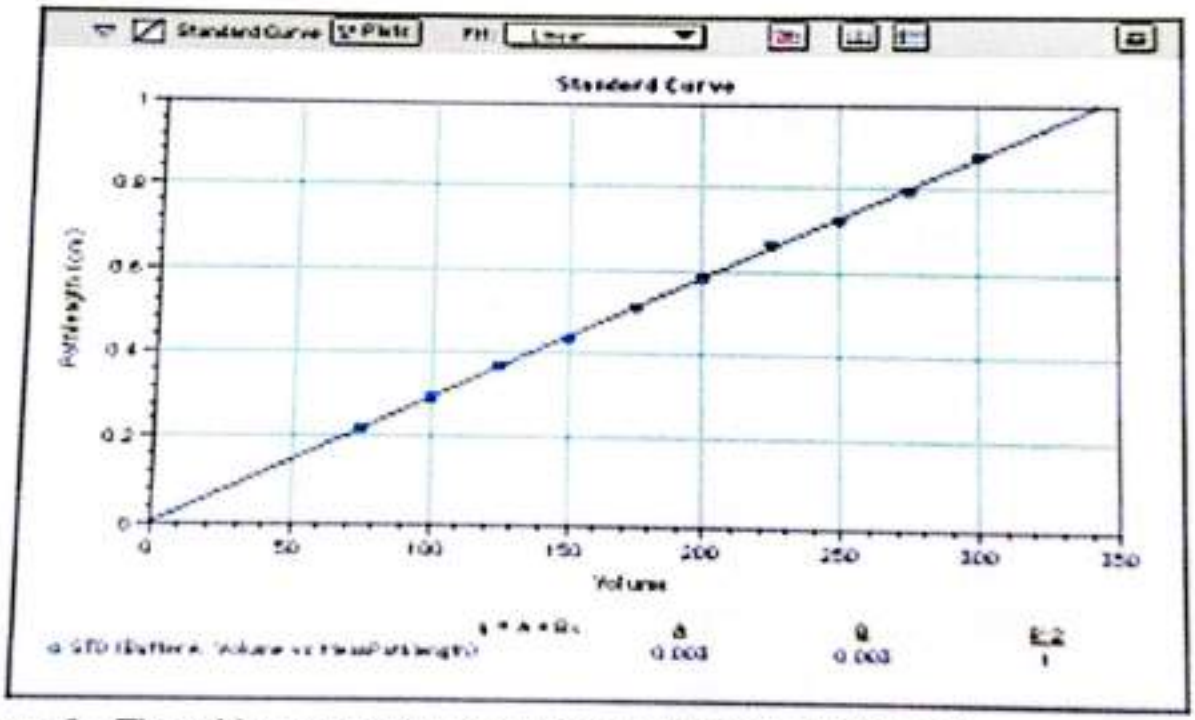
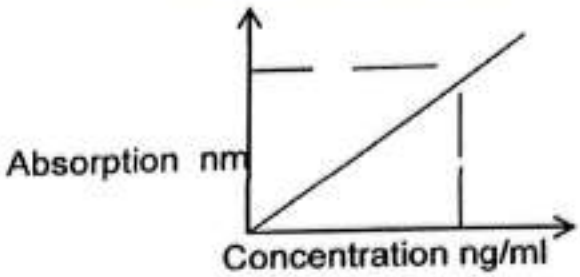


Figure 8: The calibration curve relating well volume to pathlength

يستخدم هذا المنحنى لقياس تركيز كل عينة بحيث نأتي عند قراءة الامتصاص على المحور الصادي ونحدد النقطة المقابلة لها على المنحنى وبعد ذلك نحدد التركيز على المنحنى السيني



نحسب تركيز العينة الضابطة من المنحنى وإذا كان في الحدود الطبيعية المحددة من الشركة المصنعة فهذا يعني أن التجربة ناجحة ويمكن اعتماد النتائج.