عزل وزراعة الفيروسات

(492 mic)

د. منال الخليفي

الطالبات :

رغده الحقيل

ساره البهكلي

زينه الشهري

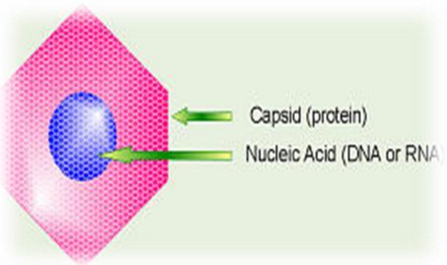
حنان الزهراني

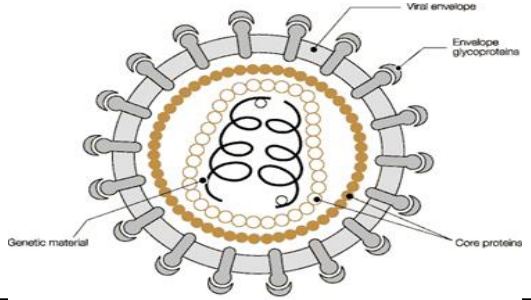
سميره عواجي

عزل وزراعة الفيروسات ..

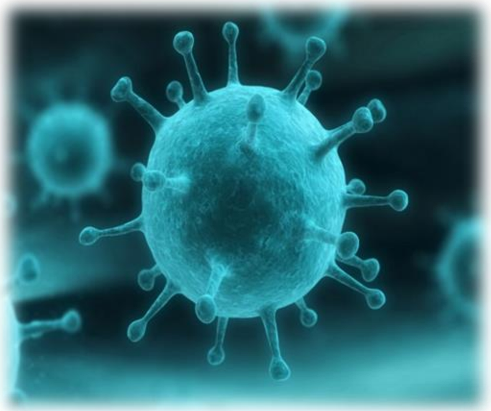
تعاريف مهمه :

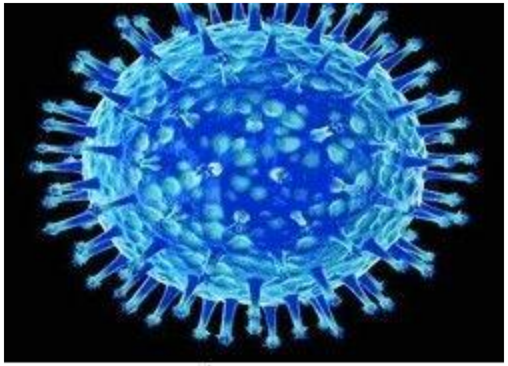
الزراعه Cultivation	الفيروس
نقصد بالزراعه : **إكثار الفيروس وتنميته** وبسبب أن الفيروسات متطفلات إجباريه داخل خلويه ، فإنها لا يمكن أن تتكاثر في أي وسط خال من الخلايا مهما كان معقداً .	* الفيروسات هي تراكيب **لا خلويه** تقع على الحد الفاصل بين الماده غير الحيه والأحياء الدقيقه ، وهي تستطيع أن تصيب شتى الكائنات الأخرى . * وقد اكتشفها العالم **ايفانوفسكي** في عام ١٨٨٢ اثناء دراسته لمرض تبرقش الدخان .. * وقد اشتقت كلمة فيروس من الأصل اللاتيني **Venum** وهي تعني سم الثعبان .. * تتميز الفيروسات بأنها كائنات دقيقه **متطفله اجباريه** ولذا فإن زراعتها لابد وأن تتم في أنسجه حيه وذلك بطرق مختلفه تعتمد على طبيعة الفيروس والغرض من عملية إكثاره * الفيروسات **جسيمات معديه** دقيقه جدا تصغر البكتيريا كثيراً ولا ترى الا بواسطة المجهر الإلكتروني ويمكنها أن تعيش وتتضاعف داخل الخليه الحيه فقط وهي تسبب أمراضاً خطيره مثل : شلل الأطفال والحصبه والجدري والرمد الحبيبي وغير ذلك





مقدمه ..





فيروس شلل الأطفال

* في عام ١٩٣١ قام العالم الأمريكي أرنست وليام بتنمية فيروس الأنفلونزا في بيض الدجاج المخصب

* وفى ١٩٤٩ قام كل من جون اندرز وآخرين بتنمية فيروس شلل الأطفال في خلايا الجنين البشري، مكن هذا العمل يوناس سواك من تقديم لقاح فعال ضد شلل الأطفال

* تمكن العالم الروسي ايفانوفسكي سنة ١٨٩٢م من تصفية عصارة أوراق التبغ المصابة باستخدام المرشحات البكتيرية، ومسح بها أوراق غير مصابة فلاحظ إصابتها. وهو أول من أطلق عليها اسم فايرس .

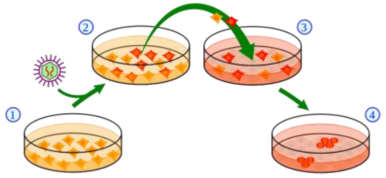
Virus Isolation

عزل الفيروسات

لعزل الفيروسات نستخدم :

١- مزارع الأنسجة +

المزارع الخلوية



٢- أجنة البيض

٣- التلقيح الحيواني

الغرض من عزل الفيروسات :

١- التشخيص

٢- الأبحاث

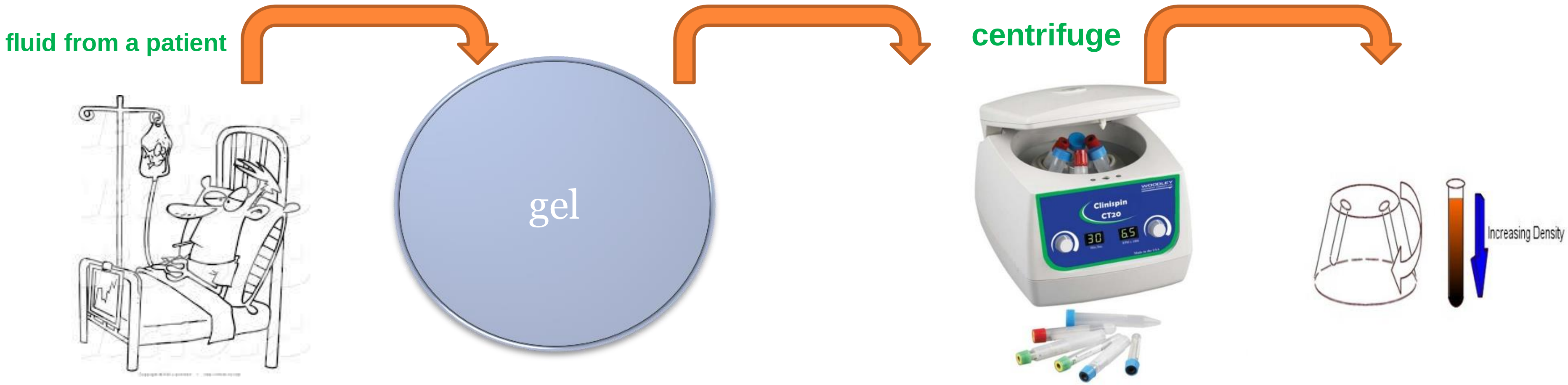
٣- انتاج الأجسام المضادة

واللقاحات

عزل الفيروس :

- لعزل الفيروس، تؤخذ **عينة** غير متجانسة (السوائل من المريض أو مزرعة) وإضافته إلى الجل ، بعد ذلك تدور في جهاز **الطرد المركزي**.

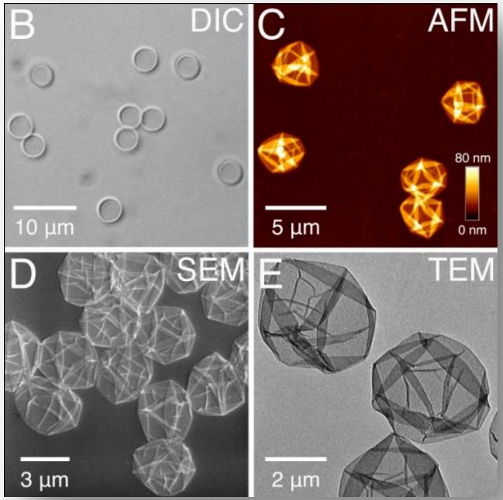
- محتويات العينة تستقر في أكوام منفصلة، أو الحزمات، وعلى أعماق مختلفة وفقا لكثافتها المميزة وتسمى هذه **عينات تنقية الكثافة**.



- ولأن جميع الكائنات الحية الدقيقة لها كثافة مميزة ، يمكن الحصول على عينات نقيه تحتوي فقط على **فيروسات محدده** ولا تحتوي على أية مواد أخرى.

هناك طريقة واحدة فقط لتأكيد هذا: **صوره بالمجهر الإلكتروني**

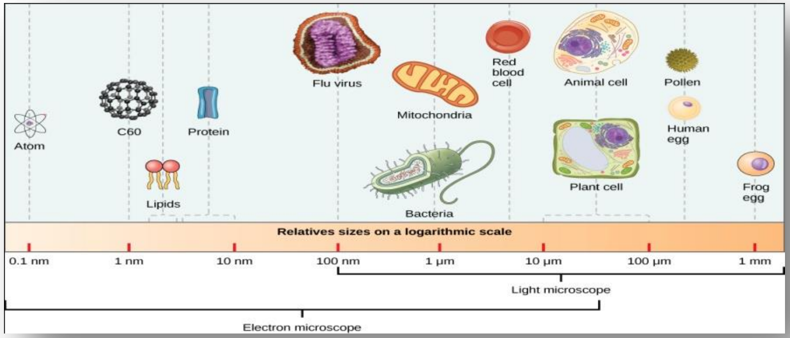
Electron microscope



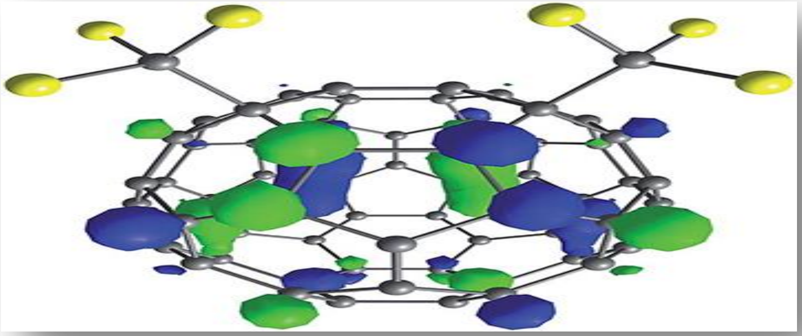
- إذا كانت الصوره المجهريه تكشف عن تلوث، هذا يعني احتواء العينة على بعض المواد التي لديها نفس كثافة الفيروس في هذه الحالة يجب إضافة خطوات لعملية العزل حتى نحصل على عينة تحتوي فقط على الفيروس.

الخطوات الإضافية لعزل الفيروسات

الحجم



التقارب الكهربائي



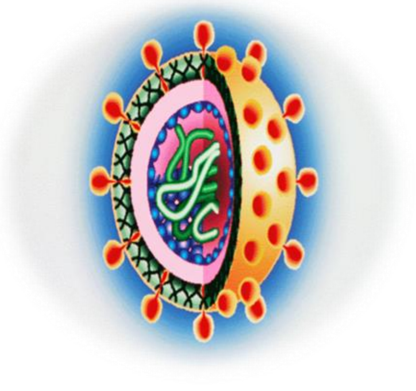
عزل محتويات الفيروس

Isolating viral constituents

- لعزل محتويات الفيروس، يجب تفكيك الفيروسات إلى الأجزاء المكونة لها عن طريق إضافة المنظفات الخاصة إلى عزلة الفيروس.

- تشمل هذه الجزيئات البروتينات التي تزين وتبطن الغشاء الخارجي ، ومحتويات النواة الداخلية: الحمض النووي .

العزله الفيروسيه



منظفات خاصه مثل :

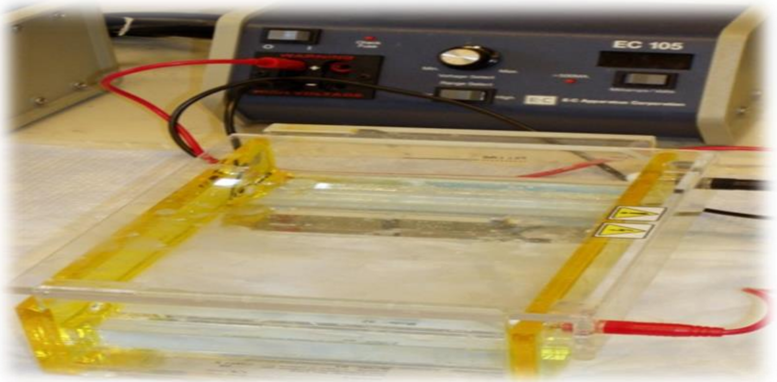
SODIUM DODY SULFATE

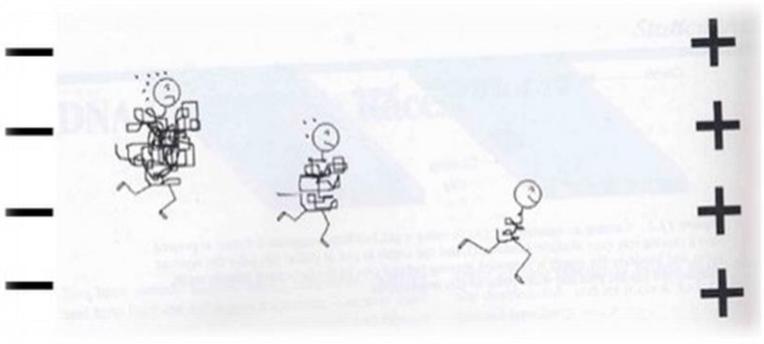
بروتينات ، احماض نوويه

- لفصل هذه الجزيئات عن بعضها البعض (البروتينات والإنزيمات والأحماض النووية) نستخدم جهاز الفصل الكهربائي (electrophoresis)

- حيث أن الحقل الكهربائي يسحب الجزيئات من خلال الجل بحيث يكون الفصل وفقا لأوزانها (بدلا من كثافة).

- وبعض الحزمات تحتوي على البروتينات وغيرها تحتوي على المادة الوراثية ، إما DNA أو RNA





عزل الفيروس ومعالجة العينات :
Virus Isolation and Specimen Processing

- حجرة أو خزانة السلامة :

Biosafety Cabinets

١- افتح الخزانه قبل الاستخدام بـ ٣-٥ دقائق .

٢- ضبط شاشة العرض " الزجاجة الأمامية لخزانة السلامة "

٣- عدم منع تدفق الهواء

٤- فصل الأدوات المتسخة عن الأدوات النظيفة

٥- ترتيب الأدوات لسير العمل

٦- تعقيم الأدوات داخل الخزانه قبل اخراجها

Culturing Viruses

الفيروسات الحيوانيه
Animal viruses

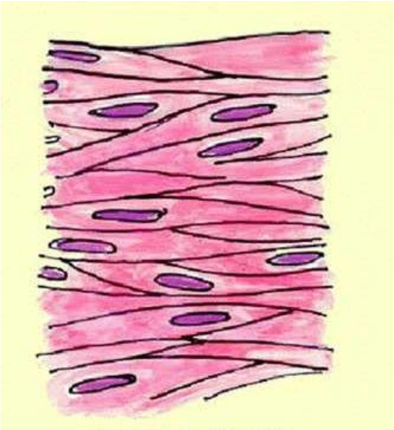
الزراعه
Cultivation

أ ـ استخدام الحيوانات المعمليه ..

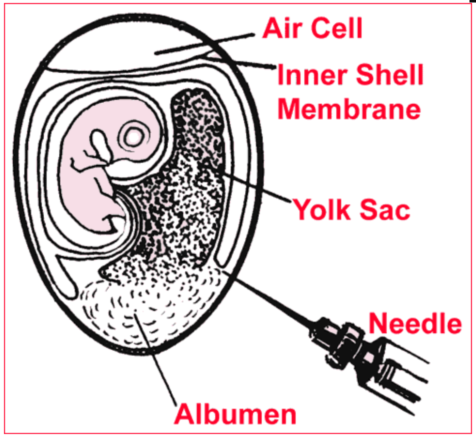
لزراعة الفيروسات الحيوانيه ، يمكن أن تستخدم : **حيوانات بأكملها** أو **أطوار منها** لهذا الغرض . ويمكن أن تؤسس إصابة الحيوان بحقن معلق الفيروس ، باستخدام **محقن** أو **إبره** في الحيوان .

ويمكن أن يكون طريق الحقن إما في :

المخ ، وإما في التجويف البريتوني ، أو في العضلات . وفي حالات نادره ، يتم الحقن في الوريد أو بالرش في الأنف .



الزراعه
Cultivation



ب - استخدام جنين الدجاج ..

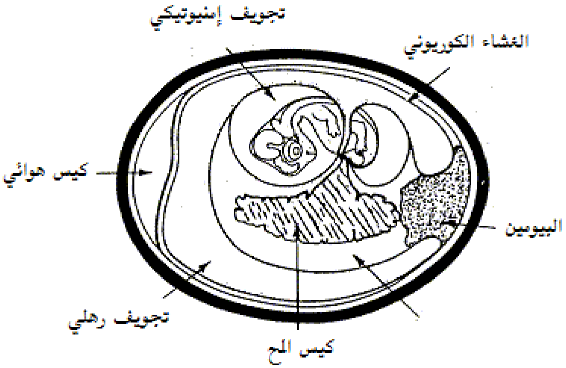
يعد حقن كثير من الفيروسات في جنين الدجاج أمراً ضرورياً كما هو الحال عند عزل **فيروس الإنفلونزا** لأول مره ..

وكذلك يستخدم جنين الدجاج لتنمية الفيروسات اللازمه لعمل اللقاحات :

الحصبه ، **والحصبه الألمانيه** ، **والغده النكفيه ونيوكاسل الدجاج** وغيرها .

وتوجد عدة طرق لحقن جنين الدجاج :

١- على الغشاء السقائي المشيمائي
٢- والتجويف السقائي
٣- والتجويف الرهلي
٤- وكيس المح أو الجنين .



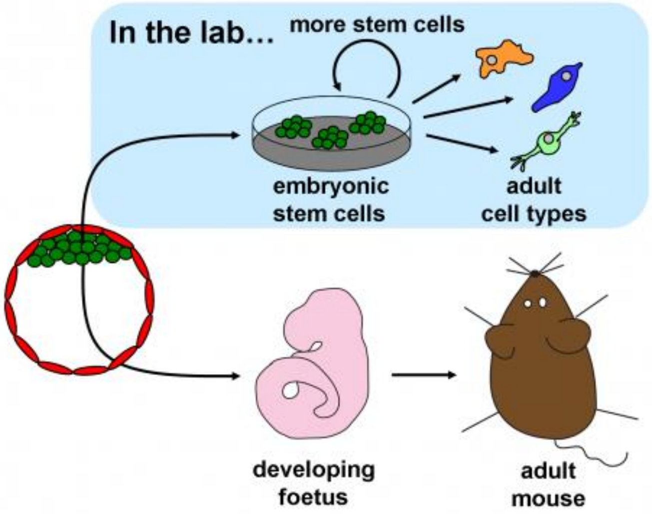
في هذه الأيام تفضل طريقة غير مكلفه وموثوق بها و أكثر إنتاجيه ، وهي زراعة الفيروسات في **المزرعه الخلويه**

فيديو

Viral Cultivation in Chicken Embryo

ج – استخدام المزارع الخلويه (أمثله وأنواع):

أولاً أنواع المزارع الخلويه ..

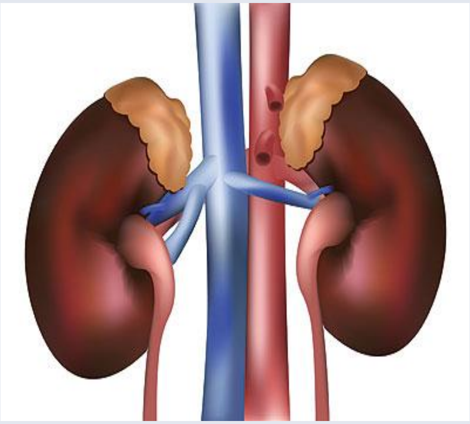


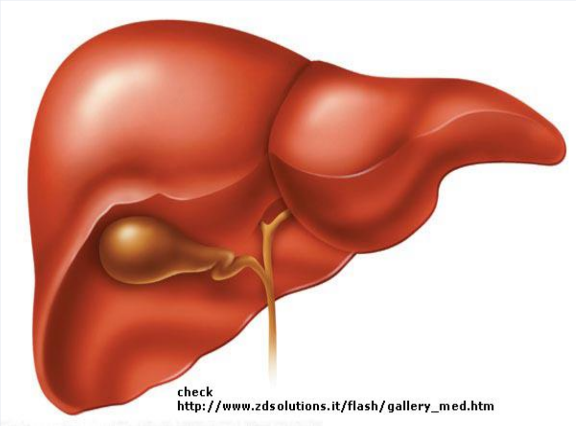
الزراعه
Cultivation

ج – استخدام المزارع الخلويه (أمثله وأنواع):

*** مزرعة الأعضاء :**

تؤخذ خزعه أو شرائح من أعضاء الحيوانات المعمليه ويمكن أن يحافظ على تركيبها الأصلي ووظائفها لعدة أيام وأحيانا لبضعة أسابيع إذا حفظت في وسط نمو معقم وتستخدم غالباً أعضاء **مثل الكلى والكبد** .





* المزرعه النسيجيه :	اختصار :
وهي تعني المزرعه الخلويه ولعملها تفكك الأنسجه الحيوانيه إلى معلق من خلايا مفرده او كتل صغيره وذلك بفرمها ميكانيكيا ، ثم تعامل بعد ذلك بوساطة إنزيمات محلله البروتين مثل : التربسين (بتركيز محدد ولوقت محدد) . وبعد غسل الخلايا وعدها ، تخفف في الوسط الغذائي الذي يحتوي على العناصر والأملاح بالإضافه للحموض الأمينيه ومصدر الطاقه الكربوني والتي تفضل إذابتها في محلول منظم مضبوط الأس الهيدروجيني . هذا بالإضافه الى عناصر النمو الموجوده في مصل جنين البقر (٥-١٠ %) وتضاف لهذا الوسط الغذائي المضادات الحيويه ي ودليل لوني لماذا ؟ **ليبين التغير في الأس الهيدروجيني . ويسمح للخلايا المضافه لوسط النمو بأن تستقر على سطح مستوٍ في أوعيه زجاجيه أو بلاستيكيه معامله بطريقه خاصه** . وتلتصق معظم الخلايا بسرعه بجدار الوعاء ، وتحت الظروف المناسبه فإنها تنقسم نحو مره كل يوم حتى يغطى سطح الوعاء بحصيره من طبقه واحده مكتملة الافتراش من الخلايا . ويعتمد هذا غالباً على مكونات وسط النمو ، والأس الهيدروجيني (٤-٧) ونوع المصل وتركيزه . كما تنمى الخلايا في حضانات تحتوي على ٥% غاز ثاني أكسيد الكربون (حضانات ثاني اكسيد الكربون) أو أن يضاف لوسط النمو محلول منظم البيكربونات لكي يضمن تصاعد غاز ثاني أكسيد الكربون .	خلايا حيوانيه مفككه بطريقه ميكانيكيه ↓ انزيمات محلله للبروتين مثل التربسين ↓ عناصر وأملاح + احماض امينيه + مصدر طاقه كربوني ↓ عناصر نمو ↓ اضافة المضادات الحيويه ↓ اضافة دليل لوني ؟ يبين التغير في الاس الهيدروجيني + يسمح للخلايا المضافه لوسط النمو ان تستقر على سطح مستو في الاوعيه ↓ تنقسم الخلايا مره كل يوم تقريبا حتى يتغطى سطح الوعاء بحصيره من الخلايا

فيديو

Subculture of Suspension Cells

فيديو

Sterile Cell Culture Technique

* المزارع الخلويه الإبتدائيه

عندما تؤخذ الخلايا طازجه من الحيوانات وتوضع في مزرعه ، فإن هذه الخلايا المفككه من أي عضو (**كلى** ، **كبد** ، أو غيره) تتكون من أنواع مختلفه من الخلايا ومعظمها يكون له قدره محدوده جداً على النمو في المعمل ربما لا تتجاوز انقساماتها الخلويه ٥-١٠ مرات .

ومع ذلك ، فإنها تدعم تكاثر مدى واسع من الفيروسات .

ويستخدم لهذا الغرض مزارع ابتدائيه مشتقه من :

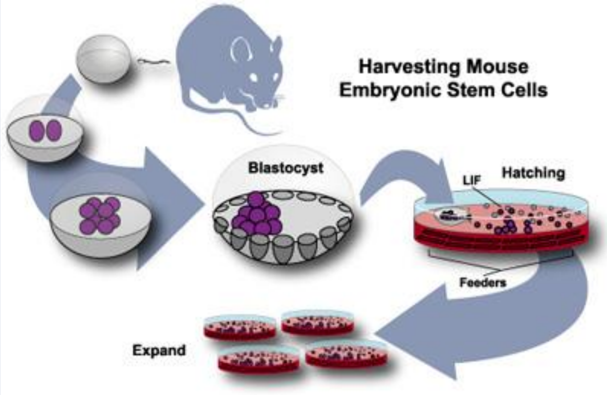
كلى القرود + والكلى الجنينيه للإنسان + أو من الجنين + ومن أجنة الفئران أو الدجاج

وتستخدم هذه المزارع :

١- في معامل الفيروسات ٢- وفي إنتاج اللقاحات .

ومن أمثلتها :

١- مزارع كلى الأبقار لتنمية لقاح فيروس الطاعون البقري
٢- ومزارع اجنة الدجاج الليفيه ، أيضاً لتنمية لقاحات لفيروسات أخرى تصيب الإنسان والحيوان .

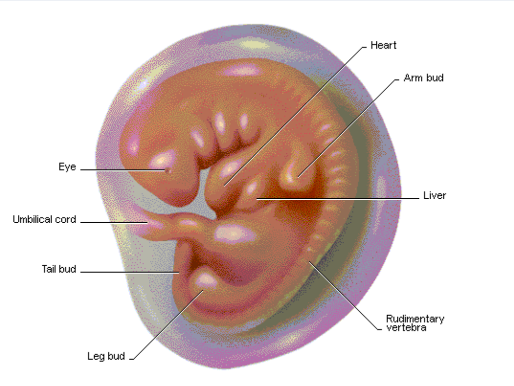


* المزارع الخلويه ثنائية المجموعه الصبغيه

هذه أنواع مفرده من الخلايا تفصل وحدها ، ويكون لها القدره على أن تنقسم في المعمل لنحو ١٠٠ جيل قبل أن تموت .
و هذه الخلايا تحتفظ بأعداد كروموسوماتها الزوجيه مثل الأصل تماماً + وتحتفظ بتكوينها الوراثي و الفسيولوجي دائماً

و هي تشتق من المزارع الابتدائيه ، وعلى الأخص الجنينيه منها ، وبصفه خاصه ، المستمده من أجنة البشر (بعد الإجهاض أو موت الأم أو حادث أو ما شابه ذلك).

وتوزع هذه الخلايا في وسط نمو للحفاظ مضافا إليها جليسرول أو ثنائي ميثيل سلفوكسايد ومبرده بالتدريج ومخزنه في عبوات صغيره في النيتروجين السائل . وعند الحاجه تستخدم عبوه لعمل مزارع نسيجيه تكفي لغرض التجربه ، و هكذا كل مره .



* مزارع خلويه مستمره (خطوط خلويه)

هي المزارع النسيجية التي تحيا وتموت وتتكاثر بلا نهاية وبلا موت..

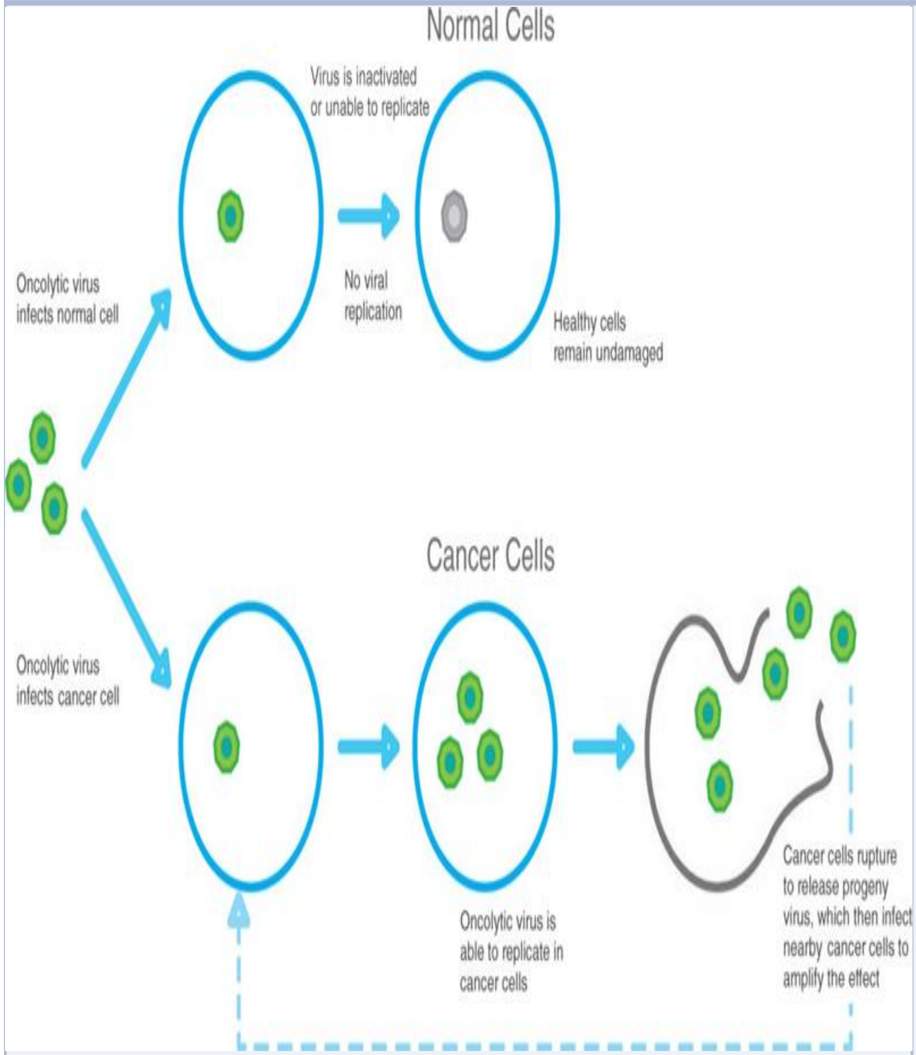
وهذه المزارع من نوع واحد من الخلايا التي تكون لها القدره على التكاثر والانقسام في المعمل الى ما لا نهايه .

ومثل هذه الخلايا التي لا تموت " المخلده " **تنشأ من سرطانات أو بإحداث تحويل في المعمل لسلاله خلويه ثنائية المجموعه الصبغيه .**

وغالباً ، لم تعد تحمل هذه الخلايا تشابهاً مع خليتها الأصليه والخطوط الخلويه مثل :

K B , Hela , Hep-2

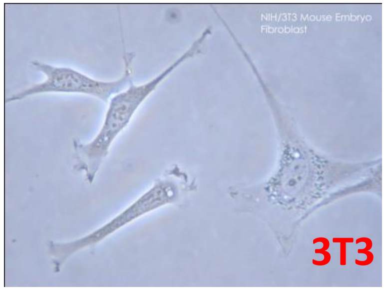
مشتقة أصلاً من سرطانات بشريه ، ولكنها تدعم تكاثر الفيروسات .

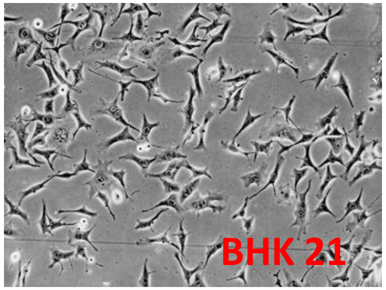


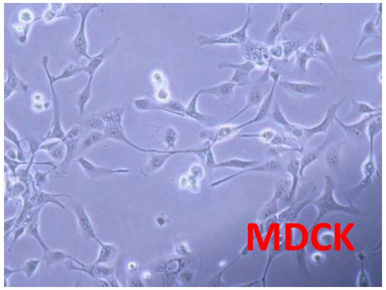
بعض المزارع النسيجية الدائمة شائعة الإستخدام :

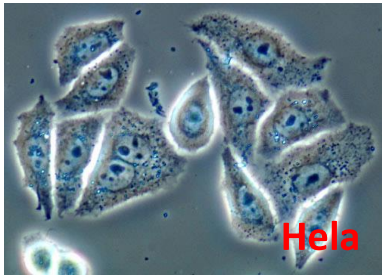
- 3T3 Fibroblast (mouse)
- BHK 21 Fibroblast (Syrian hamster)
- MDCK epithelial cell (dog)
- Hela epithelial cell (human)
- PtK 1 epithelial cell (rat kangaroo)
- L6 myoblast (rat)
- PC 12 Chromaffin cell (rat)
- SP 2 Plasma cell (mouse)

جميع هذه الخلايا من أصول سرطانية باستطاعتها النمو على ما لا نهاية والتكاثر لما لا نهاية في المزرعة النسيجية ..

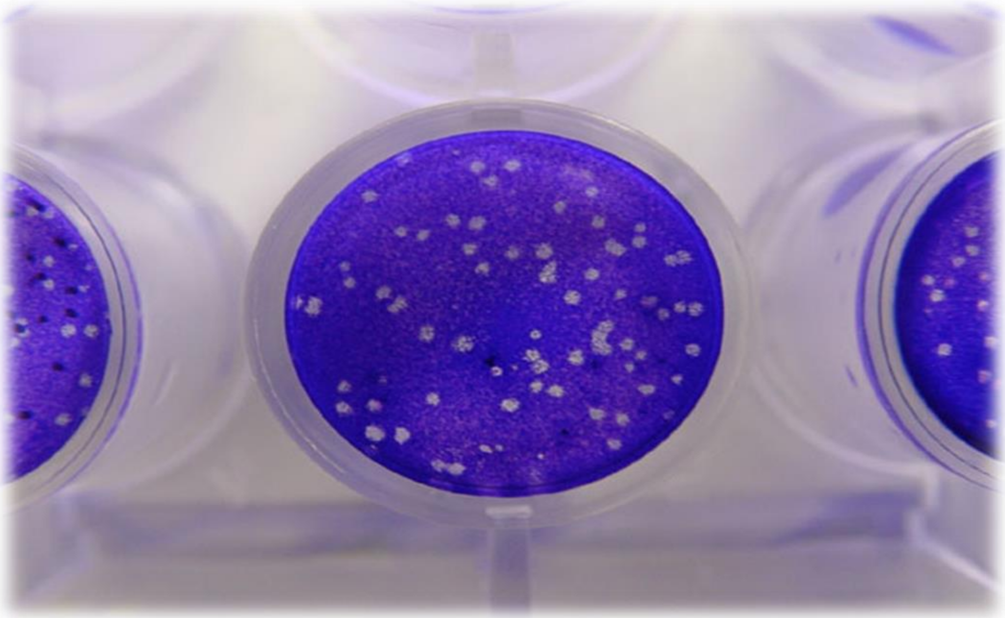








التعرف على النمو (التكاثر) الفيروسي في المزرعه الخلويه :



التعرف على النمو (التكاثر) الفيروسي في المزرعه الخلويه !

يمكن بيان تكاثر العديد من الفيروسات ونموها في المزرعه الخلويه بطرق :

١- **كيموحيويه** تتضمن : الزياده في البروتينات الفيروسيه + والحامض النووي الفيروسي + وخلفة الفيروس .
٢- **ويمكن أن يوضح الفحص بالمجهر الإلكتروني** تكاثر الفيروس وموضعه داخل الخليه المصابه . ومع ذلك ، فإنه توجد طرق دوريه روتينيه لبيان نمو الفيروس في المزرعه الخلويه ، وهذه تتضمن :

أ- التأثيرات المرضيه الخلويه :

يسبب الفيروس عادة **الموت** للخلايا التي يصبها وتبعا لذلك فان الفيروسات التي اصابت المزرعة الخلوية وحيدة الطبقة تحدث تدريجيا تأثيرات نسيجية دليلا على عطب الخلية وتسمى هذه التغييرات **بالتأثيرات المرضية الخلوية أي ان المرض او الضرر الذي يحدثه الفيروس على مستوى الخلية** كما يعرف هذا الفيروس بأنه المولد للتأثير المرضي الخلوي ..

* **ويمكن الكشف عن التأثير المرضي الخلوي اما** **في الخلايا وهي حية** واما **في الخلايا المثبتة والمصبوغة**

ويعتمد التأثير المرضي الخلوي اساسا على نوع الفيروس ونوع الخلية والظروف السائدة .

* **يتضمن التأثير الخلوي** :تكوين فراغات + وتكوين اجسام محتواة + وتحبب وتغييرات شكلية قد تتضمن تكوين مدمجات خلوية ، ويمكن ان يؤدي التأثير المرضي الخلوي القاسي الى موت الخلايا التي تنفصل وتطفو مع التدمير النهائي للخلايا وحيدة الطبقة

ويمكن ان يعزى التأثير القاتل للفيروس على الخلية الى العوامل التالية:

١- تكاثر المورث (مجين)الفيروسي او منتجاته التي تؤثر على اليات الخلية او تنظيمها

٢- تغييرات كيموحيوية قاسية:اذ ان البروتنات التي يشفرها الفيروس مبكرا تقفل تصنيع البروتين و ح ن ر الخلويين

٣- تتراكم بعض البروتينات للغطاء الفيروسي مؤخرا في الإصابة وقد تكون سامة بذاتها مباشرة

٤- تشوه تشكيلات الفيريونات او البروتينات الفيروسية في تكتلات بلورية كبيرة او في اجسام محتواة داخل التركيب الخلوي

٥- التغيير الجوهري في نفاذية الغشاء الخلوي

.

٦- استنزاف الاصول والمواد الخام الخلوية وبخاصة تلك المستخدمة في بناء الفيروس المتكاثر

٧- استهلاك طاقة الخلية وقفل مسارات ايضية

٨- تسرب الانزيمات المحللة الهادمة من الليسوزومات الخلوية مما ينتج عن الهضم الذاتي

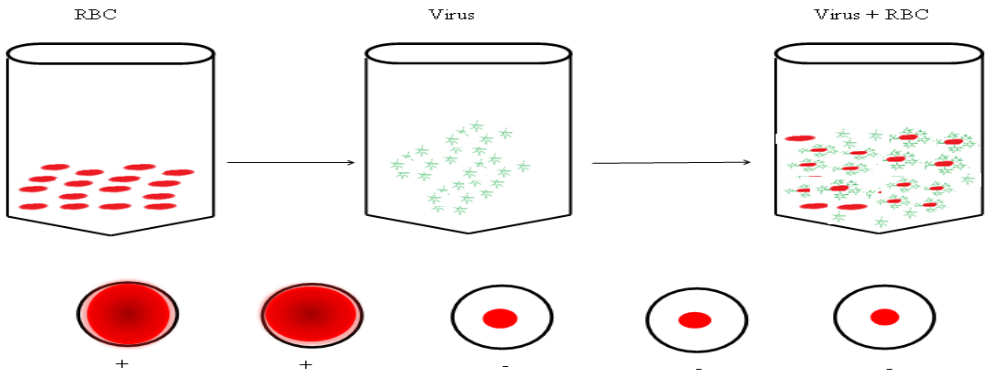
تابع : التعرف على النمو (التكاثر) الفيروسي في المزرعه الخلويه !

ب-الادمصاص الدموي:

ان فيروسات مثل الانفلونزا والحصبة وغيرها كثير والتي تتبرعم من الاغشية السيتوبلازمية للمزارع الخلوية المصابة **تكتسب القدرة على ادمصاص خلايا الدم الحمراء ويرجع هذا الادمصاص الدموي الى تضمين البروتينات الفيروسية ضمن الغشاء البلازمي للخلية والتي يكون لها ميل للارتباط مع خلايا الدم الحمراء**

ويمكن ان يستخدم الادمصاص الدموي للتعرف على :

*** الإصابة الفيروسية للفيروسات التي لاتحطم الخلايا ولاتسبب فيها أي تأثير مرضي خلوي**
*** وكذلك في الاطوار المبكرة الإصابة بالفيروسات القاتلة للخلايا .**

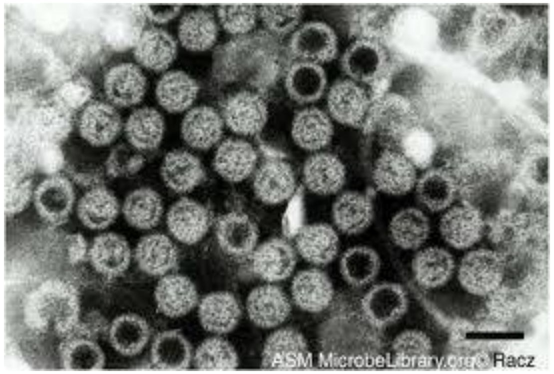


تابع : التعرف على النمو (التكاثر) الفيروسي في المزرعه الخلويه !

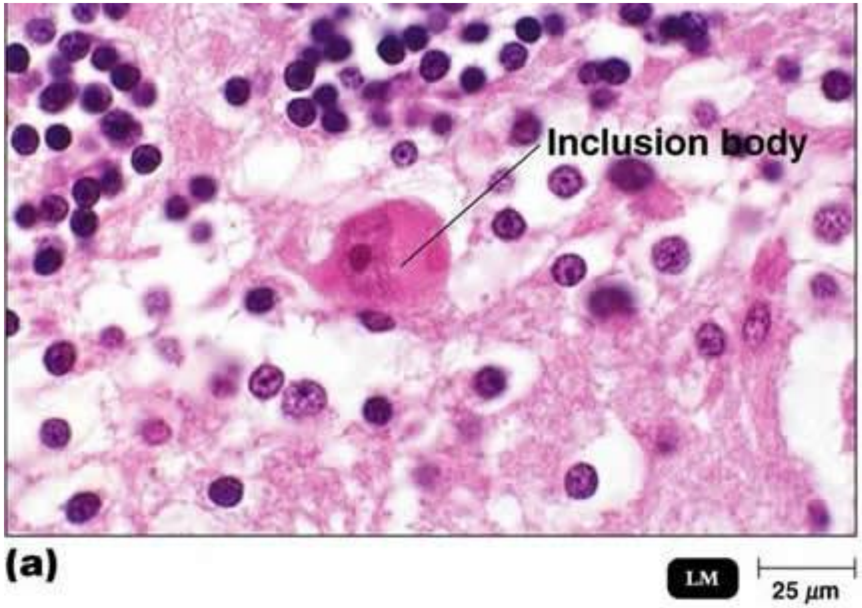
ج-التداخل :

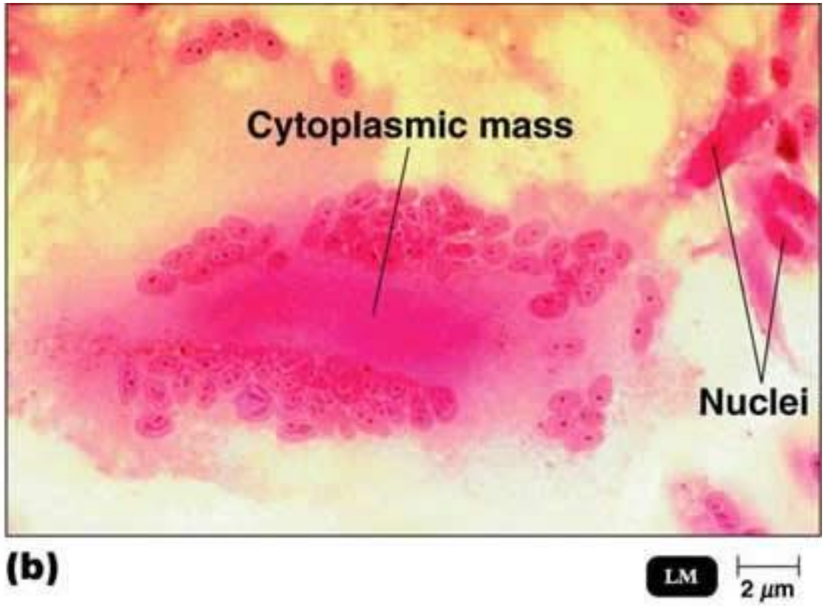
من المؤسس جيدا الان **ان تكاثر احد الفيروسات في خلية ما يثبط تكاثر فيروس آخر أعقبه في الدخول الى الخلية نفسها** وقد ساعدت هذه النظرية على تداخل الفيروس الأول ومنعه تكاثر الفيروس الثاني ،في اكتشاف فيروس الحصبة الألمانية.

اذ أن فيروس الحصبة الالمانية يصيب المزرعة الخلوية لكلى القرود دون أي تأثير مرضي خلوي .الا إن تحدي هذه الخلايا (أي أحداث الإصابة فوقية) بفيروس إكو لاتسمح للأخير بأن ينتج تأثيرا مرضيا خلويا ومن المعروف اكو لايمت بصلة لفيروس الحصبة الألمانية وانه يصيب هذه تأثير الخلايا مع إنتاج تأثير مرضي خلوي وتعد ظاهرة التداخل هذه تقتية مفيدة عند البحث عن فيروسات جديدة غير مولدة للمرض الخلوي



بعض الأمثله على التأثيرات المرضيه الخلويه :



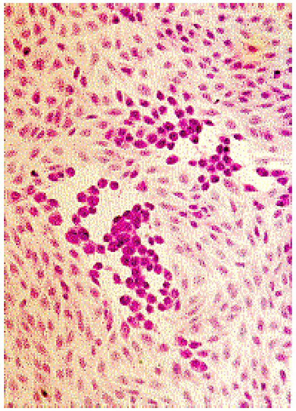


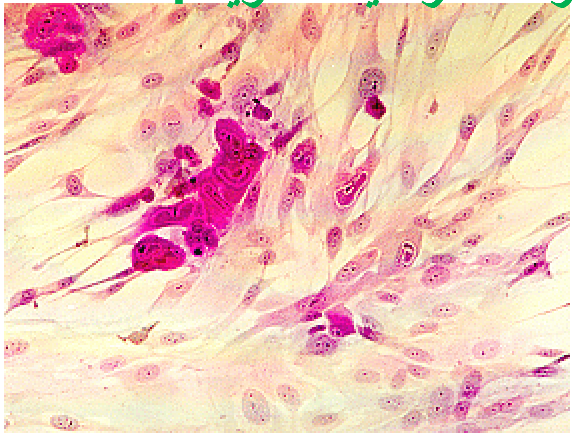
(a) **Cytoplasmic inclusion body** caused by rabies virus in brain tissue.

(b) **Syncytium** formed by cell fusion due to infection by measles virus.

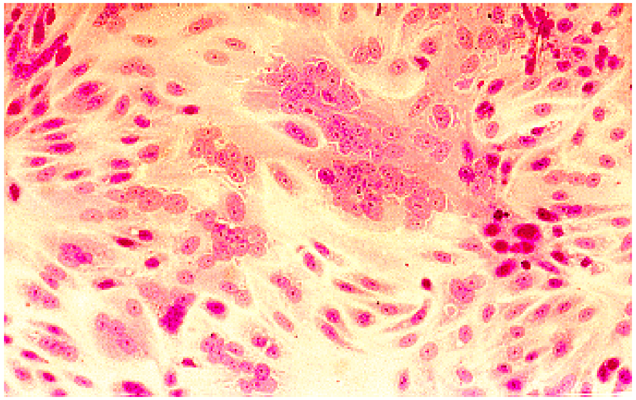
بعض الأمثله على التأثيرات المرضيه الخلويه :

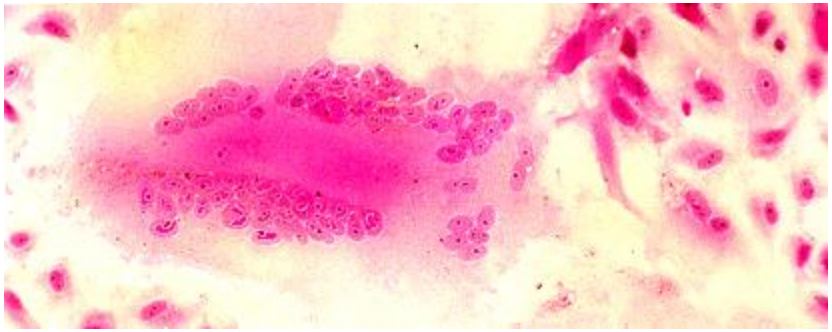
Fig. 1. Cytopathic effects of enterovirus 71 in rhesus monkey kidney cells





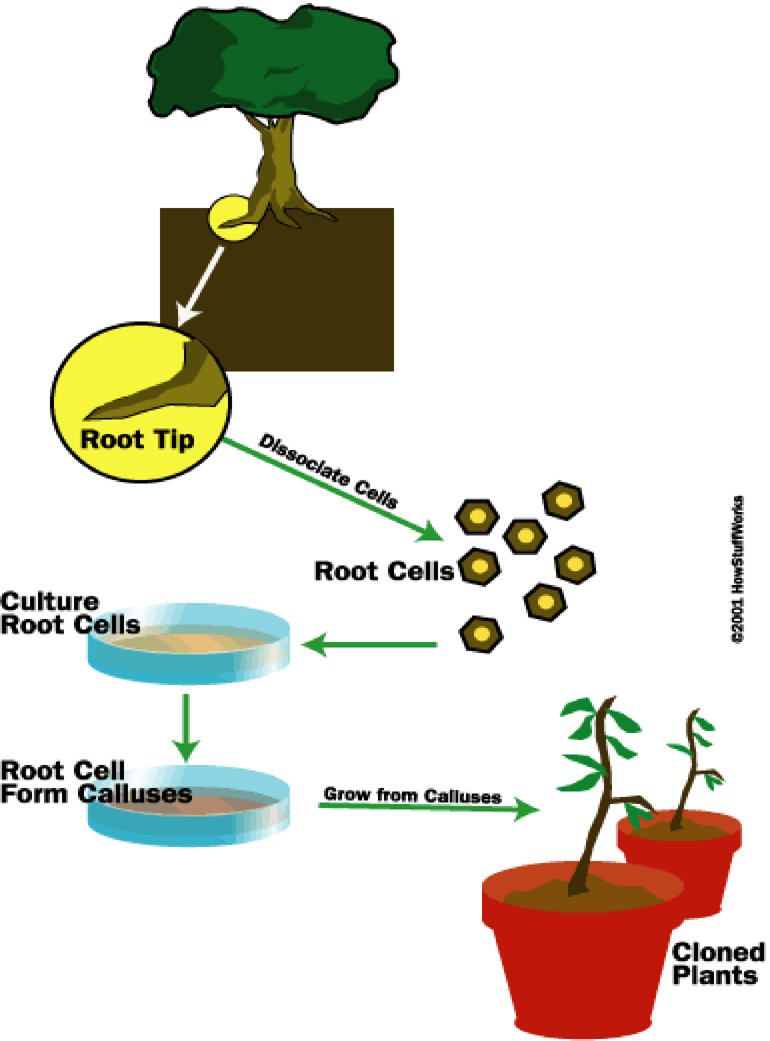
Cytopathic effects of enterovirus 71, HSV, and CMV in cell culture: note the ballooning of cells. (Linda Stannard, University of Cape Town, Virology Laboratory, Yale-New Haven Hospital)





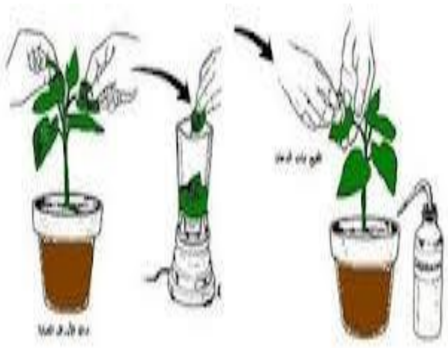
Cytopathic effects of mumps and measles viruses in cell culture: note the formation of syncytia. (Courtesy of Linda Stannard, University of Cape Town, S.A.)

زراعة الفيروسات النباتيه :



*زراعة الفيروسات النباتية:

تستخدم لتنمية الفيروسات النباتية وإكثارها وزراعتها بإحدى الطرق التالية:



١-الحقن الميكانيكي:

لاتمتلك الخلايا النباتية اية مواضع استقبال لتسهيل دخول الفيروسات إليها اذ أن الخلايا النباتية تمتلك جدرا خلوية من **السيليولوز والهيميسيليولوز او اللجنين او السيوبرين والتي لاتكون منفذة وربما تكون علاوة على ذلك مزودة بطبقات من الكيوتين** وتبعا لذلك فان الفيروسات النباتية لايمكن ان تدخل الى الخلايا القابلة

للإصابة وإنما يجب إدخالها بالقوة وبطريقة صناعية عن طريق :

الحقن الميكانيكي بسهولة اما **عن طريق معلق من الفيروس النقي** واما **بوساطة عصير من أوراق النبات المصاب** ولإحداث الإصابة في النبات العائل فان مادة خادشة مثل الكربوراندام او سيلايت يمكن ان تعفر على الاوراق المراد إحداث الإصابة بها ا وان تخلط مع محقن الفيروس وباستخدام الاصابع المغموسة في محقن الفيروس ومسحها برقة على السطح العلوي للاوراق فان جدر الخلايا المخدوشة سوف تسمح بدخول الفيريونات الى داخل الخلية وتأسيس الاصابة وبتوفير الظلروف الملائمة لنمو النبات العائل ولتكاثر الفيروس فان هذا ينتج عنه تكاثر الفيروس وانتاج الاعراض المرضية المميزة لمثل هذا المرض

*زراعة الفيروسات النباتية:

تستخدم لتنمية الفيروسات النباتية وإكثارها وزراعتها بإحدى الطرق التالية:

٢- العدوى الإحيائية:

بعض الفيروسات النباتية لايمكنها ان تحدث اصابة عند حقنها ميكانيكيا في النبات وتنتقل مثل هذه الفيروسات في الطبيعة **بوساطة ناقلات** والكثير من هذه الناقلات حشرات (ولكن هنالك غيرها مثل **الديدان الاسطوانية والفطريات**) وعند الحقن في المعمل تربى الحشرة الناقلة مثل المن في المعمل وتغذى على النباتات المصابة او على العصير بعدئذ ينقل هذا المن ويوضع في اقفاص صغيرة على النباتات السليمة ومن خلال اجزاء الفم الثاقب الماص يحقن المن الفيروس في النبات العائل ومن ثم يتكاثر الفيروس

حشرة أبو العيد

مفترس المن

*زراعة الفيروسات النباتية:

تستخدم لتنمية الفيروسات النباتية وإكثارها وزراعتها التالية:

٣-زراعة الفيروسات البكتيرية:

من السهل جدا زراعة الفيروسات التي تصيب البكتريا (لاقمات البكتريا).ويلزم ذلك تنمية خلايا بكتيرية حساسة للإصابة بحيث تكون طازجة النمو او حديثة النمو (٤-١٢ ساعة)وتتم التنمية وزراعة الخلايا البكتيرية على وسط غذائي خاص بهذه البكتريا ويجب ان يقنن محقن اللاقم روتينيا وذلك تبعا لعدد الفيريونات ولعدد الخلايا البكتيرية (المكونة للمستعمرات) وذلك في طورها اللوغارتميي ويتطلب هذا سابق التقدير لتعكير المعلق البكتيري بالنسبة لعد المستعمرات التي يكونها.وتتميز الفيروسات البكتيرية بتكاثرها السريع جدا ففي خلال ساعات قليلة من اصابة الخلايا البكتيرية يحدث تحلل بمجرد ان تصل خلفة الفيروسات الى حجم الانفجار ويمكن ان يكتشف تحلل المزارع البكتيرية بسهولة عن طريق نقص التعكير مقارنة بالتجارب المقارنة او عن طريق معايرة الارتفاع في عدد اللاقمات

٤- زراعة فيروسات الحشرات

تعد **اليرقات اكثر اطوار دورة الحياة حساسية للاصابة بفيروسات الحشرات** وفي بعض الاحيان فان انسلاخا معينا من اليرقات يكون اكثر حساسية للاصابة بالفيروس من غيره من انسلاخات اليرقة .

واما ان يزود معلق المحقن الفيروسي في الغذاء الذي تتغذاه اليرقات و **اما ان يرش مباشرة على اليرقات** ويلاحظ ان اليرقات المرية بالفيروس تظهر افرازات او تغييرات في لون الجلد وتعد هذه مصدرا للفيروس المزروع

المعايرة

***المعايرة:** معايرة الفيروسات تعني تحديد قوته حسابيا او بمعنى اخر هو التقدير الكمي لعدد الفيريونات (الدقائق الفيروسية الكاملة الحية المعدية) او انه تقدير العدوى كميا

معايرة الفيروسات: يمكن ان يعاير محتوى الفيروسات المعدية في أي معلق فيروسي مجهول عن طريق احداث عدوى به :للمزارع الخلوية او لاجنة الدجاج او للحيوانات المعملية بعمل سلسلة من تخفيفات المعلق الفيروسي في محلول منظم الفوسفات الملحي ثم تفحص على مدى الايام التالية للحقن لمشاهدة دليل التأثير على تكاثر الفيروس ويوجد نوعان من معايرة الاصابة يجب التمييز بينهما وهما الكمي والكمي غير المحدد

.

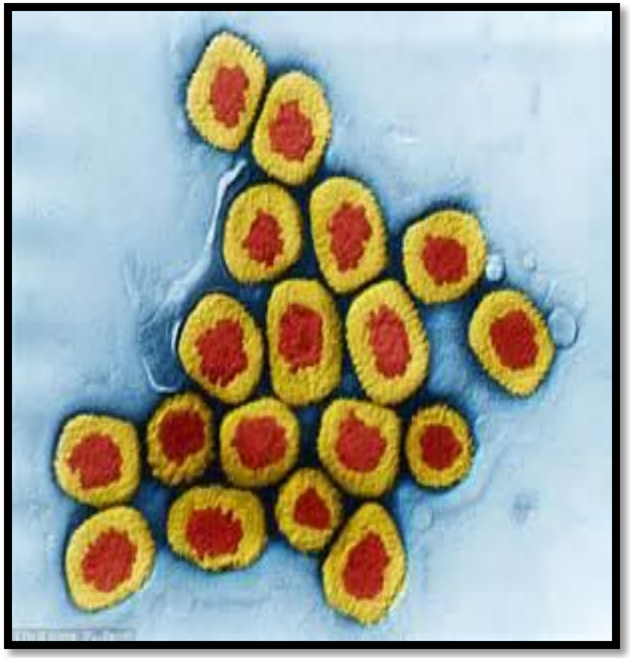
***المعايرات الكمية :**وفي هذه الطرق يقدر عدد الفريونات (الدقائق الفيروسية الكاملة الحية المعدية)

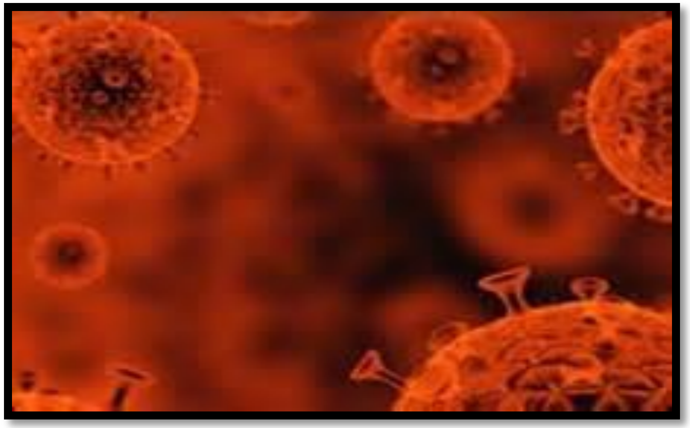
وفي مايلي الطرق التي تستخدم في المعايرات الفيروسية

١-معايرة الروائق: وقد تأسست هذه الطريقة بوساطة دلبيكو وزملائه عام ١٩٥٢ وهي تحوير للطرق التي اكتشفت من قبل واستخدمت معايرة روائق لاقمات البكتريا وفي هذه الطريقة يخفف الفيروسي الخام عشريا ويضاف (يحقن) كميا بحجم ثابت على حصيرة الخلايا وحيدة الطبقة كاملة الافتراش المزروعة كخلايا منفصلة في طبق مقسم الى عيون (حفر) او في اطباق بتري واحيانا في زجاجات مستوية القاع ثم تحضن المزارع الخلوية المحقونة لمدة ساعة في حضانة بدرجة ٣٧ م حتى تتم عملية اتصال الفيريونات وادمصاصها بالخلايا ويتبع ذلك بسكب وسط النمو السائل للتخلص من الفيروسات الزائدة حتى لاتعيق التكاثرثم يحل محلها وسط نمو يحتوي اما على جل صلب (مثل الاجار) واما على شبه صلب . بعد وضع سيليولوز وحصر الاجار باضافة حجم واحد من الجل الى وسط النمو السائل بعد وضع الطبقة المغطية للجل يجب ان تبقى الاوعية مستقرة في موضعها لمدة ساعة حتى يحدث التصلب متساو للجل ثم تحضن بعد ذلك عند درجة الحرارة المناسبة ويضمن الجل التوزيع المقيد من الدقائق الفيروسية بحيث لاتنتقل فقط الا الى الجوار المباشر لموقع الفيروس الذي احدث الإصابة وعقب التحضين لفترة تمتد من يومين الى اربعة اسابيع اعتمادا على نوع الفيروس موضع الدراسة فان الخلايا وحيدة الطبقة تصبغ بصبغة حيوية مثل الاحمر المتعادل او بنفسجي الكريستال وتمتص الخلايا الحية فقط الصبغة وتظهر الروائق كمناطق رائقة شفافة ضد خلفية مصبوغة والتي يسهل عدها وتوصفها ويمكن معايرة الفيروسات غير القاتلة للخلايا بطريقة مماثلة اذ يمكن التعرف على الروائق بتقنيات مثل الادمصاص الدموي او التداخل او بالصبغ بالجسم المضاد الوميض وبعض الفيروسات الاخرى مثل الفيروسات القوبائية وفيروسات الجدري تنتج روائق في خلايا وحيدة الطبقة منماة في وسط سائل ويرجع ذلك لان الفيروسات التي تتكون حديثا تظل مرتبطة مع الخلية ومن ثم فان الروائق تتكون عن طريق الانتشار بين الخلايا المتجاورة من الخلايا الخلوية وتكفي الاصابة بفيريون واحد (دقيقة فيروسية معدية) ليكون رائقة .

٢-معايرة الجيوب البثرية ((التجديرات)):

ان احداث عدوى من فيروسات الجدري او الفيروسات القوبائية على الغشاء السقائي المنباري لجنين الدجاج يؤدي الى تكوين افات تشبه الجيوب البثرية وكل جيب بثري يكون راجعا الى عدوى من دقيقة فيروسية مفردة وتنتج فيروسات الجدري وفيروسات القوباء جيوبا بثرية مختلفة بشكل مميز على الاغشية السقائية المنبارية

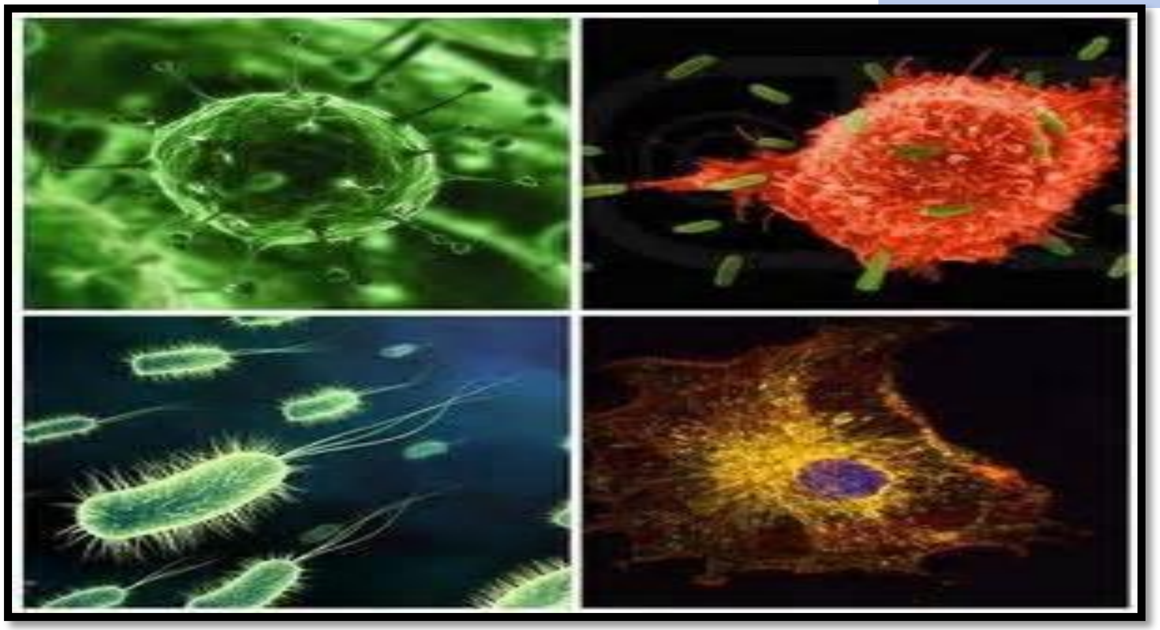




٣-معايرات التحول:

تسلك الفيروسات المولدة للسرطان في الخلايا التي تصيبها طريقين مختلفتين .فالفيروس اما ان يتكاثر في الخلايا منتجا تأثيرا مرضيا خلويا وهو الذي يقتل الخلايا واما انه يكون غير قاتل ولايتكاثر لكنه يحول الخلية.

والخلايا المتحولة لاتقتل ولكنها تتغير الى خلايا سرطانية اذ تكتسب خواص الخلايا السرطانة وبسبب ان هذه الخلايا تظهر قليلا من تثبيط الاتصال فانها تنمو بسرعة شديدة جدا دون أي تقييد وتنتج خلايا متكومة تعرف بالورم الدقائق تبرز واضحة على خلفية من الخلايا العادية وحيدة الطبقة ومن عدد من البؤر يتبين من السهل جدا حساب عدد الفيريونات التي كونت هذه البؤر الورمية ولهذا السبب يطلق على هذه الطريقة :المعايرة البؤرية وهذه الطريقة تعد مرحة ومناسبة لمعايرة بعض الفيروسات المولدة للسرطان مثل فيروس ساركومة راوس باستخدام المزارع الخلية الليفية لجنين الدجاج .



***المعايرات الكمية غير المحددة :**

وهذا النوع من العايرة لايسجل عدد الدقلئق الفيروسية الحية المعدية في المحقن لكنه يسجل فقط ماذا كان الفيروس موجودا او غير موجود على الإطلاق وبكونه معايرة موجودة من عدمها لذا فانه غير دقيق ويستخدم فقط بالنسبة للفيروسات التي لاتكون روائق او تعمل سلسلة عشرية من تخافيف للفيروس ثم تحقن في عدة مكررات من المزارع الخلوية او اجنة الدجاج او الحيوانات المعملية ويسمح بوقت كافي كي يتكاثر الفيروس وينتشر ليدمر كل المزرعة الخلوية وان يقتل جنين الدجاج او الحيوان حسبما تكون الحالة والنتيجة تكون اما موجبة او سالبة .

١-معايرة الفيروسات النباتية

معايرة الجروح الموضعية: قد قدم هولمز هذه الطريقة لاول مرة عام ١٩٢٩ م وقد بين ان جروحا تقرحية موضعية تنتج على اوراق نبات التبغ نوع عقب الحقن الميكانيكي بفيروس تبرقش التبغ والتي يمكن ان تستخدم لمعايرة الاصابة النسبية للفيروس

تنتج اصابة محددة وليست جهازية تعطي جروحا موضعية تقرحية والتي تستلزم ازالة لون الكلوروفيل للاوراق بوساطة المعاملة بالكحول الاثيلي ثم يضاف محلول اليود في يوديد البوتاسيوم ليعطي لونا ازرقا داكنا في مواضع النشأ المتراكم موضعيا وللتقدير المناسب للاختلافات في تركيزات الفيروس يمكن الاخذ في نظر الاعتبار الظروف التالية:

١-الاحتياجات الغذائية

٢-تجانس وراثة النبات والنمو وعمر النبات وحتى موضع الورقة المصابة كما ينتج عن حقن نصف الورقة نتائج دقيقة لدرجة كبيرة

٢-معايرة الفيروسات البكتيرية:

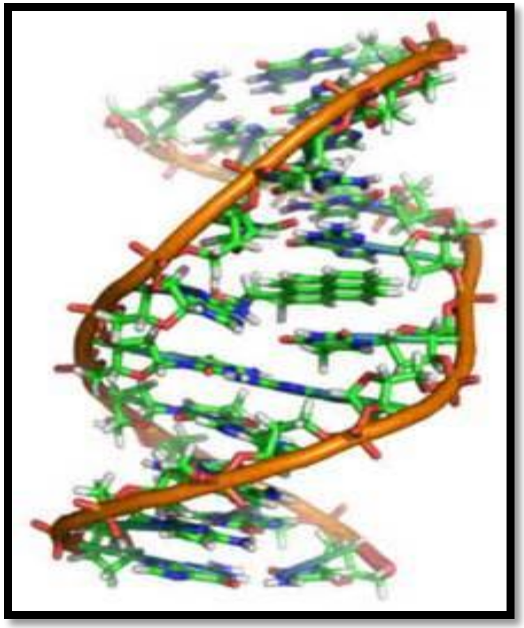
وفي هذه الطريقة تبذر البكتريا الحساسة في الطور اللوغارتمي في الاجار المغذي بعد ذلك تخلط معلقات من تخفيفات الفيروس في حجم ثابت ٠,١ مل مثلا مع ٢,٥ مل من الاجار (٠,٧)% والذي يوزع بانتظام وبسرعة على وسط الاجار الاساسي المتصلب من قبل وعقب استقرار هذه الطبقة تحضن اطباق بتري عند درجة حرارة مناسبة وخلال ١٢ ساعة تظهر مناطق رائقة شفافة زجاجية من الروائق على خلفية معتمة معكرة من البكتيريا وتعد هذه التقنية سهلة ومنتجة بالنسبة لفيروسات البكتريا والاكتينومايسيتات ولفيروسات الطحالب الخضراء المزرقة (البكتريا الزرقاء).

٣-معايرة فيروسات الحشرات

***معايرة الكمية غير المحددة:** وذلك بتغذية اليرقات على غذاء يحتوي على تخفيفات مختلفة من معلق الفيروس وأن ترش اليرقات بتخفيفات من معلق الفيروس بعدئذ يمكن تحديد الجرعة التي تسبب إماتة خمسين في المائة

٤-معايرة عدوى الحامض النووي الفيروسي:

يمكن ان تتخلص الحموض النووية من عدد من فيروسات مختلفة مثل فيروس تبرقش التبغ وفيروس ادنو وشلل الاطفال وبوليوما والفيروس المرتبط بأدنو وفيروس لاكتيك ديهيدروجينيز ويحصل على نتائج ايجابية فقط وبانتظام مع الفيروس الذي تتكون مورثاته من جزيئات مفردة من الحامض النووي الذي لاتحتوي فيروناته على انزيم النسخ .



General Suggestions for Viral Diagnostic Laboratories(i) Use cell cultures to monitor the sensitivity and specificity of NAATs and of rapid antigen assays each year, and, if possible, provide clinicians with the performance data. Encourage further testing by cell culture for specimens with negative rapid antigen test results obtained during high-prevalence seasons from patients with clinical signs and symptoms of infection and for specimens with positive rapid antigen results obtained during periods of low viral prevalence. For laboratories that do not offer virus isolation in cell culture in-house, monitoring may include sending a certain portion of specimens to a reference laboratory for culture confirmation, comparison of the rapid test result with clinical assessment, and review of peer-reviewed journal articles of studies using the assays in question.

(ii) Improve time to virus detection through the use of rapid cell culture methods such as shell vial cultures. Use traditional tube cell cultures to evaluate the sensitivity and specificity of these rapid culture systems.

(iii) Use traditional tube cell cultures for patients with compromised immune systems in order to allow for detection of a wide variety of viruses (rather than testing for only particular viruses), and use traditional tube cultures or combinations of rapid shell vial cultures to cover a variety of viral pathogens in all patients when coinfection is suspected. Use cell culture systems to differentiate viable from nonviable viral particles and when a viral isolate is needed for further testing, such as antiviral susceptibility testing or strain typing.

(iv) Use cell culture to obtain early- and late-in-the-season influenza virus isolates. Submit these to local health departments for strain typing. This is important for ensuring appropriate vaccine strains for the following year.

(v) Use NAAT rather than cell culturing for viruses that (a) do not grow in cell culture (e.g., HCV), (b) should not be isolated in the routine viral diagnostic laboratory (e.g., SARS-CoV), (c) grow too slowly (e.g., hMPV), (d) have titers that are too low (e.g., HSV in CSF), or (e) need to be quantitated (e.g., HIV and HCV).

المراجع

1. كتاب علم الفيروسات / تأليف د. ماهر البسيوني حسين ١٤٢٧
2. كتاب علم الأحياء الدقيقه / د. رقيه محمد قربان قشقري
3. http://www.cfsph.iastate.edu/HPAI/resources/Presentations/Virus%20Isolation-J.Pederson%20&%20M.L.Killian.pdf
4. http://cmr.asm.org/content/20/1/49.full#sec-2
5. http://virology-online.com/general/Test1.htm
6. http://www.microgenbioproducts.com/pdf/Microlab%20Newsletters/MLAB_016.pdf
7. http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio225/chap13/lecture2.htm
8. http://www.virusmyth.com/aids/hiv/pp101basics.htm
9. http://uqu.edu.sa/page/ar/6853