

## Handling of laboratory animals

### التعامل مع حيوانات المختبر

### Animal inoculation Techniques using different routes

### تقنيات تلقيح الحيوانات باستخدام طرق مختلفة

#### Introduction: مُقَدِّمة:

Selection of an animal model is one of the most important step in any of the experimental studies. Animal model preferred for the study must be producing similar disease profile as in the human.

اختيار نموذج حيواني هو واحد من أهم الخطوات في أي من الدراسات التجريبية. النموذج الحيواني المفضل للدراسة يجب أن ينتج بيانات مرض مماثلة كما هو الحال في الإنسان.

Animal model selected should follow three main objectives: ينبغي أن يتبع النموذج الحيواني المختار ثلاثة أهداف رئيسية:

1. Use of an animal phylogenetically closer to man.. استخدام الحيوانات جينيا أقرب إلى الإنسان.
2. Use of an animal in which the process under investigation is as close as possible to that in man . استخدام الحيوان الذي تكون العملية قيد التحقيق أقرب ما يمكن إلى تلك التي في الإنسان .
3. The Anatomy, Physiology and Biochemistry are considered to be similar . يعتبر التشريح وعلم وظائف الأعضاء والكيمياء الحيوية متشابهين

Classification of experimental animals: تصنيف الحيوانات التجريبية:

1. RODENTS (Mice, Rats, Guinea pigs, Hamster... etc.) القوارض (الفئران، الفئران، خنازير غينيا، الهامستر... etc.)
2. NON-RODENTS (Rabbit, Dog, Cat, Monkey.....etc.) ارنب كلب قطة قرد

#### MOUSE : فأر:

Smallest laboratory animal Easy to keep, handle and require small place for housing, uniformly breed. Common strain Swiss albino mice, Sensitive to small doses of drugs.

أصغر حيوانات المختبر سهلة الحفظ والتعامل وتتطلب مكان صغير للسكن، تولد بشكل موحد. سلالة شائعة من الفئران الأمهق السويسرية، حساسة لجرعات صغيرة من الأدوية.



#### RAT : جرذ:

Rat is commonly used for the assay of different hormones and for the study of the oestrous cycle, mating behavior and fertility.

يستخدم الجرذ عادة لفحص الهرمونات المختلفة ولدراسة الدورة الشبقية، وسلوك التزاوج والخصوبة.

#### Guinea pig :

Herbivorous and eats green foods seed and roots. Guinea pig are not able to synthesize required daily vit C. Highly sensitive to histamine, Highly sensitive to penicillin Serum contains an enzyme asparaginase, which shows anti- leukemic action, very susceptible to tuberculosis and anaphylactic shock .

أكلة الأعشاب وتاكل الأطعمة الخضراء البذور والجذور. حساسية عالية للهستامين، وحساسية عالية لمصل البنسلين يحتوي على إنزيم asparaginase ، الذي يظهر فعالية مضادة للسرطان، وحساسية جدا للسل والصدمة الحساسية المفرطة.



#### Hamster :

Third commonly used laboratory animal. Two species are commonly used : Golden or Syrian Hamster -Chinese Hamster. Hamsters are used extensively in onco virus, influenza virus, respiratory syncytical virus (RSV) studies and vaccine production Cheek pouches do not have lymphatic drainage and hence they are ideal site for tissue transplants such as tumors and crafts European hamster is a more suitable model for highly concentrated and prolonged smoke inhalation studies.

ثالث حيوانات المختبر شائعة الاستخدام. وهناك نوعان يشيعان استخدامهما: الهامستر الذهبي أو الهامستر السوري - الصيني. يستخدم الهامستر على نطاق واسع في دراسات فيروس الأونكو، فيروس الأنفلونزا، فيروس الجهاز التنفسي (RSV) وإنتاج اللقاحات لا تحتوي Cheek pouches على drainage الليمفاوي، وبالتالي فهي موقع مثالي لزرع الأنسجة مثل الأورام و crafts الهامستر الأوروبي هو نموذج أكثر ملائمة لدراسات استنشاق الدخان عالية التركيز وطويلة الأمد.



#### Rabbit:

Very docile animals, Used for testing of large volume parenterals and for the screening and bioassay of insulin, antidiabetic and curare mimetic drugs. New Zealand white rabbits have been used in the screening of different drugs for diseases like diabetes, diphtheria, tuberculosis, cancer and heart diseases. Employed in screening of antifertility drugs and for



teratogenic studies. Skin is sensitive to irritation. Hence used for irritancy tests. Good model for the production of antibodies and antiserums.

حيوانات سهلة الانقياد جداً، تستخدم في اختبار كميات كبيرة من الحقن وفي الفحص والتحليل الحيوي للأنسولين ومضادات السكري وعقاقير الكواري المقلدة. وقد استخدمت الأرانب البيضاء في نيوزيلندا في فحص أدوية مختلفة للكشف عن أمراض مثل السكري والدفترية والسل والسرطان وأمراض القلب. يعمل في مجال فحص العقاقير المضادة للخصوبة والدراسات المتعلقة بتشوهات الأجنة. الجلد حساس للتهيج. وبالتالي تستخدم لاختبارات التهيج. نموذج جيد لإنتاج الأجسام المضادة والمصل المضاد.

### التعامل مع الحيوانات: ANIMAL HANDLING

Before restrain, first pet or sooth the animal by slow deliberate movements in the body, overcrowding near the animal cage should be , noise should be kept as minimum, don't hold animal too hard, never agitate the animal, it may become violent for self protection.

قبل ضبط الحيوان، أول حيوان أليف أو تهدئة الحيوان عن طريق الحركات المتعمدة البطيئة في الجسم، الاكتظاظ بالقرب من قفص الحيوان يجب أن يكون، يجب الحفاظ على الضوضاء كحد أدنى، لا تمسك الحيوان بقوة شديدة، لا تعرض الحيوان أبداً، قد تصبح عنيفة من أجل حماية النفس.

**MOUSE:** One can handle it with the help of blunt forceps by grasping the skin behind the neck or body. (to transfer from one cage to another) Grasp the base of the tail with one hand and with the other grasp the loose skin behind its neck Hold the complete body by grabbing back of neck by using all fingers

يمكن التعامل معه باستخدام ملقط غير حاد بإمساك الجلد خلف الرقبة أو الجسم. (لنقل من قفص إلى آخر) أمسك قاعدة الذيل بيد واحدة ومع الأخرى أمسك الجلد المرتخي خلف عنقه أمسك الجسم الكامل عن طريق مسك ظهر الرقبة باستخدام جميع الأصابع

**RAT:** Lift rat out of the cage by grasping the base of the tail and place on a soft surface Place your index and middle fingers alongside the rat's head and your thumb and ring fingers under its forelegs. Use your index and middle fingers to secure its head and remaining fingers to support the body Hold the complete body by grabbing the back using complete palm

ارفع الفأر خارج القفص بإمساك قاعدة الذيل ووضعه على سطح ناعم ضع السبابة والوسطى على طول رأس الفأر وإبهامك وحلقة الأصابع تحت ساقيه الأماميتين. استخدم السبابة والأصابع الوسطى لتثبيت رأسه والأصابع المتبقية لدعم الجسم أمسك بالجسم الكامل عن طريق مسك الظهر باستخدام راحة اليد الكاملة

**GUINEA PIG:** By using both hands, calmly grasp it with one hand under the chest and use your other hand to support its hindquarters Handle guinea pig with one hand, by holding its hindquarter

باستخدام كلتا اليدين، امسك الخنزير الغيني بهدوء بيد واحدة تحت الصدر واستخدم يدك الأخرى لدعم مؤخرته أمسك خنزير غينيا بيد واحدة، عن طريق الإمساك بمؤخرته

**HAMSTER :** Hold the complete body by grabbing at the nap of the neck by thumb and index finger and grasp the complete body by using rest of fingers Hold the complete body by grabbing back by using complete palm

أمسك الجسم الكامل عن طريق الإمساك بقلولة من الرقبة بالإبهام والسبابة وإمساك الجسم الكامل باستخدام بقية الأصابع أمسك الجسم الكامل عن طريق الإمساك بالخلف باستخدام راحة اليد الكاملة

**RABBIT :** By using single hand, hold the pelvic region. This is to transfer rabbits from one cage to another By using both the hands, hold the complete hindquarter. By using both hands, calmly grasp it with one hand supporting back of neck and the other hand supporting its hindquarters.

باستخدام يد واحدة، أمسك منطقة الحوض وهذا لنقل الأرانب من قفص إلى آخر باستخدام كلتا اليدين، والإمساك بالجزء الخلفي الكامل. باستخدام كلتا اليدين، امسكها بهدوء بيد تدعم ظهر الرقبة واليد الأخرى تدعم مؤخرتها.

### ROUTES OF ADMINISTRATION:

1. **FEEDING OR ORAL CAVAGES:** التغذية أو التغذية عن طريق الفم

Feeding or oral gavages Hold the rodent in hand carefully Measure the tube length from nose to the last rib of the rodent and mark it Give a gentle tight grip at back of the neck, so that it opens its mouth widely. Push the rodent head slightly upward and back to straighten esophagus and then either from right or left side of the teeth, insert the tube by gentle rotation to avoid the resistance

التغذية أو التغذية عن طريق الفم أمسك القارض في يده بعناية قم بقياس طول الأنبوب من الأنف إلى آخر ضلع من القارض ووضعه علامة عليه أعط قبضة محكمة رقيقة على الجزء الخلفي من العنق، بحيث يفتح فمه على نطاق واسع. ادفع رأس القوارض قليلاً لأعلى ولخلف لتقويم المريء ثم إما من الجانب الأيمن أو الأيسر من الأسنان، أدخل الأنبوب عن طريق تدوير لطيف لتجنب المقاومة

2. **INTRAPERITONEAL :**

3. **INTRAVENOUS :**

4. **INTRAMUSCULAR :**

5. **SUBCUTANEOUS :**

6. **INTRACARDIAC INJECTION:**

### BLOOD COLLECTION FROM EXPERIMENTAL ANIMALS:

جمع الدم من الحيوانات التجريبية

1. Terminal blood collection --whole blood withdrawal. سحب الدم الكامل terminal جمع الدم

2. **Non terminal blood collection (Single blood removal -- Multiple blood withdrawals).** جمع الدم Non terminal (إزالة الدم مرة واحدة - سحبيات الدم المتعددة).

### **TERMINAL BLOOD COLLECTION:**

Done either after exsanguinations of the animal by physical stunning or after submitting the animal to general anesthesia The blood from such animals can be collected by:

يتم إجراؤه إما بعد استنزاف الحيوان عن طريق الصعق الجسدي أو بعد إخضاع الحيوان للتخدير العام ويمكن جمع الدم من هذه الحيوانات عن طريق:

Withdrawal of blood from venacava or aorta after performing laparotomy Animals are subjected to exanguination after decapitation, the jugular vein or carotid artery is exposed given an incision and blood is directly collected using a syringe Blood can also be collected by retro-orbital bleeding of smaller animal like mice rats and hamsters.

سحب الدم من الوريد الأخرى أو الشريان الأبهري بعد إجراء عملية فتح البطن ، تتعرض الحيوانات للإفرازات بعد قطع الرأس ، ويتعرض jugular

vein والشريان السباتي للشق ويتم جمع الدم مباشرة باستخدام حقنة يمكن أيضاً جمع الدم عن طريق النزيف المداري للحيوان الأصغر مثل

الفئران والجرذان الهامستر.

### **NON TERMINAL COLLECTION OF BLOOD:**

Required for single or multiple withdrawals. Different peripheral veins of different animals may be used for collection of blood For multiple withdrawals, the amount of blood sample should not exceed 1% of total blood volume every 24 hours.

يلزم القيام بسحب واحد أو أكثر. يمكن استخدام الأوردة المحيطية المختلفة لحيوانات مختلفة لجمع الدم لعمليات سحب متعددة، ويجب ألا تتجاوز كمية عينة الدم 1% من إجمالي حجم الدم كل 24 ساعة.

For single withdrawal of blood, up to 15% of total blood volume does not adversely affect animal. Withdrawal of more than 15% may lead to cardiac failure. A single withdrawal of up to 15% of total blood volume can be repeated after 3-4 weeks from the normal healthy animal.

بالنسبة لسحب الدم مرة واحدة، فإن ما يصل إلى 15% من إجمالي حجم الدم لا يؤثر سلباً على الحيوان. انسحاب أكثر من 15% قد يؤدي إلى فشل القلب. انسحاب واحد يصل إلى 15% من إجمالي حجم الدم يمكن أن يتكرر بعد 3-4 أسابيع من الحيوان السليم الطبيعي.

### **TECHNICAL ASPECTS OF BLOOD REMOVAL:**

#### **مراحل تقنية لإزالة الدم**

1. **BLOOD COLLECTION FROM TIP OF TAIL:** جمع الدم من طرف الذيل

Common method used in rats and mice for collecting 0.1ml from the capillary blood is to cut sharply the tip of tail Adequate for multiple collection of blood samples for the determination of biochemical parameters like blood glucose, radio labelled drugs etc.. In tail less animals cardiac puncture is used for collection of blood.

الطريقة الشائعة المستخدمة في الفئران والجرذان لجمع 0.1 مل من الدم الشعري هي خفض طرف الذيل بشكل حاد، وهو ما يكفي لجمع عينات الدم المتعددة لتحديد البارامترات الكيميائية الحيوية مثل جلوكوز الدم، والأدوية التي تحمل علامات الراديو وما إلى ذلك. في ذيل عدد أقل من الحيوانات يتم استخدام ثقب القلب لجمع الدم.

2. **BLOOD FROM SUPERFICIAL VEINS:** دم من الأوردة

In larger animals superficial veins are used for blood collection The bore of the needle should as large as possible for ensuring rapid withdrawal of blood A check is made afterwards to ensure that no after bleeding occurs from this point

في الحيوانات الكبيرة تستخدم الأوردة السطحية لجمع الدم يجب أن يكون تجويف الإبرة أكبر قدر ممكن لضمان سحب الدم السريع يتم إجراء فحص بعد ذلك لضمان عدم حدوث نزيف بعد هذه النقطة

3. **PERMANENT VENOUS CANNULATION:**

Used for chronic experiments which necessitate multiple blood collection at regular intervals The catheters are made to exit at the back of animal for only 2cms and capped with steel needles and at the time of blood collection a longer catheter is attached Thrombi formation due to clotting can be prevented by repeatedly filling the catheter with saline containing heparin

يتم عمل القسطرة للخروج من الجزء الخلفي من الحيوان لمدة 2 سم فقط، وتغطي بالإبر الفولاذية، وفي وقت جمع الدم يتم إرفاقها قسطرة أطول، ويمكن منع تكوّن الثرومبي بسبب التخثر عن طريق ملء القسطرة بشكل متكرر بمحلول ملحي يحتوي على الهيبارين

4. **RETRO-ORBITAL BLEEDING:**

This technique for collection of blood should be used as the last resort ,by a well trained staff and be confirmed only to one of the eyes Employed in small animals like rat and mice when larger amount of blood is required which cannot be collected from tail vein or in tail less animals Should ideally be performed in anaesthetized animals

يجب استخدام هذه التقنية لجمع الدم كملأً أخيراً، من قبل فريق مدرب بشكل جيد ويتم تأكيدها فقط لواحدة من العيون المستخدمة في الحيوانات الصغيرة مثل الفئران والفئران عند الحاجة إلى كمية أكبر من الدم الذي لا يمكن جمعها من وريد الذيل أو الحيوانات الأقل يجب أن تنفذ في الحيوانات المخدرة

#### 5. **CARDIAC PUNCTURE:**

**Generally employed in guinea pig, hamsters and gerbils. It is ideal to perform cardiac puncture in anaesthetized animal in order to reduce stress and facilitate smooth handling of animals Premedication with atropine helps to prevent cardiac arrhythmias**

يستخدم بشكل عام في الخنازير الغينية، الهامستر والجرذان. من المثالي إجراء ثقب القلب في الحيوانات المخدرة من أجل الحد من الإجهاد وتسهيل التعامل السلس للحيوانات قبل العلاج مع الأتروبين يساعد على منع عدم انتظام ضربات القلب

# The Lymphoid System

## الجهاز اللمفي

The lymphatic system is a network of tissues and organs that primarily consists of lymph vessels, lymph nodes and lymph. The tonsils, adenoids, spleen and thymus are all part of the lymphatic system.

الجهاز اللمفاوي هو شبكة من الأنسجة والأعضاء التي تتكون في المقام الأول من الأوعية اللمفاوية والعقد اللمفاوية واللمفاوية. اللوزتين، الأدينويدات، الطحال والغدة الزعترية كلها جزء من الجهاز اللمفاوي.

The primary function of the lymphatic system is to **هي الوظيفة الأساسية للجهاز اللمفاوي**

- 1- transport lymph, a clear, colorless fluid containing white blood cells that helps rid the body of toxins, waste and other unwanted materials.

اللمف الناقل، سائل شفاف عديم اللون يحتوي على خلايا الدم البيضاء يساعد على تخليص الجسم من السموم والنفائات والمواد الأخرى غير المرغوب فيها.

- 2- removal of interstitial fluid, the extracellular fluid that bathes most tissue.

إزالة السائل الخلالي، السائل خارج الخلية الذي يغسل معظم الأنسجة.

- 3- It also acts as a highway, transporting white blood cells to and from the lymph nodes into the bones, and antigen-presenting cells to the lymph nodes.

3- يعمل أيضا highway، ينقل خلايا الدم البيضاء من وإلى العقد اللمفاوية إلى العظام، والخلايا المقدمة للمستضد إلى العقد اللمفاوية.

## Primary Lymphoid Organs

It is called central, lymphoid organs are the thymus and bone marrow. The function of the primary lymphoid organs is for **PRODUCTION** and **MATURATION** of the white blood cells in order to defend the body from disease.

وهي تدعى المركزية، الأعضاء اللمفية هي **Thymus** ونخاع العظم. وظيفة الأعضاء اللمفية الأولية هي إنتاج ونضج خلايا الدم البيضاء من أجل حماية الجسم من المرض.

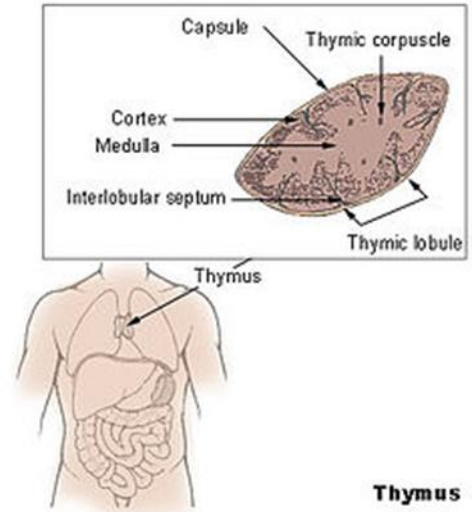
- 1- **Bone Marrow** : Red bone marrow is a hematopoietic tissue containing many stem cells that produce blood cells and platelets. All of the leukocytes, or white blood cells, of the immune system are produced by red bone marrow. Leukocytes can be further broken down into 2 groups based upon the type of stem cells that produces them: myeloid stem cells and lymphoid stem cells.

نخاع العظم الأحمر هو نسيج دموي يحتوي على العديد من الخلايا الجذعية التي تنتج خلايا الدم والصفائح الدموية. وكل الكريات البيضاء، او كريات الدم البيضاء، في جهاز المناعة تُنتج بواسطة نخاع العظم الأحمر. يمكن تقسيم الكريات البيضاء إلى مجموعتين اعتمادًا على نوع الخلايا الجذعية التي تنتجها: الخلايا الجذعية النخاعية والخلايا الجذعية اللمفاوية.

Myeloid stem cells produce monocytes and the granular leukocytes—eosinophils, basophils, and neutrophils. The lymphocytes which complete their maturation and education in **BONE MARROW** called **B-lymphocyte** and others migrate to the **THYMUS** to mature and education called **T-lymphocyte**.

تنتج الخلايا الجذعية النخاعية الخلايا الوحيدة والكريات البيضاء الحبيبية -الخلايا الحمضية، والقاعدية والمتعادلة. الخلايا الليمفاوية التي تكمل نضجها وتعليمها في النخاع العظمي وتسمى **B lymphocytes** وغيرها تهاجر إلى الغدة الدرقية لتتضج وتسمى **T-lymphocytes**.

**2-Thymus Gland :** Thymus is composed of two identical lobes and is located anatomically in front of the heart and behind the sternum .Histologically, each lobe of the thymus can be divided into a central medulla and a peripheral cortex which is surrounded by an outer capsule. The cortex and medulla play different roles in the development of T-cells and one of the most important roles of the thymus is the induction of central tolerance(self- tolerance) are the organs or regions where the mature and immuno competent lymphocytes



يتكون الغدة الدرقية من فصين متطابقين ويقع تشريحياً أمام القلب وخلف القص. تشريحياً، يمكن تقسيم كل فص من الغدة الدرقية إلى نخاع مركزي وقشرة محيطية تحيط بها كبسولة خارجية. تلعب القشرة الدماغية والنخاع أدواراً مختلفة في تطور **T cells**، وأحد أهم أدوار

الغدة الدرقية هو تحفيز التحمل المركزي (التحمل الذاتي) وهي الأعضاء أو المناطق التي تكون فيها الخلايا الليمفاوية الناضجة ذات كفاءة مناعية

## **Secondary Lymphoid Organs:**

are also known as peripheral lymphoid organs. These colonize and interact with foreign agents to induce immune response to antigenic stimuli. These organs include :

تعرف أيضاً باسم الأعضاء الليمفاوية الطرفية. هذه المستعمرات والتفاعل مع العوامل الغريبة لتحفيز الاستجابة المناعية للمؤثرات المستضدية. تتضمن هذه الأعضاء

**1-Spleen;** is an organ in the upper far left part of the abdomen, to the left of the stomach. It plays multiple supporting roles in the body. It acts as a filter for blood as part of the immune system. Old red blood cells are recycled in the spleen, and platelets and white blood cells are stored there. The spleen also helps fight certain kinds of bacteria that cause pneumonia and meningitis.

الطحال ؛ هو عضو في الجزء العلوي الأيسر من البطن، إلى يسار المعدة. يلعب العديد من الأدوار الداعمة في الجسم. وهو يعمل كمرشح للدم كجزء من الجهاز المناعي. ويعاد تدوير خلايا الدم الحمراء القديمة في الطحال، وتُخزَّن فيها الصفائح الدموية وخلايا الدم البيضاء. ويساعد الطحال أيضاً على مكافحة أنواع معينة من البكتيريا التي تسبب الالتهاب الرئوي والتهاب السحايا.

The spleen is composed of the red and white pulp. The white pulp produces and grows immune cell as well as blood cells. On the other hand, the red pulp is responsible for purifying the blood and removing dead or old blood cells . Because of its function in the immune and circulatory systems, the spleen is surrounded by a multitude of blood and lymph vessels.

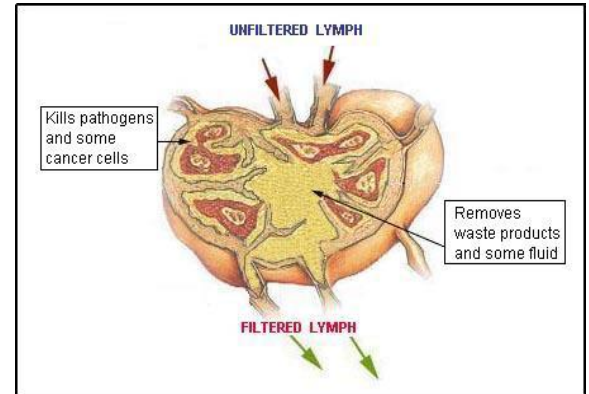
يتكون الطحال من اللب الأحمر والأبيض. وينتج اللب الأبيض وينمو خلايا مناعية وخلايا دم أيضاً. من ناحية أخرى، اللب الأحمر هو المسؤول عن تنقية الدم وإزالة خلايا الدم الميتة أو القديمة. وبسبب وظيفة الطحال في جهاز المناعة والدورة الدموية، فهو محاط بكثرة من الأوعية الدموية واللمفاوية.

Germinal centers in the white pulp serve as the sites of lymphocyte production. Similar to the lymph nodes, the spleen reacts to microorganisms and other antigens that reach the bloodstream by releasing special phagocytic cells. These cells reside in both red and white pulp, and they serve to remove foreign material from the blood .

تعمل المراكز الجرثومية في اللب الأبيض كمواقع لإنتاج الخلايا الليمفاوية. على غرار العقد الليمفاوية، يتفاعل الطحال مع العضويات المجهرية وموحدات الضد الأخرى التي تصل الى مجرى الدم بإطلاق خلايا بلعمية خاصة. تقع هذه الخلايا في اللب الأحمر والأبيض على حد سواء، وتعمل على إزالة المواد الغريبة من الدم.

2- **Lymph Node:** are small, kidney-shaped organs of the lymphatic system There are 600 to 700 lymph nodes found mostly throughout the thorax and abdomen of the body with the highest concentrations in the axillary (armpit) and inguinal (groin) regions in the human body.

العقدة الليمفاوية: هي أعضاء صغيرة على شكل الكلى في الجهاز الليمفاوي هناك 600 إلى 700 عقدة ليمفاوية توجد معظمها في جميع أنحاء الصدر والبطن من الجسم مع أعلى التركيزات في الإبط والمناطق inguinal (الفخذ) في جسم الإنسان.



Each lymph node is divided into two general regions, the capsule and the cortex. The capsule is an outer layer of connective tissue. Underlying the capsule is the cortex, a region containing mostly inactivated B and T lymphocytes plus numerous accessory cells such as dendritic cells and macrophages. The cortex is further divided into two functional areas: the outer cortex and inner cortex. These regions surround an inner medulla, which consists primarily of activated antibody-secreting plasma cells.

تنقسم كل عقدة لمفاوية إلى منطقتين عامتين، المحفظة والقشرة. الكبسولة هي طبقة خارجية من النسيج الضام. تقع القشرة تحت الكبسولة، وهي منطقة تحتوي في معظمها على الخلايا الليمفاوية B و T غير النشطة بالإضافة إلى العديد من الخلايا الإضافية مثل Dendritic cells و macrophages. وتنقسم القشرة أيضاً إلى منطقتين وظيفيتين: القشرة الخارجية والقشرة الداخلية. تحيط هذه المناطق بالنخاع الداخلي، الذي يتألف بشكل رئيسي من خلايا بلازمية منشطة تفرز الأجسام المضادة.

The lymph nodes function as filters of lymph that enters from several afferent lymph vessels. The reticular fibers of the lymph node act as a net to catch any debris or cells that are present in the lymph. Macrophages and lymphocytes attack and kill any microbes caught in the reticular fibers. Efferent lymph vessels then carry the filtered lymph out of the lymph node and towards the lymphatic ducts.

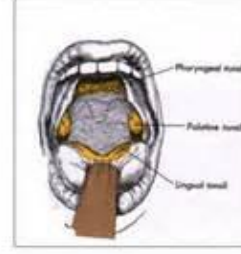
تعمل العقد الليمفاوية كمرشحات من اللمف التي تدخل من العديد من الأوعية الليمفاوية الواردة. تعمل الألياف الشبكية للعقدة الليمفاوية كشبكة لالتقاط أي بقايا أو خلايا موجودة في اللمف. Macrophages والخلايا الليمفاوية تهاجم وتقتل أي ميكروبات تعلق في الألياف الشبكية. ثم تحمل الأوعية الليمفاوية الواردة اللمف المرشح خارج العقدة الليمفاوية ونحو القنوات الليمفاوية.

## Accessory Lymphoid Tissue

Also called mucosa- associate lymphoid tissues are associated with the mucosa membrane of a number of organs like respiratory and digestive system which protect the body against the foreign invaders. It include ;

وتسمى أيضا - **mucosa- associate lymphoid tissues** ترتبط الأنسجة اللمفية المرتبطة مع الغشاء المخاطي لعدد من الأعضاء مثل الجهاز التنفسي والهضمي الذي يحمي الجسم ضد الاجسام الغريبة . وتشمل ما يلي ؛

### Tonsils



- Lymphoid organ
- Swellings of the mucosa lining the pharynx
- Form ring around the entrance to the pharynx
- 4 groups:
  - Palatine
  - Lingual
  - Pharyngeal
  - Tubal
- Remove pathogens
- MALT

**1-Tonsils** : There are 5 tonsils in the body (2 lingual, 2 palatine, and 1 pharyngeal). The lingual tonsils are located at the posterior root of the tongue near the pharynx. The palatine tonsils are in the posterior region of the mouth near the pharynx. The pharyngeal pharynx, is found in the nasopharynx at the posterior end of the nasal cavity. The tonsils contain many **T and B cells to protect the body** from inhaled or ingested substances. The tonsils often become inflamed in response to an infection.

اللوزتين: هناك 5 لوزتين في الجسم (2 lingual، 2 palatine، و 1 pharyngeal). تقع اللوزتين اللسانيتين في الجذر الخلفي للسان بالقرب من البلعوم. تقع اللوزتين palatine في المنطقة الخلفية من الفم بالقرب من البلعوم. و pharyngeal، يوجد في البلعوم الأنفي في الطرف الخلفي من التجويف الأنفي. تحتوي اللوزتين على العديد من T and B cells لحماية الجسم من المواد المستنشقة أو المهضومة. اللوزتين غالبا ما تصبح ملتهبة استجابة للعدوى.

**2-Peyer's patches.** Peyer's patches are small masses of lymphatic tissue found in the ileum of the small intestine. Peyer's patches contain T and B cells that monitor the contents of the intestinal lumen for pathogens. Once the antigens of a pathogen are detected, the T and B cells spread and prepare the body to fight a possible infection.

**Peyer's patches** هي كتل صغيرة من الأنسجة الليمفاوية وجدت في اللفانفي من الأمعاء الدقيقة. تحتوي Peyer's patches على خلايا T و B التي تراقب محتويات intestinal lumen للمسببات الأمراض. وبمجرد اكتشاف مستضدات الممرض، تنتشر T and B cells وتهيئ الجسم لمكافحة العدوى المحتملة.

**3-Skin** : the largest lymphatic organ . contain specialized phagocytic cells called Langerhans cells

أكبر عضو لمفاوي . تحتوي على خلايا phagocytic متخصصة تسمى خلايا Langerhans.



## عدد خلايا الدم البيضاء WHITE BLOOD CELL COUNT

مقدمة: Introduction:

The cells that circulate in the bloodstream are generally divided into three types: white blood cells (leukocytes), red blood cells (erythrocytes), and platelets (thrombocytes). White blood cells are cells of the immune system involved in defending the body against both infectious disease and foreign materials.

تنقسم الخلايا التي تدور في مجرى الدم بشكل عام إلى ثلاثة أنواع: خلايا الدم البيضاء (الكريات البيض) ، وخلايا الدم الحمراء (الكريات الحمر) ، والصفائح الدموية (الصفائح الدموية). خلايا الدم البيضاء هي خلايا جهاز المناعة تشارك في الدفاع عن الجسم ضد الأمراض المعدية والمواد الغريبة.

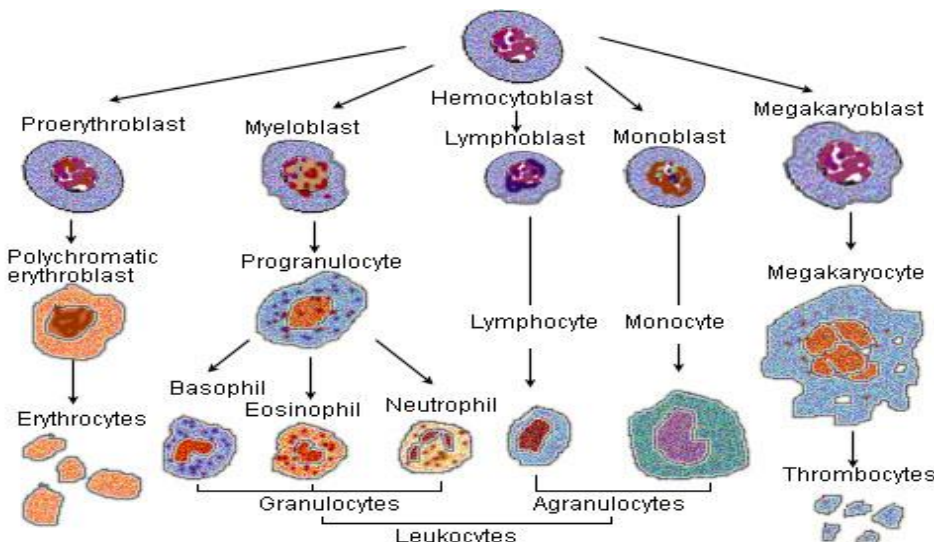
Five different and diverse types of leukocytes exist, but they are all produced and derived from a multipotent cell in the bone marrow known as a hematopoietic stem cell ( Hemocytoblast) . They live for about three to four days in the average human body. Leukocytes are found throughout the body, including the blood and lymphatic system.

توجد خمسة أنواع مختلفة ومتنوعة من الكريات البيض ، ولكن يتم إنتاجها جميعاً ومشتقاتها من خلية متعددة القدرات في نخاع العظم تُعرف باسم الخلية الجذعية المكونة للدم (أرومة الخلايا الدموية). يعيشون حوالي ثلاثة إلى أربعة أيام في متوسط جسم الإنسان. تم العثور على الكريات البيض في جميع أنحاء الجسم ، بما في ذلك الدم والجهاز الليمفاوي.

The white blood cell count (WBC) and the differential count are common laboratory tests and they are almost a necessity in determining the nature and severity of systemic infections. Abnormally high or low counts may indicate the presence of many forms of disease.

يعد تعداد خلايا الدم البيضاء (WBC) والعدد التفاضلي من الاختبارات المعملية الشائعة وهما تقريباً ضرورة في تحديد طبيعة وشدة العدوى الجهازية. قد تشير الأعداد المرتفعة أو المنخفضة بشكل غير طبيعي إلى وجود العديد من أشكال المرض.

## خلايا الدم (الدم)(Haematopoiesis) BLOOD CELLS



white blood cells are often divided as granulocytes or agranulocytes:









غالبًا ما تنقسم خلايا الدم البيضاء إلى **حبيبات** أو **مُحَبَّبات**



- Granulocytes (polymorphonuclear leukocytes): leukocytes characterized by the presence of differently staining granules in their cytoplasm when viewed under light microscopy. These granules are membrane-bound enzymes that act primarily in the digestion of endocytosed particles. There are three types of granulocytes: neutrophils, basophils, and eosinophils, which are named according to their staining properties.

• الكريات الحبيبية (الكريات البيض متعددة الأشكال): الكريات البيض تتميز بوجود حبيبات تلوين مختلفة في السيتوبلازم عند عرضها تحت المجهر الضوئي. هذه الحبيبات عبارة عن إنزيمات مرتبطة بالغشاء تعمل بشكل أساسي في هضم الجسيمات الملتصقة. هناك ثلاثة أنواع من الخلايا المحببة: العدلات ، الخلايا القاعدية ، والحمضات ، والتي تمت تسميتها وفقاً لخصائص تلوينها.

- Agranulocytes (mononuclear leukocytes): leukocytes characterized by the apparent absence of granules in their cytoplasm. Although the name implies a lack of granules these cells do contain non-specific azurophilic granules, which are lysosomes.<sup>[4]</sup> The cells include lymphocytes, monocytes, and macrophages.

• المحببات (الكريات البيض وحيدة النواة): الكريات البيض التي تتميز بغياب واضح للحبيبات في السيتوبلازم. على الرغم من أن الاسم يشير إلى نقص الحبيبات ، إلا أن هذه الخلايا تحتوي على حبيبات أزوروفيليك غير محددة ، وهي الجسيمات الحالة. تشمل الخلايا الخلايا الليمفاوية ، وحيدة الخلية ، والضامة.

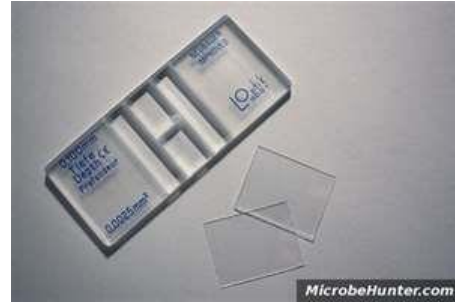
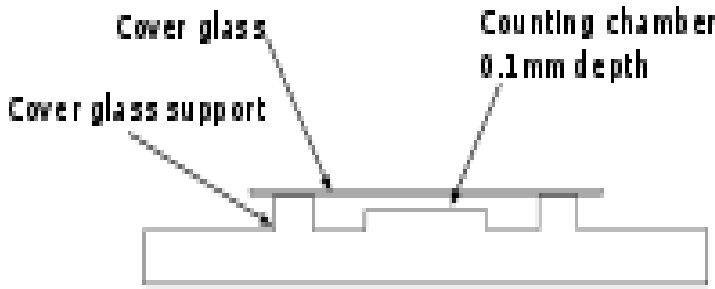
Type	Microscopic Appearance	Diagram	Approx . % in adults	Diameter (µm)	Nucleus	Granules
Neutrophil			62%	10–12	multilobed	fine, faintly pink
Eosinophil			2.3%	10–12	bi-lobed	full of pink-orange
Basophil			0.4%	12–15	bi-lobed or tri-lobed	large blue
Lymphocyte			30%	Small lymphocytes 7–8 Large lymphocytes 12–15	deeply staining, eccentric	None

Monocyte			5.3%	7.72–9.99	kidney shaped	None
----------	---	---	------	-----------	---------------	------

### TOTAL WHITE BLOOD CELL COUNT إجمالي عدد خلايا الدم البيضاء

The total white blood cells (leukocytes) count determines the total number of white cells per cubic millimeter of blood regardless the type of W.B.C. The degree of increase or decrease in leukocytes depend on the type and severity of the infection and the response of the body. the manual method for total W.B.C count is by using Haemocytometer (A glass slide with a chamber for counting blood cells in a given volume.)

يحدد إجمالي عدد خلايا الدم البيضاء (الكريات البيض) العدد الإجمالي للكريات البيضاء لكل مليمترا مكعب من الدم بغض النظر عن نوع خلايا الدم البيضاء. تعتمد درجة الزيادة أو النقص في عدد الكريات البيض على نوع وشدة العدوى واستجابة الجسم ، والطريقة اليدوية لإجمالي عدد كريات الدم البيضاء هي باستخدام مقياس الدم (شريحة زجاجية مع حجرة لعد خلايا الدم في حجم معين. )



### إجراء: Procedure

#### \*Requirements متطلبات

1. Microscope المجهر 2. Improved Neubauer Chamber غرفة نويباور المحسنة

3. WBC pipette ماصة خلايا الدم البيضاء

4. WBC diluting solution: It is prepared as follows:

محلول مخفف خلايا الدم البيضاء: يتم تحضيره كالتالي:-

a) Glacial acetic acid: 2.0 ml. حمض الخليك الجليدي: 2.0 مل.

b) 1 % (w/v) gentian violet (Methylin blue): 1.0 ml.

1% (وزن / حجم) الجنطيانا البنفسجي (أزرق الميثيلين): 1.0 مل.

c) Distilled water: 97 ml. الماء المقطر: 97 مل.

This solution is stable at room temperature (25°C ± 5°C).

هذا المحلول مستقر في درجة حرارة الغرفة (25 درجة مئوية ± 5 درجات مئوية).

## \*Principle مبدأ

The glacial acetic acid lyses the red cells while the gentian violet slightly stains the nuclei of the leukocytes. The blood specimen is diluted 1:20 in a WBC pipette with the diluting fluid and the cells are counted under low power of the micro scope by using a counting chamber. The number of cells in undiluted blood are reported per cu mm ( $\mu\text{l}$ ) of whole blood.

يحلل حمض الخليك الجليدي الخلايا الحمراء بينما يلوخ البنطيانا البنفسجي قليلاً نوى الكريات البيض. يتم تخفيف عينة الدم بنسبة 1:20 في ماصة WBC مع السائل المخفف ويتم عد الخلايا تحت طاقة منخفضة من النطاق الدقيق باستخدام غرفة العد. يتم الإبلاغ عن عدد الخلايا في الدم غير المخفف لكل متر مكعب (ميكرو لتر) من الدم الكامل.

## \* Procedure الاجراء

1. Make a 1:20 dilution of blood by adding 20  $\mu\text{l}$  of blood to 0.38 ml of diluting solution in a glass tube and mix for at least 1 min.

عمل مخفف من الدم بنسبة 1:20 عن طريق إضافة 20 ميكرو لتر من الدم إلى 0.38 مل من محلول التخفيف في أنبوب زجاجي واخلطه لمدة دقيقة واحدة على الأقل.

2. Fill the Neubauer counting chamber by means of a Pasteur pipette or glass capillary.

2. املا غرفة العد نويباور عن طريق ماصة باستير أو الزجاج الشعري.

3. Focus on one of the 'W' marked areas (each having 16 small squares) by turning objective lense to low power. (10 X).

3. ركز على إحدى المناطق التي تم وضع علامة "W" عليها (تحتوي كل منها على 16 مربعاً صغيراً) عن طريق تحويل العدسة الموضوعية إلى طاقة منخفضة. (10 X).

4. Count cells in all four W marked corner

4 الخلايا في جميع الأركان الأربعة التي تحمل علامة W

5. The calculation formula for hemacytometer cell counts determines the number of cells within 1 m L ( $1 \text{ mm}^3$ ) of blood . To make this determination, the total number of cells counted must be corrected for the initial dilution of blood and the volume of diluted blood used. The standard dilution of blood for leukocyte counts is 1:20; therefore the dilution factor is 20. The volume of diluted blood used is based on the area and depth of the counting area. The area counted is  $4 \text{ mm}^2$  and the depth is 0.1 mm; therefore the volume factor is  $0.4 \text{ mm}^3$ .

5. تحدد معادلة حساب عدد خلايا جهاز قياس الدم عدد الخلايا في حدود 1 م لتر (1 مم<sup>3</sup>) من الدم. لإجراء هذا التحديد ، يجب تصحيح العدد الإجمالي للخلايا التي تم عدّها من أجل التخفيف الأولي للدم وحجم الدم المخفف المستخدم. التخفيف القياسي للدم بالنسبة لعدد الكريات البيض هو 1:20 ؛ لذلك فإن عامل التخفيف هو 20. يعتمد حجم الدم المخفف المستخدم على منطقة وعمق منطقة العد. المساحة المحسوبة 4 مم<sup>2</sup> والعمق 0.1 مم. وبالتالي فإن عامل الحجم هو 0.4 مم<sup>3</sup>.

$$\text{Total number of cells counted} \cdot \text{dilution factor} \cdot 1/\text{volume factor} = \text{cells}/\text{mmm}^3$$

إجمالي عدد الخلايا المحسوبة • عامل التخفيف • 1 / عامل الحجم = خلايا / مم 3

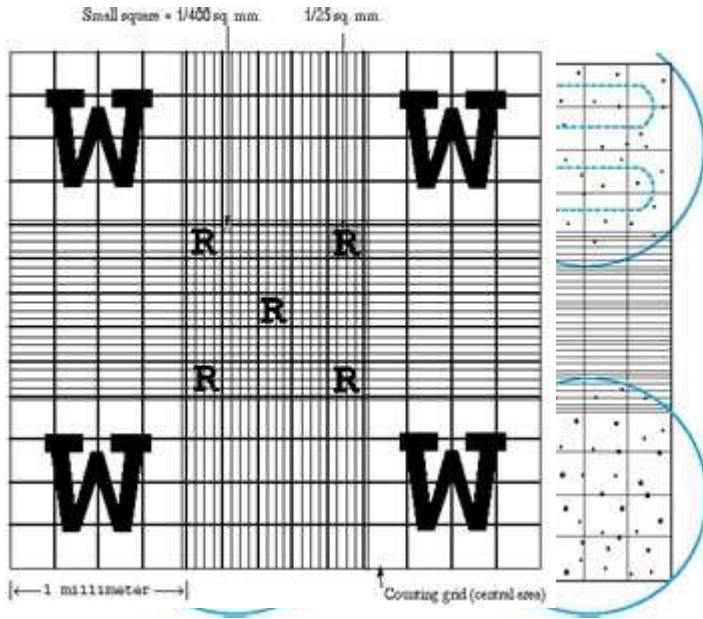
For example if 150 cells were counted in the four corner squares the WBC count is:

على سبيل المثال ، إذا تم حساب 150 خلية في مربعات الزوايا الأربعة ، فسيكون عدد كرات الدم البيضاء

$$150 \times 20 \times 1/0.4 = 7,500 \text{ cells/mm}^3 \text{ or } 7.5 \times 10^9/\text{L}$$

6. The difference between the highest and lowest count for the eight squares should not exceed 10 cells.

6. يجب ألا يتجاوز الفرق بين العد الأعلى والأدنى للمربعات الثمانية 10 خلايا



القيم العادية: Normal values:

- Adults بالغ: 4,000-11,000/cu mm ( $\mu\text{l}$ )
- At birth عند الولادة: 10,000-25,000/cu mm ( $\mu\text{l}$ )
- 1 to 3 years : 6,000-18,000/cu mm ( $\mu\text{l}$ )
- 4 to 7 years : 6,000-15,000/cu mm ( $\mu\text{l}$ )
- 8 to 12 years: 4,500-13,500/cu mm ( $\mu\text{l}$ )

### DIFFERENTIAL W.B.C COUNT عدد خلايا الدم البيضاء التفاضلية

Differential count is the percent distribution of various white cells in the peripheral blood. It is determined from a blood smear stained with a polychromatic stain and after examination of the stained smear by using oil immersion objective (total magnification 1000 X). The number of each type of white cell is then expressed as a percentage of the total number of cells.

العد التفاضلي هو التوزيع المئوي للكريات البيضاء المختلفة في الدم المحيطي. يتم تحديده من مسحة دم ملطخة بصبغة متعددة الألوان وبعد فحص اللطاخة المصبوغة باستخدام هدف الغمر بالزيت (التكبير الكلي 1000 ×). ثم يتم التعبير عن عدد كل نوع من أنواع الخلايا البيضاء كنسبة مئوية من إجمالي عدد الخلايا.

The stained blood smear also helps to study abnormal morphology of leukocytes and red cells. Study of blood smear helps in the diagnosis of various anemias, leukemias and detection of blood parasites. Three major steps involved in differential count are:

تساعد مسحة الدم المصبوغة أيضًا على دراسة التشكل غير الطبيعي للكريات البيض والخلايا الحمراء. تساعد دراسة مسحة الدم في تشخيص مختلف أنواع فقر الدم وسرطان الدم والكشف عن طفيليات الدم. ثلاث خطوات رئيسية متضمنة في العد التفاضلي هي:

- preparation of blood smear تحضير مسحة الدم
- staining of the blood smear.. تلوين مسحة الدم..
- microscopic examination of the stained smear.. الفحص المجهرى للمسحة المصبوغة..

## DIFFERENTIAL W.B.C COUNT TECHNIQUE تقنية عد خلايا الدم البيضاء التفاضلية

- Clean slide before used.. شريحة نظيفة قبل استخدامها..
- Put a small drop of fresh blood on one edge of the slide.

ضع قطرة صغيرة من الدم الطازج على حافة واحدة من الشريحة.

- Spread the blood drop with another glass slide as in figures below.

انشر قطرة الدم بشريحة زجاجية أخرى كما في الأشكال أدناه.

- Leave the slide to dry.. اترك الشريحة حتى تجف..
- Stain ( for 5 min.) Wright stain which is a mixture of two dyes solved with red colour and methylene blue in methyl alcohol solution which consist of an acidic dye called eosin withan alkalin red c color and methylene blue with blue colour.

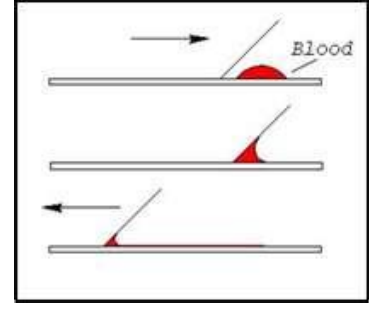
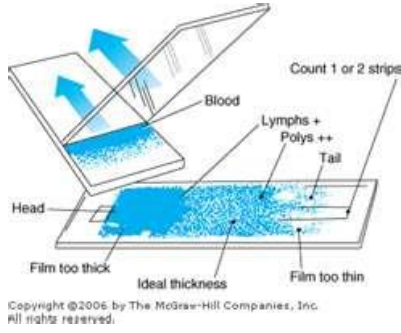
تصبغ (لمدة 5 دقائق) صبغة رايت وهي خليط من صبغتين مذابتين باللون الأحمر والأزرق الميثيل في محلول كحول الميثيل الذي يتكون من صبغة حمضية تسمى يوزين مع لون أحمر قلوي وميثيلين أزرق مع لون أزرق.

- Wash gently with tab water an dry.. اغسل برفق بماء الصنبور وجفف..
- Examine the stained slide under oil immersion lens and count a total of 100 cells and then calculate the relative count leukocytesh type of leukocytes

افحص الشريحة الملوحة تحت عدسة الغمر بالزيت وعد ما مجموعه 100 خلية ثم احسب العد النسبي لنوع الكريات البيض من الكريات البيض

- The film should not be very thin and the tail of the film should be smooth .

يجب ألا يكون الغشاء رقيقاً جداً ويجب أن يكون ذيل الغشاء أملساً.



## ABSOLUTE W.B.C COUNT

عدد

### خلايا الدم البيضاء المطلقة

Counting the real number of each type of leukocytes and not the percentage , therefor it is more accurate than differential count because it gives the exact number of each type of W.B.C and not a percentage. Absolute cell count is calculated as following:

حساب العدد الحقيقي لكل نوع من أنواع كريات الدم البيضاء وليس النسبة المئوية ، لذلك فهو أكثر دقة من العد التفاضلي لأنه يعطي العدد الدقيق لكل نوع من أنواع خلايا الدم البيضاء وليس النسبة المئوية. يتم حساب عدد الخلايا المطلق على النحو التالي

**Absolute Cell Count = % of cells X Total w.B.C count**

عدد الخلايا المطلق = % من الخلايا X إجمالي عدد خلايا الدم البيضاء

Example: patient has a total W.B.C count of 8000 c/mm<sup>3</sup>. Differential count shows 20% lymphocytes, calculate the absolute number of lymphocytes?

مثال: يبلغ إجمالي عدد خلايا الدم البيضاء لدى المريض 8000 ج / مم<sup>3</sup>. يظهر العد التفاضلي 20% الخلايا الليمفاوية ، احسب العدد المطلق للخلايا الليمفاوية؟

8000 X 0.20 (20%)= 1600 it means that this patents has 1600 lymphocytes in every mm<sup>3</sup> of His blood

1600 = (20%) 0.20 × 8000 هذا يعني أن براءة الاختراع هذه تحتوي على 1600 خلية لمفاوية في كل مم<sup>3</sup> من دمه

**القيمة الطبيعية للأعداد المطلقة لخلايا الدم البيضاء: Normal value for absolute numbers of W.B.C**

- خلايا العدلة (2500 -7000) Neutrophile
- الخلايا الحمضية ( 100 -300 ) Eosinophils
- الخلايا القاعدية (40 – 100) Basophil
- الخلايا الليمفاوية ( 1700- 3500) Lymphocytes



## Lab:4 Antigen and antibody المستضد والجسم المضاد

**Antigen (Ag)**, or antibody generator, is any substance which provokes an adaptive immune response. That is to say, an antigen is a molecule that also induces an immune response in the body. An antigen is often foreign or toxic to the body (for example, a bacterium) which, once in the body, attracts and is bound to a respective and specific antibody

المستضد (Ag) ، أو مولد الأجسام المضادة ، هو أي مادة تثير استجابة مناعية تكيفية ، أي أن المستضد هو جزيء يحفز أيضًا استجابة مناعية في الجسم. غالبًا ما يكون المستضد غريبًا أو سامًا للجسم (على سبيل المثال ، بكتيريا) والتي ، بمجرد دخولها الجسم ، تجتذب وترتبط بجسم مضاد محدد ومخصص

**Immunogen:** is in analogy to the antigen a substance (or a mixture of substances) that is able to provoke an immune response if injected to the body. An immunogen is able to initiate an indispensable innate immune response first, later leading to the activation of the adaptive immune response, whereas an antigen is able to bind the highly variable immunoreceptor products (B-cell receptor or T-cell receptor) once these have been produced.

المستمنع (مولد مناعي): على غرار المستضد ، مادة (أو خليط من المواد) قادرة على إثارة استجابة مناعية إذا تم حقنها في الجسم. يمكن للمناعة أن تبدأ استجابة مناعية فطرية لا غنى عنها أولاً ، مما يؤدي لاحقًا إلى تنشيط الاستجابة المناعية التكيفية ، في حين أن المستضد قادر على ربط منتجات المستقبلات المناعية شديدة التغير (مستقبلات الخلايا البائية أو مستقبلات الخلايا التائية) بمجرد أن يتم إنتاجها

**Immunogenicity :** is the ability to induce a humoral and/or cell-mediated immune response

الاستمناع: القدرة على إحداث استجابة مناعية خلوية و / أو خلوية

**Antigenicity** is the ability to combine specifically with the final products of the immune response (i.e. secreted antibodies and/or surface receptors on T-cells). Although all immunogenic molecules are also antigenic, the reverse is not true.

الاستضاد هو القدرة على الاندماج بشكل خاص مع المنتجات النهائية للاستجابة المناعية (أي الأجسام المضادة المفروزة و / أو المستقبلات السطحية على الخلايا التائية). على الرغم من أن جميع جزيئات المناعة هي أيضًا مستضدية ، فإن العكس ليس صحيحًا.

### Property of antigens/ Factors Influencing Immunogenicity

خاصية المستضدات / العوامل التي تؤثر على المناعة

- 1- **Molecular mass:** A smaller molecule does not provoke immune system. The antigens should possess an optimum molecular mass or large molecule which then binds with the



receptors and provoke the immune response. The molecular weight should be between 1000 to 10,000.

1- **الكتلة الجزيئية:** الجزيء الأصغر لا يثير جهاز المناعة. يجب أن تمتلك المستضدات الكتلة الجزيئية المثلى أو الجزيء الكبير الذي يرتبط بعد ذلك بالمستقبلات ويثير الاستجابة المناعية. يجب أن يتراوح الوزن الجزيئي بين 1000 إلى 10000.

2- **Antigenic determinant size:** Antigenic determinant or epitopes are the regions of antigen which specifically binds with the antibody molecule.

2- **الحجم المحدد للأنتيجين:** محدد الأنتيجين أو الحاتمة (المحددة المستضدية) هي مناطق المستضد التي ترتبط بشكل خاص بجزيء الجسم المضاد.

3- **Foreignness:** The immune system normally discriminates between self and non-self-components such that only foreign molecules are immunogenic.

3- **الغزابة:** يميز الجهاز المناعي عادة بين المكونات الذاتية وغير الذاتية بحيث تكون الجزيئات الأجنبية فقط هي من مولدات المناعة.

4- **Chemical Composition:** In general, the more chemically complex substance is the more immunogenic it will be.

التركيب الكيميائي: بشكل عام ، كلما كانت المادة الأكثر تعقيدًا كيميائيًا هي أكثر مناعة.

5- **Physical form :** In general particulate antigens are more immunogenic than soluble one and denatured antigens more immunogenic than the native form.

الشكل الفيزيائي: بشكل عام ، تكون مولدات المضادات الجسيمية أكثر مناعة من المستضدات القابلة للذوبان ذات الصبغة الرملية الواحدة ، وتكون أكثر مناعة من الشكل الأصلي.

6- **Genetic Factors :** Some substances are immunogenic in one species but not in another . Similarly, some substances are immunogenic in one individual but not in others( i.e. responders and non-responders). •The species or individuals may lack or have altered genes that code for the receptors for antigen on B-cells and T- cells . They may not have the appropriate genes needed for the APC to present antigen to the helper T cells.

6- **عوامل وراثية:** بعض المواد تكون مناعية في نوع ما دون غيرها. وبالمثل ، فإن بعض المواد تكون مناعية في فرد واحد ولكن ليس في الآخرين (أي المستجيبين وغير المستجيبين). • قد تفتقر الأنواع أو الأفراد إلى الجينات التي ترمز لمستقبلات المستضدات الموجودة في الخلايا البائية والخلايا التائية أو قاموا بتغييرها. قد لا يكون لديهم الجينات المناسبة اللازمة لـ APC لتقديم المستضد إلى الخلايا التائية المساعدة.

**7- Age:** can also influence immunogenicity. Usually the very young and the very old have diminished ability to elicit and immune response in response to an immunogen.

العمر: يمكن أن يؤثر أيضًا على المناعة. عادة ما يكون لدى الصغار وكبار السن قدرة متناقصة على الاستنباط والاستجابة المناعية استجابةً لمُؤدِّ المناعة.

**epitope**, also known as antigenic determinant, is the part of an antigen that is recognized by the immune system, specifically by antibodies, B cells, or T cells. For example, the epitope is the specific piece of the antigen that an antibody binds to. The part of an antibody that binds to the epitope is called a paratope.

الحاتمة ، المعروف أيضًا باسم محدد المستضد ، هو جزء من مستضد يتعرف عليه الجهاز المناعي ، تحديداً عن طريق الأجسام المضادة أو الخلايا البائية أو الخلايا التائية. على سبيل المثال ، الحاتمة هي القطعة المحددة من مولد الضد التي يرتبط بها الجسم المضاد. يسمى الجزء من الجسم المضاد الذي يرتبط بالحلقة بالمظلة.

### Classification of antigen:: تصنيف المستضد

**1-Complete antigens :** When these antigens enters the body evokes the immune response without any assistant or carrier molecule. They possess both qualities Immunogenicity and Antigenicity.

المستضدات الكاملة: عندما تدخل هذه المستضدات الجسم تثير الاستجابة المناعية دون أي مساعد أو جزيء ناقل. لديهم كل من الصفات المناعية والأنتيجين.

**2- Incomplete antigens or Haptens :**These are the foreign substance they require carrier molecule to act as a complete antigen Such antigens are called as incomplete antigens or **Haptens**.

المستضدات غير المكتملة أو الناشبة(الهبتين): هذه هي المادة الغريبة التي تتطلب جزيءًا حاملًا للعمل كمستضد كامل. تسمى هذه المستضدات كمستضدات غير مكتملة أو الهبتين.

**Haptens** are low molecular weight compounds which are having antigenic property but lacks immunogenic property. The immunogenic property or production of antibody is governed by the carrier molecule. The carrier molecules a non-antigenic component and helps in provoking the immune response.

الناشبة: هي مركبات منخفضة الوزن الجزيئي لها خاصية مستضدية ولكنها تفتقر إلى خاصية المناعة. تخضع الخاصية المناعية أو إنتاج الجسم المضاد للجزيء الحامل. الجزيئات الحاملة مكون غير مستضد وتساعد في إثارة الاستجابة المناعية.

A hapten is equipped with chemically reactive side chains such as

تم تجهيز الناشطة بسلاسل جانبية تفاعلية كيميائياً مثل

- 1- Azide,
- 2- Sulphonates,
- 3- Arsinates and
- 4- Carboxylate .....etc.

•Antibodies are also raised against these groups also. Normally the adjuvant are used as a carrier compound for haptens and making it as complete antigens.

يتم رفع الأجسام المضادة أيضاً ضد هذه المجموعات أيضاً. عادة ما يتم استخدام المادة المساعدة كمركب أكاربيير للهابتين وجعلها كمستضدات كاملة.

**Adjuvants:** It is a chemical, which when administered with the antigens, enhances or provokes the immunity. Adjuvants are chemical suspension or liquids suspension in which antigen or foreign proteins are dissolved. Since most of the antigens are proteinoous in nature, they exhibit a maximum antigenicity if injected simultaneously with the suitable adjuvants

**المواد المساعدة:** هي مادة كيميائية ، عندما يتم تناولها مع المستضدات ، فإنها تعزز المناعة أو تثيرها. المواد المساعدة عبارة عن تعليق كيميائي أو معلق للسوائل يتم فيه إذابة المستضد أو البروتينات الغريبة. نظراً لأن معظم المستضدات بروتينية بطبيعتها ، فإنها تظهر أقصى قدر من الاستضاد إذا تم حقنها في وقت واحد مع المواد المساعدة المناسبة

**The commonly used adjuvants are::** المواد المساعدة شائعة الاستخدام هي:

- 1- **Freund's complete adjuvants:** with lipid suspension with mycobacterium in it .

1- المواد المساعدة الكاملة لفرويد: مع معلق دهني مع المتفطرة فيه.

- 2- **Freud's incomplete adjuvants:** are lipid suspensions or alum suspension without any mycobacterium particles.

2- المواد المساعدة غير المكتملة لفرويد: هي معلقات دهنية أو شبة معلقة بدون أي جسيمات فطرية.

•These adjuvants are enhances the activation of B and T lymphocytes and macrophages. Hence it has tremendous importance in the vaccine production and injection.

تعمل هذه المواد المساعدة على تعزيز تنشيط الخلايا الليمفاوية B و T والبلاعم. ومن ثم فإن لها أهمية كبيرة في إنتاج اللقاح وحقنه.

**Adjuvants can react in Several Ways** طرق : يمكن أن تتفاعل المواد المساعدة بعدة طرق

- 1- Alter the distribution and persistence of antigen within the positive host

تغيير توزيع واستمرار المستضد داخل المضيف الإيجابي

2- Stimulate lymphocytes production non-specifically.

تحفيز إنتاج الخلايا اللمفاوية غير على وجه التحديد.

3- Activate macrophages..تفعيل البلاعم

4- Alter traffic of circulating lymphocytes تغيير حركة مرور الخلايا الليمفاوية المنتشرة

### أنواع المستضدات Types of antigens

1- Exogenous antigens: These antigens enters the body or system and start circulating in the body fluids and trapped by the APCs(Antigen processing cells such as macrophages, dendritic cells .....etc.). The uptakes of these exogenous antigens by APCs are mainly mediated by the phagocytosis. Ex: bacteria, viruses, Fungi etc

المستضدات الخارجية: تدخل هذه المستضدات الجسم أو النظام وتبدأ في الدوران في سوائل الجسم وتحتجز بواسطة APCs (خلايا معالجة المستضد مثل البلاعم و الخلايا الجذعية ... إلخ). يتم التوسط في امتصاص هذه المستضدات الخارجية عن طريق البلعمة بشكل أساسي. على سبيل المثال: البكتيريا والفيروسات والفطريات وما إلى ذلك

2- Endogenous antigens: These are body's own cells or sub fragments or compounds or the antigenic products that are produced

2- المستضدات الداخلية: وهي خلايا الجسم أو شظايا فرعية أو مركبات أو نواتج مستضدية يتم إنتاجها.

**Antibody (Ab) Structure:** Antibodies are immune system-related proteins called immunoglobulins. They are specialized proteins that travel thorough the blood stream and are found in bodily fluids. They are utilized by the immune system to identify and defend against foreign intruders to the body. Antibodies recognize specific antigens by identifying certain areas on the surface of the antigen known as antigenic determinants. Once the specific antigenic determinant is recognized, the antibody will bind to the determinant. The antigen is tagged as an intruder and labeled for destruction by other immune cells.

هيكل الجسم المضاد (Ab): الأجسام المضادة هي بروتينات مرتبطة بجهاز المناعة تسمى الغلوبولين المناعي. إنها بروتينات متخصصة تنتقل عبر مجرى الدم وتوجد في سوائل الجسم. يتم استخدامها من قبل جهاز المناعة لتحديد الدخلاء الأجانب على الجسم والدفاع ضدهم. تتعرف الأجسام المضادة على مستضدات معينة عن طريق تحديد مناطق معينة على سطح المستضد المعروفة باسم محددات المستضدات. بمجرد التعرف على محدد المستضد المحدد ، سيرتبط الجسم المضاد بالمحدد. يتم تمييز المستضد على أنه دخيل ويتم تسميته للتدمير بواسطة الخلايا المناعية الأخرى.

Antibody consists of two short polypeptide chains called light chains and two longer polypeptide chains called heavy chains. The two light chains are identical to each other and the two heavy chains are identical to each other. At the ends of both the heavy and light

chains, in the areas that form the arms of the Y-shaped structure, are regions known as antigen-binding sites.

يتكون الجسم المضاد من سلسلتين قصيرتين من عديد الببتيد تسمى السلاسل الخفيفة وسلاسل متعددة الببتيد الأطول تسمى السلاسل الثقيلة. السلسلتان الخفيفتان متطابقتان مع بعضهما البعض والسلسلتان الثقيلتان متطابقتان مع بعضهما البعض. في نهايات كل من السلاسل الثقيلة والخفيفة ، في المناطق التي تشكل أذرع الهيكل على شكل Y ، توجد مناطق تُعرف باسم مواقع ربط مولد الضد.

The antigen-binding site is the area of the antibody that recognizes the specific antigenic determinant and binds to the antigen. Since different antibodies recognize different antigens, antigen-binding sites are different for different antibodies. This area of the molecule is known as the variable region.

موقع ارتباط مولد الضد هو منطقة الجسم المضاد التي تتعرف على محدد مولد الضد المحدد وترتبط بمولد الضد. نظرًا لأن الأجسام المضادة المختلفة تتعرف على مستضدات مختلفة ، فإن مواقع ارتباط المستضد تختلف باختلاف الأجسام المضادة. تُعرف هذه المنطقة من الجزيء بالمنطقة المتغيرة.

This region, composed of 110-130 amino acids, give the antibody its specificity for binding antigen. The stem of the Y-shaped molecule is formed by the longer region of the heavy chains. This region is called the constant region.

هذه المنطقة ، المكونة من 110-130 من الأحماض الأمينية ، تعطي الجسم المضاد خصوصيته لربط مولد الضد. يتكون جذع الجزيء على شكل Y من المنطقة الأطول من السلاسل الثقيلة. هذه المنطقة تسمى المنطقة الثابتة.

Antibodies are divided into five major classes, **IgM, IgG, Iga, IgD, and IgE**, based on their constant region structure and immune function.

تنقسم الأجسام المضادة إلى خمس فئات رئيسية ، IgM ، و IgG ، و Iga ، و IgD ، و IgE ، بناءً على بنية المنطقة الثابتة ووظيفة المناعة.

- IgG: These molecules are the most plentiful in circulation. They can cross blood vessels and even the placenta to provide protection to a fetus. The heavy chain type in IgG is a gamma chain.

IgG: هذه الجزيئات هي الأكثر وفرة في الدورة الدموية. يمكنهم عبور الأوعية الدموية وحتى المشيمة لتوفير الحماية للجنين. نوع السلسلة الثقيلة في IgG هو سلسلة جاما.

- IgM: Of all of the immunoglobulins, these are the most massive. They contain five Y-shaped sections each with two light chains and two heavy chains. Each Y-shaped section is attached to a joining unit called a J chain. IgM molecules play a major role in the primary

immune response as the initial respondents to new antigens in the body. The heavy chain type in IgM is a mu chain.

• IgM: من بين جميع الغلوبولين المناعي ، هذه هي الأكبر. تحتوي على خمسة أقسام على شكل حرف Y لكل منها سلسلتان خفيفتان وسلسلتان ثقيلتان. يتم إرفاق كل قسم على شكل Y بوحدة ربط تسمى سلسلة J. تلعب جزيئات IgM دورًا رئيسيًا في الاستجابة المناعية الأولية كمستجيبين أوليين لمولدات المضادات الجديدة في الجسم. نوع السلسلة الثقيلة في IgM هو سلسلة mu.

• IgA: Located mainly in body fluids such as sweat, saliva, and mucus, these antibodies prevent antigens from infecting cells and entering the circulatory system. The heavy chain type in IgA is an alpha chain.

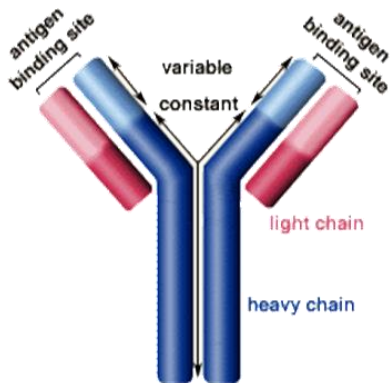
• IgA: توجد هذه الأجسام المضادة بشكل أساسي في سوائل الجسم مثل العرق واللعاب والمخاط ، وتمنع المستضدات من إصابة الخلايا ودخول الدورة الدموية. نوع السلسلة الثقيلة في IgA هو سلسلة ألفا.

• IgD: The role of these antibodies in the immune response is currently unknown. IgD molecules are located on the surface membranes of mature B cells. The heavy chain type in IgD is a delta chain.

• IgD: دور هذه الأجسام المضادة في الاستجابة المناعية غير معروف حاليًا. توجد جزيئات IgD على الأغشية السطحية للخلايا البائية الناضجة. نوع السلسلة الثقيلة في IgD هو سلسلة دلتا.

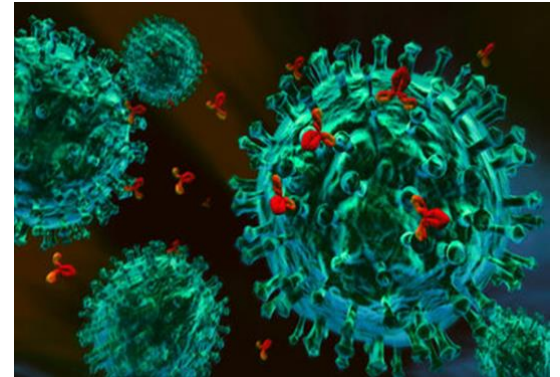
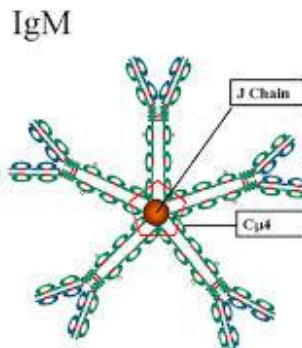
IgE: Found mostly in saliva and mucus, these antibodies are involved in allergic responses to antigens. The heavy chain type in IgE is an epsilon chain.

IgE: توجد في الغالب في اللعاب والمخاط ، وهذه الأجسام المضادة لها دور في ردود الفعل التحسسية تجاه المستضدات. نوع السلسلة الثقيلة في IgE هو سلسلة إبسيلون.



• Structure

- Pentamer (19S)
- Extra domain (C<sub>H4</sub>)
- J chain



## **Antigen-antibody interactions.**

### تفاعلات الأجسام المضادة للأدوات المضادة.

Antigen-antibody interaction, or antigen-antibody reaction, is a specific chemical interaction between antibodies produced by B- lymphocytes and antigens forming what called immune complex during immune response.

تفاعل المستضد مع الجسم المضاد ، أو تفاعل الجسم المضاد مع المستضد ، هو تفاعل كيميائي محدد بين الأجسام المضادة التي تنتجها الخلايا الليمفاوية البائية والمستضدات التي تشكل ما يسمى المركب المناعي أثناء الاستجابة المناعية.

It is the fundamental reaction in the body by which the body is protected from complex foreign molecules, such as pathogens and their chemical toxins. In the blood

إنه رد الفعل الأساسي في الجسم الذي يتم من خلاله حماية الجسم من الجزيئات الغريبة المعقدة ، مثل مسببات الأمراض وسمومها الكيميائية. في الدم،

, the antigens are specifically bound by antibodies to form an antigen-antibody complex. The immune complex is then transported to cellular immune systems where it can be destroyed or deactivated.

ترتبط المستضدات على وجه التحديد بالأجسام المضادة لتشكيل مركب مستضد - جسم مضاد. ثم يتم نقل المركب المناعي إلى أجهزة المناعة الخلوية حيث يمكن تدميره أو تعطيله.

There are several types of antibodies and antigens, and each antibody is capable of binding only to a specific antigen. The specificity of the binding is due to specific chemical constitution of each antibody.

هناك عدة أنواع من الأجسام المضادة ومولدات المضادات ، وكل جسم مضاد قادر على الارتباط بمولد ضد معين فقط. تعود خصوصية الارتباط إلى التكوين الكيميائي المحدد لكل جسم مضاد.

The antigenic determinant or epitope of antigens is recognized by the variable region of the Antibody .

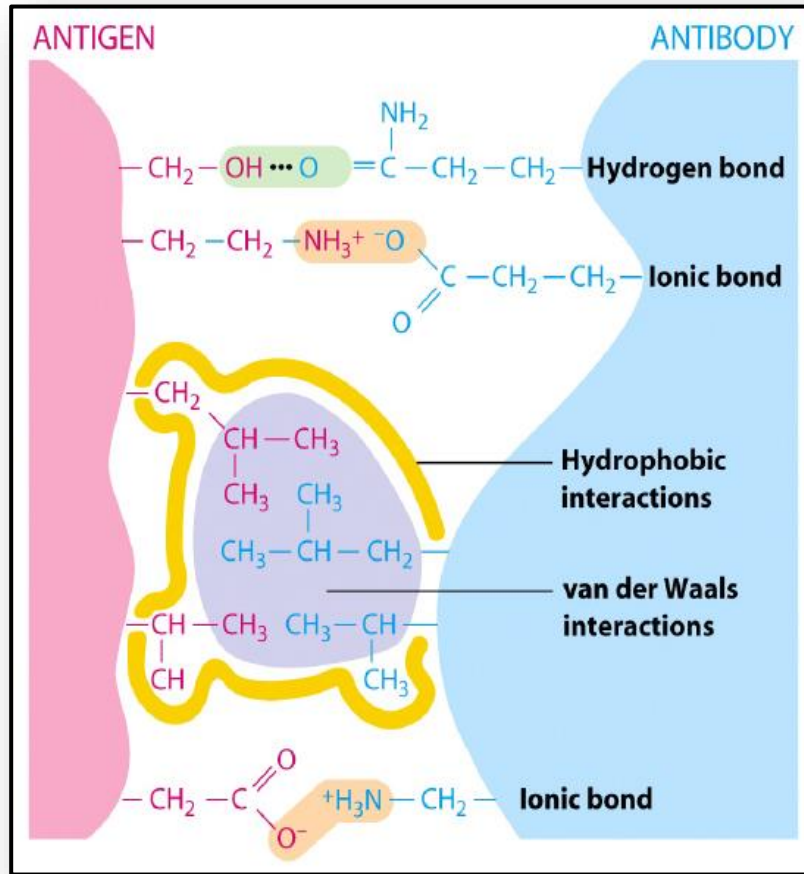
يتم التعرف على محدد المستضد أو حاتمة المستضدات من خلال المنطقة المتغيرة من الجسم المضاد.

Antigens are bound to antibodies through weak and noncovalent bonds such as electrostatic interactions, hydrogen bonds, Van der Waals forces, and hydrophobic interactions.

ترتبط المستضدات بالأجسام المضادة من خلال الروابط الضعيفة وغير التساهمية مثل التفاعلات الكهروستاتيكية ، والروابط الهيدروجينية ، وقوى فان دير فال ، والتفاعلات الكارهة للماء.

as these bondings are very weak so large number of such bondings are required. The strength of antigen-antibody interaction is expressed in terms of avidity and affinity.

نظرًا لأن هذه الروابط ضعيفة جدًا ، فإن عددًا كبيرًا من هذه الروابط مطلوب. يتم التعبير عن قوة تفاعل المستضد مع الجسم المضاد من حيث الشغف والتقارب.



Factors affect reaction

Ag-Ab

## 1. Antibody Affinity. تقارب الجسم المضاد .

Measures the strength of interaction between an epitope and an antibody's antigen binding site (Fab).

يقيس قوة التفاعل بين الحاتمة وموقع ارتباط مولد الضد الخاص بالجسم المضاد (Fab).

High-affinity antibodies will bind a greater amount of antigen in a shorter period of time than low-affinity antibodies and that can be influenced by factors including pH, temperature and buffer composition.

سترابط الأجسام المضادة عالية التقارب كمية أكبر من مولد الضد في فترة زمنية أقصر من الأجسام المضادة منخفضة التقارب ويمكن أن تتأثر بعوامل تشمل الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة وتركيب المخزن المؤقت.

## 2. Antibody Avidity. شغف الجسم المضاد

Gives a measure of the overall strength of an antibody-antigen complex. It is dependent on three major parameters:

يعطي مقياساً للقوة الكلية لمركب مضاد - مستضد. يعتمد على ثلاث معايير رئيسية:

- Affinity of the antibody for the epitope. تقارب الجسم المضاد للحلقة.
- Valency of both the antibody and antigen.. تكافؤ كل من الجسم المضاد والمستضد.
- Structural arrangement of the parts that interact. الترتيب الهيكلي للأجزاء التي تتفاعل.

All antibodies are multivalent e.g. IgGs are bivalent and IgMs are decavalent. The greater an immunoglobulin's valency (number of antigen binding sites)



جميع الأجسام المضادة متعددة التكافؤ مثل: IgGs ثنائية التكافؤ و IgMs غير متساوية. كلما زاد تكافؤ الغلوبولين المناعي (عدد مواقع ارتباط المستضد) ،

, the greater the amount of antigen it can bind. Similarly, antigens can demonstrate multivalency because they can bind to more than one antibody. Multimeric interactions between an antibody and an antigen help their stabilization.

كلما زادت كمية المستضد الذي يمكن أن يرتبط به. وبالمثل ، يمكن أن تُظهر المستضدات تعدد التكافؤ لأنها يمكن أن ترتبط بأكثر من جسم مضاد واحد. تساعد التفاعلات المتعددة بين الجسم المضاد والمستضد على استقرارها.

### 3. Antibody Specificity

An antibody has distinct specificity for a certain antigen.

خصوصية الجسم المضاد

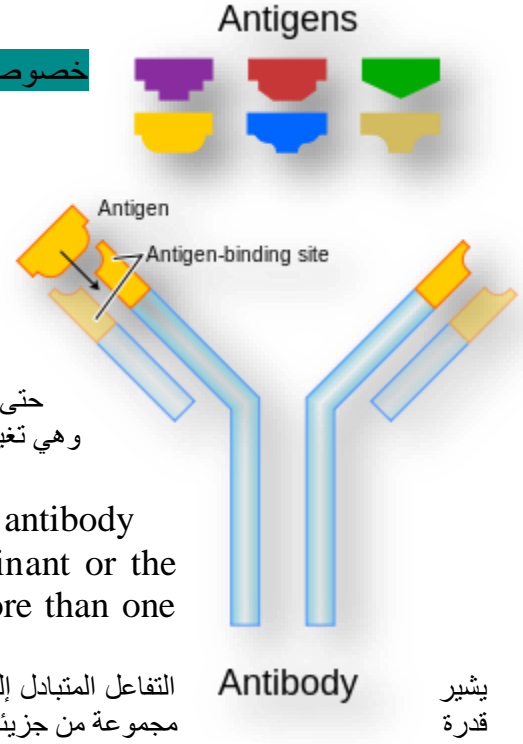
يمتلك الجسم المضاد خصوصية مميزة لمستضد معين.

The antibody is even capable of distinguishing tiny differences in antigen structure such as isomers, which are small changes in chemical bonds.

حتى أن الجسم المضاد قادر على تمييز الاختلافات الصغيرة في بنية المستضد مثل الأيزومرات ، وهي تغييرات صغيرة في الروابط الكيميائية.

Cross reactivity refers to the ability of an individual antibody combining site to react with more than one antigenic determinant or the ability of a population of antibody molecules to react with more than one antigen.

التفاعل المتبادل إلى قدرة الجسم المضاد الفردي الذي يجمع الموقع على التفاعل مع أكثر من محدد مولد مضاد أو مجموعة من جزيئات الجسم المضاد على التفاعل مع أكثر من مولد ضد واحد



Cross reactions arise because the cross reacting antigen shares an epitope in common with the immunizing antigen or because it has an epitope which is structurally similar to one on the immunizing antigen (multispecificity).

تنشأ التفاعلات المتصالبة لأن مستضد التفاعل المتصالب يشترك في حاتمة مشتركة مع مستضد التحصين أو لأنه يحتوي على حاتمة تشبه هيكلًا تلك الموجودة على مستضد التحصين (متعدد الأنواع).

### 4. Physical form of the antigen. الشكل المادي للمستضد

The physical form of the antigen influences how one detects its reaction with an antibody. If the antigen is a particulate, one generally looks for agglutination of the antigen by the antibody.

يؤثر الشكل المادي للمستضد على كيفية اكتشاف تفاعله مع الجسم المضاد. إذا كان المستضد عبارة عن جسيم ، فعادة ما يبحث المرء عن تراسس المستضد بواسطة الجسم المضاد

If the antigen is soluble one generally looks for the precipitation of the antigen after the production of large insoluble antigen-antibody complexes.

إذا كان المستضد قابلاً للذوبان ، يبحث المرء عمومًا عن ترسيب المستضد بعد إنتاج مجمعات كبيرة غير قابلة للذوبان من المستضد والأجسام المضادة.

### 5. Antigen to antibody ratio . نسبة المستضد إلى الجسم المضاد

it is very effective in detecting immunocomplexes .

إنه فعال للغاية في الكشف عن المركبات المناعية.

**Prozone** : is a possible cause of False-Negative antigen-antibody reaction caused by Excessive amount of antibody

**Prozone**: هو سبب محتمل لتفاعل الجسم المضاد السلبي الكاذب الناتج عن الكمية الزائدة من الجسم المضاد

**Postzone** : refers to the Excess of antigen resulting in no lattice formation in an agglutination reaction


**Postzone**: يشير إلى فائض المستضد الذي ينتج عنه عدم تكوين شعرية في تفاعل التراص

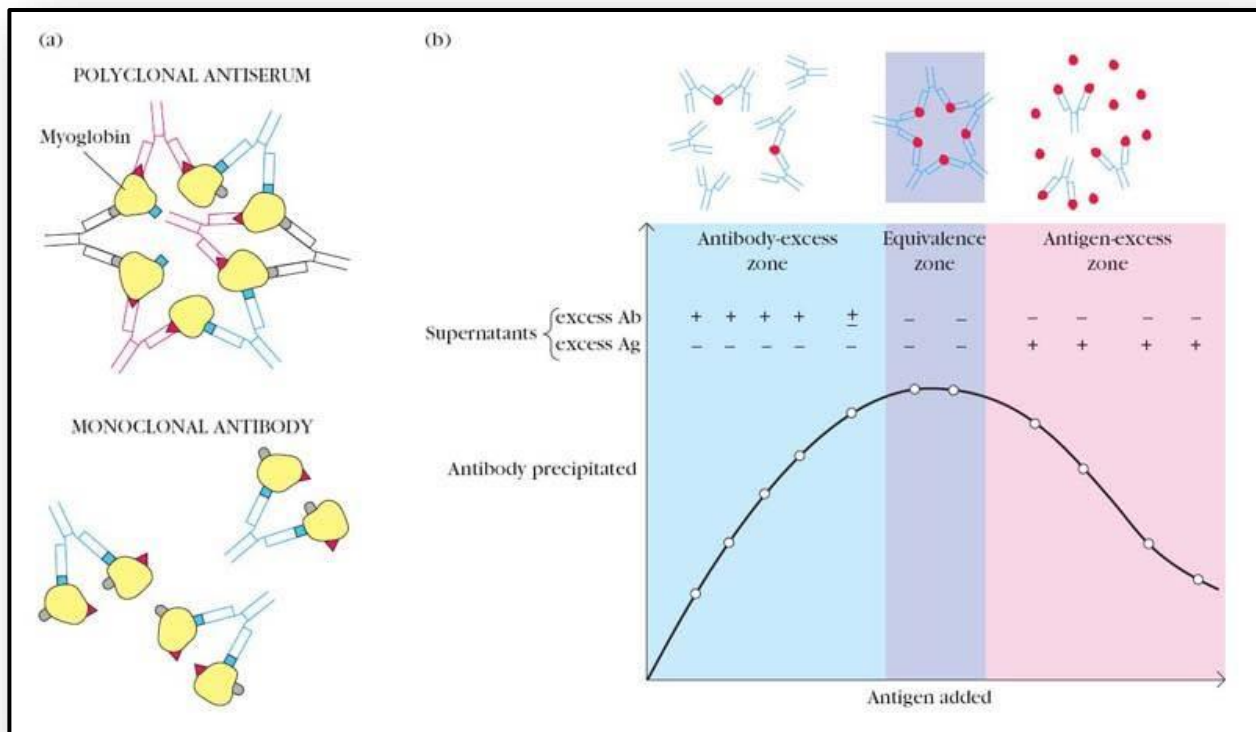
**equivalence zone:**

a variable ratio of antigen and antibody which results in precipitation in which there is no unbound antibody or antigen.

منطقة التكافؤ:

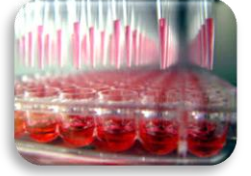
نسبة متغيرة من المستضد والجسم المضاد ينتج عنها ترسيب لا يوجد فيها جسم مضاد أو مستضد غير منضم.

Believe you can do it, and you'll be halfway there 



## Lab. 8

# Enzyme - Linked Immunosorbent Assay Also known as ELISA



The ELISA is a rapid test used for detecting and quantifying antibodies or antigens against viruses, bacteria and other materials. This method can be used to detect many infectious agents affecting poultry and livestock.

ELISA هو اختبار سريع يستخدم لاكتشاف وقياس الأجسام المضادة أو المستضدات ضد الفيروسات والبكتيريا والمواد الأخرى. يمكن استخدام هذه الطريقة للكشف عن العديد من العوامل المعدية التي تصيب الدواجن والماشية.

In ELISA technology, the solid phase consists of a 96-well polystyrene plate, although other materials can be used. The function of the solid phase is to immobilize either antigens or antibodies in the sample, as they bind to the solid phase. After incubation, the plates are washed to remove any unbound material.

في تقنية ELISA ، تتكون المرحلة الصلبة من صفيحة بوليستيرين ذات ٩٦ بئر ، على الرغم من إمكانية استخدام مواد أخرى. تتمثل وظيفة المرحلة الصلبة في تثبيت المستضدات أو الأجسام المضادة في العينة ، لأنها ترتبط بالطور الصلب. بعد الحضانة ، يتم غسل الألواح لإزالة أي مادة غير منضمة

In some assays the conjugate is then added to the plate and allowed to incubate. The conjugate consists of either an antigen or antibody that has been labeled with an enzyme. Depending upon the assay format, the immunologically reactive portion of the conjugate binds with either the solid phase or the sample.

في بعض المقاييس ، يضاف المتقارن إلى اللوحة ويسمح له بالاحتضان. يتكون الاتحاد من مستضد أو جسم مضاد تم تسميته بإنزيم. اعتماداً على تنسيق الفحص ، يرتبط الجزء التفاعلي من الناحية المناعية من الاتحاد مع المرحلة الصلبة أو العينة

The enzyme portion of the conjugate enables detection. The plates are washed again and an enzyme substrate (hydrogen peroxide and a chromogen) is added and allowed to incubate. Color develops in the presence of bound enzyme and the optical density is read with an ELISA plate reader.

يتيح جزء الإنزيم من الاتحاد الكشف. تُغسل الألواح مرة أخرى ويُضاف ركيزة إنزيم (بيروكسيد الهيدروجين وكرموجين) ويُسمح لها بالاحتضان. يتطور اللون في وجود إنزيم مرتبط وتتم قراءة الكثافة الضوئية باستخدام قارئ لوحة ELISA.

**NOTE: The steps and reagents used can vary in an ELISA assay. It is best to reference the test insert for specific information on the technology for the assay being worked with.**

**ملاحظة: يمكن أن تختلف الخطوات والكواشف المستخدمة في مقاييس ELISA من الأفضل الرجوع إلى ملحق الاختبار للحصول على معلومات محددة حول تقنية الفحص الجاري العمل به.**

## **ELISA Types**

ELISAs are divided into several types.

**Indirect ELISA:** In the indirect format, the sample antibody is sandwiched between the antigen coated on the plate and an enzyme-labeled, anti-species globulin conjugate. The addition of an enzyme substrate-chromogen reagent causes color to develop.

**ELISA غير المباشر:** في الشكل غير المباشر ، يتم وضع الجسم المضاد للعينة بين المستضد المطلي على الصفيحة وبين اتحاد الجلوبيولين المضاد لأنواع المسمى بالإنزيم. تؤدي إضافة كاشف إنزيم الركيزة الكروموجين إلى ظهور اللون

This color is directly proportional to the amount of bound sample antibody. The more antibody present in the sample, the stronger the color development in the test wells. This format is suitable for determining total antibody level in samples.

. هذا اللون يتناسب طرديا مع كمية عينة الجسم المضاد المرتبطة. كلما زاد عدد الأجسام المضادة في العينة ، زاد تطور اللون في آبار الاختبار. هذا التنسيق مناسب لتحديد مستوى الجسم المضاد الكلي في العينات.

**Competitive ELISA:** In this format, the specific sample antibodies compete with, or block, the enzyme-labeled, specific antibody in the conjugate. The addition of an enzyme substrate-chromogen reagent causes color to develop. This color is inversely proportional to the amount of bound sample antibody. The more antibodies present in the sample, the less color development in the test wells.

**ELISA التنافسي:** في هذا الشكل ، تتنافس الأجسام المضادة المحددة للعينة مع ، أو تحجب ، الجسم المضاد المحدد الذي يحمل علامة الإنزيم في الاتحاد. تؤدي إضافة كاشف إنزيم الركيزة الكروموجين إلى ظهور اللون. هذا اللون يتناسب عكسياً مع كمية عينة الجسم المضاد المرتبطة. كلما زاد عدد الأجسام المضادة الموجودة في العينة ، قل تطور اللون في آبار الاختبار.

**Antigen-Capture (Direct) ELISA:** In the antigen-capture format, the antigen in the sample is sandwiched between antibodies coated on the plate and an enzyme-labeled conjugate. The antibody conjugate can be either monoclonal or polyclonal. The addition of an enzyme substrate-chromogen reagent causes color to develop. This color is directly proportional to the amount of the target antigen present in the sample.

**ELISA التقاط المستضد (المباشر):** في تنسيق التقاط مولد الضد ، يتم وضع المستضد في العينة بين الأجسام المضادة المغلفة على اللوحة وبين اتحاد يحمل علامة إنزيم. يمكن أن يكون اتحاد الجسم المضاد أحادي النسيلة أو متعدد النسيلة. تؤدي إضافة كاشف إنزيم الركيزة الكروموجين إلى ظهور اللون. هذا اللون يتناسب طرديا مع كمية المستضد المستهدف الموجود في العينة.

## **ELISA kit components**

### **Coated Plates** لوحات مطلية

The 96-well plates are made of polystyrene and coated with either inactivated antigen or antibody. This coating is the binding site for the antibodies or antigens in the sample. Unbound antibodies or antigens in the sample are washed away after incubation.

صُنعت الألواح المكونة من ٩٦ بئرًا من البوليستيرين ومغلقة إما بمولد ضد معطل أو بجسم مضاد. هذا الغلاف هو موقع الارتباط للأجسام المضادة أو المستضدات في العينة. يتم غسل الأجسام المضادة أو المستضدات غير المقيدة في العينة بعد الحضانة.

### عينة مخفف Sample Diluent

Most assays require a specific dilution of the sample. Samples are added to the sample diluent and mixed prior to putting them onto the coated plates.

تتطلب معظم المقاييس تخفيفًا محددًا للعينة. تُضاف العينات إلى المادة المخففة للعينة وتُخلط قبل وضعها على الألواح المطلوبة.

### ضوابط Controls

The positive control is a solution that contains antibody or antigen. The negative control is a solution without antibody or antigen. The controls help to normalize or standardize each plate. Controls are also used to validate the assay and to calculate sample results. In most tests, the controls are prediluted and ready to use. Be sure to follow the instructions in the package insert.

التحكم الإيجابي هو محلول يحتوي على جسم مضاد أو مستضد. التحكم السلبي هو محلول بدون جسم مضاد أو مستضد. تساعد أدوات التحكم في تطبيع أو توحيد كل لوحة. كما تستخدم الضوابط للتحقق من صحة الفحص ولحساب نتائج العينة. في معظم الاختبارات، تكون عناصر التحكم مخففة مسبقًا وجاهزة للاستخدام. تأكد من اتباع التعليمات الواردة في النشرة الداخلية للحزمة.

### المتراصة Conjugate

ELISA conjugates are enzyme-labeled antibodies or antigens that react specifically to plate-bound sample analytes. Unbound conjugate is washed away after incubation and before the addition of substrate. The optical density of the colorimetric substrate is directly proportional to the quantity of bound enzyme present.

اتحادات ELISA عبارة عن أجسام مضادة أو مستضدات تحمل علامات الإنزيم وتتفاعل بشكل خاص مع تحليلات العينة المرتبطة بالصفائح. يتم غسل الاتحاد غير المرتبط بعد الحضانة وقبل إضافة الركيزة. تتناسب الكثافة الضوئية للركيزة اللونية بشكل مباشر مع كمية الإنزيم المرتبط الموجود.

### المادة المتفاعلة Substrate

For peroxidase conjugates, the substrate is a mixture of hydrogen peroxide and a chromogen that reacts with the enzyme portion of the conjugate to produce color.

بالنسبة إلى اتحادات البيروكسيداز، تكون الركيزة عبارة عن خليط من بيروكسيد الهيدروجين وكروموجين يتفاعل مع جزء الإنزيم من الاتحاد لإنتاج اللون.

### يغسل المركز Wash Concentrate

The wash concentrate is a buffered solution containing detergent used to wash away unbound materials from the plates.














مركز الغسيل عبارة عن محلول مخزن يحتوي على منظف يستخدم لغسل المواد غير الملتصقة من الألواح

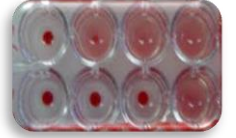
### وقف المحلول Stop Solution

The stop solution stops the enzyme-substrate reaction and, thereby, the color development.

يوقف محلول التوقف تفاعل الركيزة الإنزيمية، وبالتالي تطور اللون.

**Important signs that you might see on ELISA kit**  
علامات مهمة قد تراها على مجموعة ELISA

												
Lot-Number	European conformity	For <i>in-vitro</i> diagnostic use	Temperature Limit	Use before	Catalogue Number	Consult instructions for use	Refer to accompanying documents	Do not use when package is damaged	Do not Re-use	Sufficient for <n> tests	Manufactured by	Biohazard



## Lab. 9

## Complement Fixation Test

### (CFT)

The **complement fixation test** is an immunological medical test that can be used to detect the presence of either specific antibody or specific antigen in a patient's serum. It was widely used to diagnose infections, particularly with microbes that are not easily detected by culture methods, and in rheumatic diseases.

ختبار تثبيت المكمل هو اختبار طبي مناعي يمكن استخدامه للكشف عن وجود جسم مضاد محدد أو مستضد معين في مصل المريض. تم استخدامه على نطاق واسع لتشخيص العدوى ، خاصةً مع الميكروبات التي لا يمكن اكتشافها بسهولة عن طريق طرق الزراعة ، وفي الأمراض الروماتيزمية.

However, in clinical diagnostics labs it has been largely replaced by other serological methods such as ELISA and by DNA-based methods of pathogen detection, particularly PCR.

ومع ذلك ، في مختبرات التشخيص السريري ، تم استبداله إلى حد كبير بطرق مصلية أخرى مثل ELISA والطرق القائمة على الحمض النووي للكشف عن مسببات الأمراض ، وخاصة PCR.

The complement fixation test (CFT) was extensively used in syphilis serology after being introduced by Wasserman in 1909. It took a number of decades before the CFT was adapted for routine use in virology.

تم استخدام اختبار التثبيت التكميلي (CFT) على نطاق واسع في مصل الزهري بعد أن قدمه واسرمان في عام 1909. وقد استغرق الأمر عدة عقود قبل أن يتم تكيف CFT للاستخدام الروتيني في علم الفيروسات.

### CFT meet the following criteria

- it is convenient and rapid to perform
  - the demand on equipment and reagents is small
  - a large variety of test antigens are readily available
- CFT يلبي المعايير التالية
- أنها مريحة وسريعة الأداء
  - الطلب على المعدات والكواشف ضئيل
  - مجموعة كبيرة ومتنوعة من مستضدات الاختبار متاحة بسهولة.

**Complement**, a protein constituent of normal blood serum, is consumed (fixed) during the interaction of antigens and antibodies. The phenomenon forms the basis for the complement fixation test, which is sensitive test that can be used to detect and quantitate antigens and antibodies.

المكمل ، وهو بروتين مكون من مصل الدم الطبيعي ، يتم استهلاكه (ثابت) أثناء تفاعل المستضدات والأجسام المضادة. تشكل هذه الظاهرة أساس اختبار تثبيت المكمل ، وهو اختبار حساس يمكن استخدامه لاكتشاف وتحديد المستضدات والأجسام المضادة.

## CFT consists of two steps:

The primary reacting ingredients are known antigen, antiserum, and guinea pigs complement. من المعروف أن المكونات الأولية المتفاعلة هي المستضد والمصل وخنزير غينيا المتممة.

**1. Complement Fixation Step:** In the first step a known antigen and inactivated patient's serum (serum which is heated to 56°C to inactive native complement) are incubated with a standardized, limited amount of complement. If the serum contains specific, complement activating antibody the complement will be activated or fixed by the antigen-antibody complex.

خطوة التثبيت التكميلي: في الخطوة الأولى ، يتم تحضين مستضد معروف ومصل المريض المعطل (مصل يتم تسخينه إلى 56 درجة مئوية إلى مكمل أصلي غير نشط) بكمية موحدة ومحدودة من المكمل. إذا كان المصل يحتوي على جسم مضاد تنشيط مكمل محدد ، فسيتم تنشيط المكمل أو تثبيته بواسطة مركب الجسم المضاد للمستضد.

However, if there is no antibody in the patient's serum, there will be no formation of antigen-antibody complex, and therefore complement will not be fixed. But will remain free. This initial reaction, however, cannot be seen.

ومع ذلك ، إذا لم يكن هناك جسم مضاد في مصل المريض ، فلن يكون هناك تكوين لمركب جسم مضاد للمستضد ، وبالتالي لن يتم إصلاح المكمل. لكنها ستبقى حرة ، ومع ذلك ، لا يمكن رؤية رد الفعل الأولي.

**2. Indicator Stage:** In a second step, an indicator system (hemolysin) consisting of sheep red blood cell (SRBC) plus antibody specific for SRBC, is added to test for the presence of free complement. Interpretation of the test is based on the presence of hemolysis.

مرحلة المؤشر: في الخطوة الثانية ، يتم إضافة نظام مؤشر (Hemolysin) يتكون من خلايا الدم الحمراء للأغنام (SRBC) بالإضافة إلى الجسم المضاد الخاص بـ SRBC ، لاختبار وجود مكمل حر. يعتمد تفسير الاختبار على وجود انحلال الدم.

1. If all the complement has been fixed, none will be free to lyse the SRBCs, which constitutes a positive complement fixation test.

إذا تم إصلاح كل العناصر التكميلية ، فلن يكون أي منها حراً في اختبار SRBCs ، والذي يشكل اختبار تثبيث تكميلي إيجابي.

2. If no antibody is present in the patient's serum, then the complement is not fixed and is free to interact in the indicator system and lyse the SRBCs, which constitutes a negative complement fixation test.

في حالة عدم وجود جسم مضاد في مصل المريض ، فلن يكون المكمل ثابتاً ويكون حراً في التفاعل في نظام المؤشرات ويؤدي إلى اختبار SRBCs ، والذي يشكل اختبار تثبيث مكمل سلبي.



3. Properly conducted complement fixation tests require the incorporation of appropriate controls of ensure that the result are not adversely affected by the presence of anticomplementary ingredients.

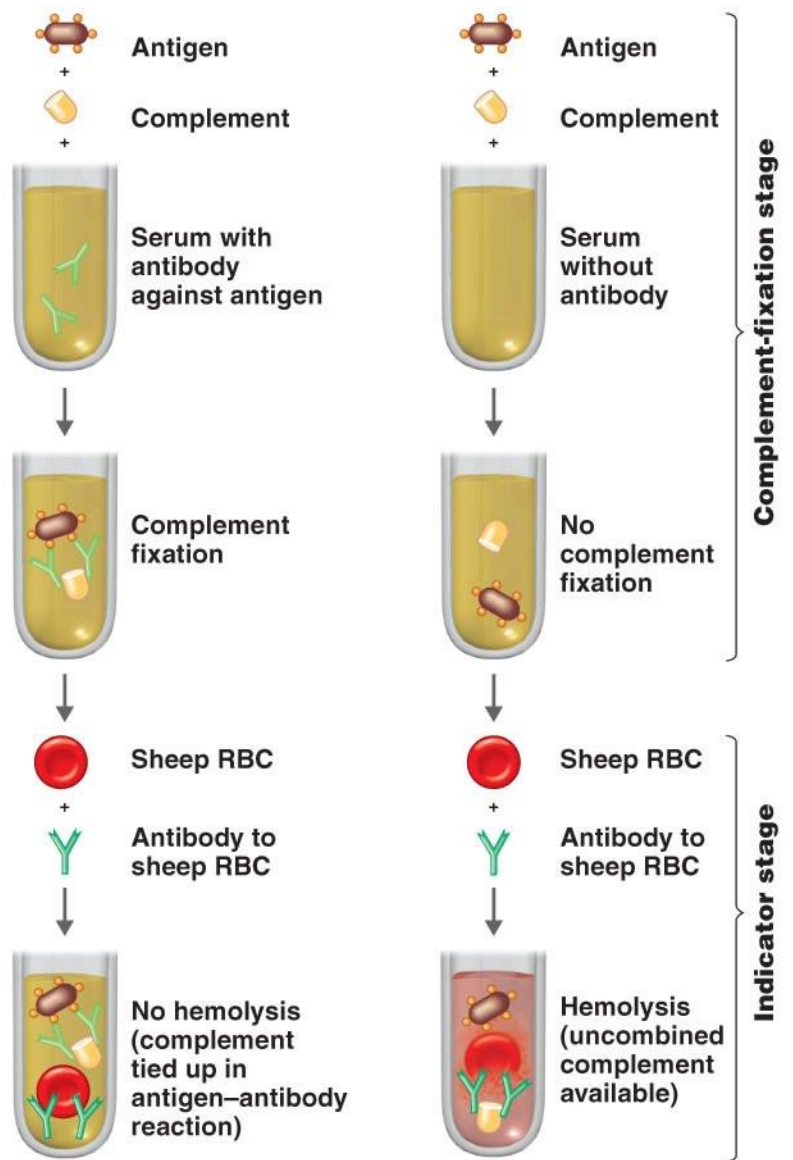
تتطلب اختبارات التثبيت التكميلية التي يتم إجراؤها بشكل صحيح دمج الضوابط المناسبة لضمان عدم تأثر النتيجة سلبًا بوجود مكونات مضادة للتكميلية.

The antigen or the serum itself may have anti-complementary properties (e.g., denatured or aggregated immunoglobulin, heparin, chelating agents, microbial contaminants)

قد يكون للمستضد أو المصل نفسه خصائص مضادة للتكامل (على سبيل المثال ، الغلوبولين المناعي المحوّل أو المتجمع ، الهيبارين ، العوامل المخليبية ، الملوثات الميكروبية)

may fix all the complement in the system, or may remove calcium or magnesium ions (both of which are essential for complement-mediated lysis).

قد يثبت كل المكملات في النظام ، أو قد يزيل أيونات الكالسيوم أو المغنيسيوم (وكلاهما ضروري لتحلل بواسطة تكميلية).



**(a) Positive test.** All available complement is fixed by the antigen-antibody reaction; no hemolysis occurs, so the test is positive for the presence of antibodies.

**(b) Negative test.** No antigen-antibody reaction occurs. The complement remains, and the red blood cells are lysed in the indicator stage, so the test is negative.

Copyright © 2010 Pearson Education, Inc.

### مزايا Advantages of CFT

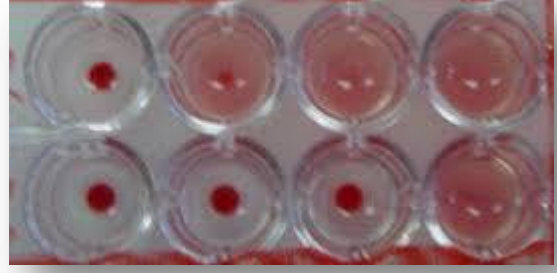
1. Ability to screen against a large number of viral and bacterial infections at the same time. القدرة على الفحص ضد عدد كبير من الالتهابات الفيروسية والبكتيرية في نفس الوقت.
2. Economical. اقتصادية.

### Disadvantages of CFT

1. Not sensitive - cannot be used for immunity screening • غير حساس - لا يمكن استخدامه لفحص المناعة
2. Time consuming and labor intensive • تستغرق وقتًا طويلًا وعمالة كثيفة
3. Often non-specific e.g. cross-reactivity • غير محدد في كثير من الأحيان على سبيل المثال عبر التفاعل

### Quiz...

The results of CFT shown in a microtitration plate where the test is done, Identify the positive and negative results in this picture???



اختبار...

تظهر نتائج CFT في لوحة ميكروتيترية حيث يتم الاختبار ، حدد النتائج الإيجابية والسلبية في هذه الصورة ???