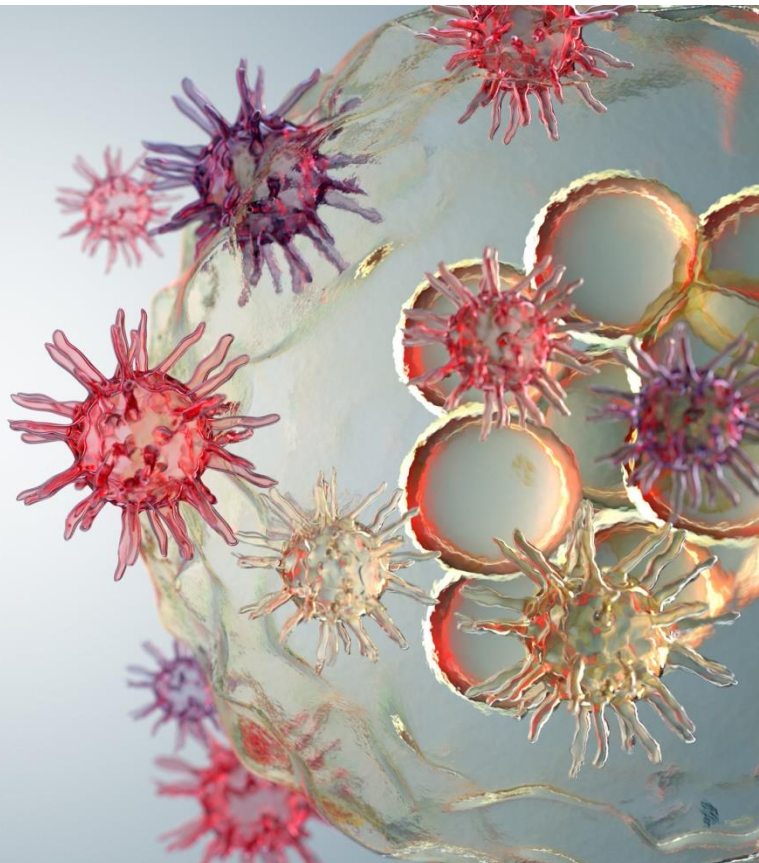
جـــامعـــة تـــكريـــت
كـلـيـة الـتـربية للبنات
عـــلـــوم الـــحيـــــاة
الـمـرحـلـة الـثـالـثة
الـفـايـروســـــات

٩

تشخيص الفايروسات
المجهر الالكتروني ، الماسح ، النافذ
الطرق المصلية وتقنية الاليزا



د. سعاد حمود محمد

suad.hammood@tu.edu.iq

الكشف السيرولوجي عن الفيروسات (اختبار ELISA)

تعتبر طريقة (ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent assay احدى طرق التشخيص السيرولوجية للأمراض وهي تعتبر لذلك اهم هذه الطرق المستخدمة الان في تعريف الفيروسات النباتية وقد وجد Clark & Adams سنة ١٩٧٧ ان طريقة ELISA باستخدام الاطباق تعتبر طريقة دقيقة وكافية لتحديد واختبار وجود الفيروسات النباتية في جميع المحاصيل للكشف عن الفيروسات في الاجزاء النباتية او العوائل الحشرية وفي البذور والنباتات المتكاثرة خضريا وقد كان لتطوير هذه الطريقة وطرق تقنية اخرى للتدقيق وسرعة الكشف عن عدد كبير من العينات النباتية في فترة قصيرة والوصول الى تكلفة قليلة.

ومنذ هذا الوقت اصبحت هذه الطريقة واسعة الانتشار حتى انه يتم تطبيقها على النطاق التجاري لعديد من الفيروسات والبكتيريا والفطريات. ويمتاز هذا الاختبار بسهولة اجرائه والحساسية الشديدة والدقة كما انه سريع النتائج بالمقارنة بالطرق الاخرى للكشف عن الفيروس. و يجب التأكيد علي ان هذا الاختبار شائع الاستخدام ويمكن اجراؤه بسهولة وتتوافر المواد اللازمة لإجرائه خلال شركات متخصصة مما يسهل استخدامه مصاحبا لإجراءات وخطوات زراعة الانسجة. وتنقسم الطريقة الى طريقة مباشرة واخرى غير مباشرة الا ان النتائج تكون متطابقة والاختلاف في الطريقة غير المباشرة هو اضافة انزيم اضافي للتفاعل.

ويعتمد في الكشف على ان الفيروس يتكون من حمض نووي محاط بغلاف بروتيني مميز. ولذلك فانه ينتج اجساما مضادة في احد الحيوانات ذات الدم الحار وتستخدم هذه الاجسام المضادة بعد فصلها من الحيوان وحين تتفاعل مع مستخلص النبات تعطي نتيجة ايجابية في حالة وجود الفيروس في مستخلص النبات. ولكي يمكن رؤية هذا التفاعل وتقديره كميا حيث يربط بأنزيم يعطي تفاعلا لونيا واضحا (انظر الشكلين في الاسفل). مما هو جدير بالذكر ان هذا الاختبار لا يجدي في الكشف عن الفيرويد وهو مسبب مرضى لا يملك غطاء بروتينيا.

قبل الاستطراد في هذه الطريقة يجب تعريف بعض المصطلحات التي تستخدم مثل Antigen- Antibodies - Antiserum.

اولا: Antigen الانتيجين

تعرف الانتيجينات على انها جزيئات تحتوي على بروتين او عديدة التسكر Polysaccharides وهذه الجزيئات تعتبر اجساما غريبة اذا ما تم حقن انواع من الفقاريات بها وتشمل هذه الانتيجينات تحضيرات الفيروس النباتي او الحيواني والفطريات وجراثيم البكتيريا وغير ذلك. هذا الانتيجين له قدرة على تنشيط الجهاز المناعي للحيوان المحقون به لإنتاج نوع معين من البروتينات يطلق عليها Antibodies التي تكون في سيرم هذا الحيوان وفي هذه الحالة يطلق على السيرم Antiserum (سيرام مضاد) هذا الاخير له القدرة على التفاعل او الاتحاد مع هذا الانتيجين.

ثانيا: الاجسام المضادة Antibodies

وهي اجسام مضادة تنتج في دم الحيوانات الفقارية نتيجة لوجود انتيجين غريب في دم هذه الحيوانات وهي نوع من البروتينات عالية التخصص تعرف باسم Immunoglobulins او IgG وهذا البروتين قادر على الاتحاد بالانتيجين الخاص به.

ثالثا: السيرم المضاد Antiserums

وهو ما يطلق عليه السيرام المضاد للفيروسات النباتية في هذه الحالة. ويمكن انتاجه في عديد من الحيوانات ولكن يعتبر الارنب هو الحيوان الرئيس لعدة اعتبارات منها انتاجه الجيد للسيرام المضاد للفيروسات النباتية كما يسهل التعامل مع الحيوان ولكن هذا لا يمنع من استخدام حيوانات اخرى مثل الفئران وخنازير غينيا والدجاج وغير ذلك. ويتم فصل IgG من الدم بطرق تنقية معينة خلال ترشيح بواسطة فلاتر خاصة.

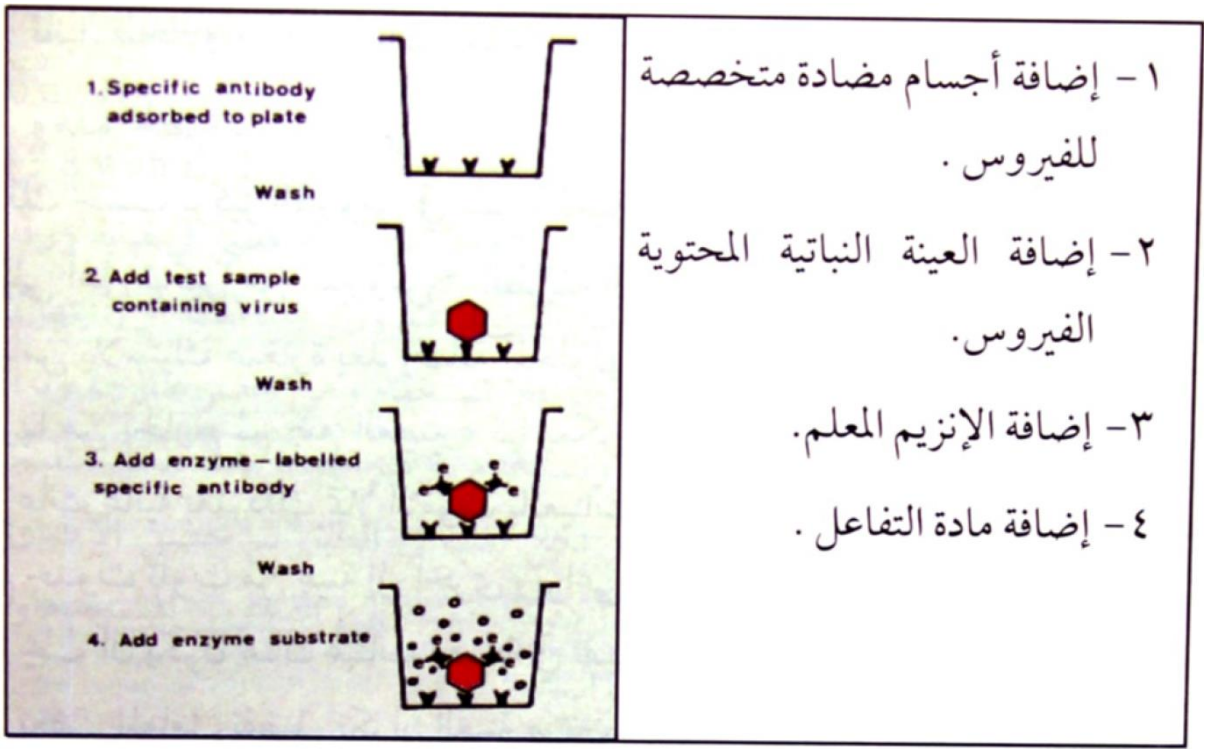
فوائد استخدام طريقة ELISA

أ- من اكثر الاختبارات حساسية لتشخيص معظم الفيروسات والتي تتضمن فيروسات البطاطس مثل PLRV، PVA التي تكون بتركيز منخفض في العائل كذلك الحال في فيروس تورد الموز bunchy top virus)).

ب- يحتاج الاختبار الى كمية قليلة جدا من السيرام المضاد بالمقارنة بغيره من الطرق السيرولوجية الاخرى.

ج) يمكن اجراء عدد كبير من العينات في وقت قصير وقد يعاب على هذا الاختبار كثرة الخطوات المتبعة للحصول على النتيجة وقد امكن حاليا اختصار في وقت التحضين واستخدام اطباق سابقة التجهيز بالسيرم مما يؤكد ان هذا الاختبار يمكن تعديله واتباعه في برامج انتاج وتحسين التقاوي او الطرق الخاصة بالتربية لإنتاج اصناف مقاومة.

والشكل التالي يمثل الخطوات الاساسية المتبعة في طريقة ال ELISA وهي الطريقة المباشرة "Direct double antibody sandwich method".



طرق تشخيص الفيروسات

يتطلب التشخيص الدقيق للفيروسات إجراء فحوصات معملية للعينات السريرية للكشف عن وجود الفيروس أو المستضدات الفيروسية أو الأجسام المضادة المحددة، وفيما يأتي أبرز طرق تشخيص الفيروسات الشائعة:

١. فحوصات الكشف عن الأجسام المضادة

يمكن التأكد من وجود عدوى فيروسية حادة أو حديثة من خلال الكشف عن وجود الغلوبيولين المناعي م (Immunoglobulin -M) محدد في عينة المصل، أو ارتفاع في الغلوبيولين ج (Immunoglobulin-G) المحدد في الأمصال المزدوجة، إذ يشير وجود الغلوبين المناعي م (IgM) وغياب الغلوبيولين المناعي ج (IgG) إلى وجود إصابة سابقة بالفيروس.

ومن المهم معرفة أنه عادةً ما يتم إجراء اختبار فحوصات الأجسام المضادة عن طريق تقنية المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم (Enzyme-linked immunosorbent assay).

٢. الكشف المباشر للفيروس

فيما يأتي طرق تشخيص الفيروسات من خلال مشاهدة الفيروس ببعض التقنيات:

المجهر الإلكتروني

يكون حجم الفيروسات صغير جدًا ولا يمكن مشاهدته بالمجهر الضوئي لذلك يتم استخدام المجهر الإلكتروني لتحديد الشكل المظهري للعديد من الفيروسات البشرية.

ومع ذلك فإن المجهر الإلكتروني ليس أداة تُستخدم بشكل روتيني لتحديد الفيروسات وتشخيصها نظرًا لأن الفيروسات عادةً ما تكون موجودة بأعداد صغيرة جدًا في العينات السريرية وقد تسبب المواد الملوثة حجب وجودها ومشاهدتها.

الكشف عن الخلايا المصابة بالفيروس عن طريق الأجسام المضادة المحددة

تُستخدم هذه التقنية بشكل شائع لتحديد العامل المسبب لدى المصابين بعدوى الجهاز التنفسي والتي تسببها فيروسات، مثل: الفيروس المخلوي التنفسي أو فيروس الأنفلونزا.

إذ يتم الكشف عن وجود هذه الأجسام المضادة التي تم تحديها بواسطة صبغة خضراء حيث يرتبط الجسم المضاد بالخلايا إذا كانت تعبر عن المستضد المقابل بعد ذلك يتم تصور هذه الخلايا عن طريق الفحص تحت المجهر الفلوري.

٣. الزراعة

يمكن للفيروسات أن تتكاثر فقط في الخلايا الحية، لذلك يتم زراعتهم في المختبر باستخدام طبقات الخلايا الأحادية للسماح بالفيروسات بالنمو والتكاثر ويمكن زراعة بعض الفيروسات المهمة طبيًا فقط لتجنب المخاطر الممكنة.