

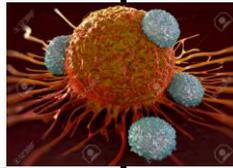
## ■ ■ الفصل الثامن عشر

# تشخيص الفيروسات التي تصيب الإنسان

يعتمد تشخيص الفيروسات خاصة التي تصيب  
الانسان علي ثلاث تقنيات رئيسية هي:

### الخطوة الأولى: عزل الفيروس

وتعتبر أولى خطوات تشخيص الفيروس، ويجب  
تطبيقها عند تشخيص الفيروسات في الإنسان المصاب  
(أحيانا يحمل الانسان السليم الفيروس دون ظهور  
أعراض المرض ويسمي في تلك الحالة حامل  
للفيروس).



### العينة:

تؤخذ العينة من الاماكن المصابة اما أجزاء منها أو بعض افرازاتها والتي من المؤكد وجود الفيروس بها. بعد اخذ العينة توضع في زجاجة خاصة تحتوي علي وسط غذائي مخصص لحفظ العينة مؤقتا بعد ذلك تنتقل الي المعمل في اسرع وقت ممكن ثم تحفظ عند 4 درجة مئوية (في الثلاجة)، واذا تم أخذ العينة من مكان في الجسم المصاب محتمل يكون به تلوث بكتيري يجب إضافة مضاد حيوي للتخلص من البكتريا، بعد ذلك يتم عمل طرد مركزي (سرعة بطيئة) لترسيب بقايا الخلايا البكتيرية والتخلص منها ويظل الفيروس عالقا في المحلول والذي يمكن إستخدامه في ما يلي:

١- حقن مزارع الانسجة أو ٢- جنين الدجاج المخصب في البيض أو ٣- حقن حيوانات التجارب.

### أولا: مزارع الأنسجة:

وفيها يتم زراعة خلايا مأخوذة من الانسان أو الحيوان، حيث تنمو علي هيئة طبقة سمك خلية واحدة علي جدار زجاجة الزرع، تحضن الخلايا المنزرعة عند درجة حرارة ٣٦ درجة مئوية في محلول غذائي يحتوي علي المواد المغذية الاساسية وهي:

أ-جلوكوز (المصدر الرئيسي للطاقة)

ب-مصل (سيرم) مأخوذ عادة من عجول أو من انسان أو حصان.

ج-مصدر بروتيني

د-بنسلين أو ستربتوميسين (مضادات حيوية) لمنع التلوث بالبكتريا

ه- بيكربونات صوديوم كوسط منظم حيث يعمل علي ضبط الوسط الحامضي  
(بين ٢، ٧-٤، ٧)

ملحوظة: في بعض الاحيان يتم امداد الوسط المغذي بالاحماض الامينية  
والفيتامينات.

### أنواع مزارع الأنسجة:

توجد ثلاث أنواع من مزارع الأنسجة تستخدم في مجال زراعة واكثار  
الفيروسات هي:

#### ١- المزارع الأولية Primary:

يتم تجهيزها عن طريق تقطيع العينة النسيجية المناسبة للزرع الي خلايا متفرقة  
باستخدام الترسين، بعد حقنها بعد ذلك بالفيروس بحيث تنقسم الخلايا في هذه  
المزارع ببطأ مكونة طبقة من الخلايا سمكها خلية واحدة (طبقة مونو)، يتضاعف  
الفيروس بعد حقنه فيها وبعد ٢-٣ اسابيع تموت هذه الخلايا ويتم التخلص  
منها.

من أنواع الخلايا المستخدمة في هذا النوع من المزارع الخلايا المأخوذة من  
نسيج الكلي في القروود أو خلايا من الغشاء الداخلي لجنين الانسان (أمنيون). كما  
ان هذا النوع من المزارع هو الاكثر استعمالا وأيضا الامثل لعزل العديد من  
الفيروسات.

#### ٢- المزارع نصف المستمرة Semi-continuous :

وعادة ما تكون خلايا هذا النوع من المزارع من الفيروبلاستس  
**fibroblasts** مأخوذة من أنسجة الأجنة (مثل أجنة الانسان)، وتتميز هذه الخلايا  
بأن معدل نموها سريع هذا بالاضافة الي إمكانية تكرار زراعتها حتي ٥٠ تمريرة  
**passage**، ومن ثم الحصول علي أعداد كبيرة من جزيئات الفيروس من نتاج

تضاعف الفيروس.

### ٣- المزارع المستمرة Contionous :

تؤخذ عادة خلايا هذه المزارع من أنسجة سرطانية مثل خلايا هيلا Hella (تبعاً لاسم الفتاه التي كانت مصابة بسرطان عنق الرحم، وأخذت عينه من الخلايا السرطانية بالورم الموجود فيها). تتميز هذه الخلايا باحتوائها علي زيادة في عدد الكروموزومات المتباينة ومتنوعة (هيتيرو بلويد heteroploid)، كما أنه أيضا معدل نمو هذه الخلايا السرطانية سريع وبذلك إستمرار زراعتها والإستفاده منها الي مالا نهاية.

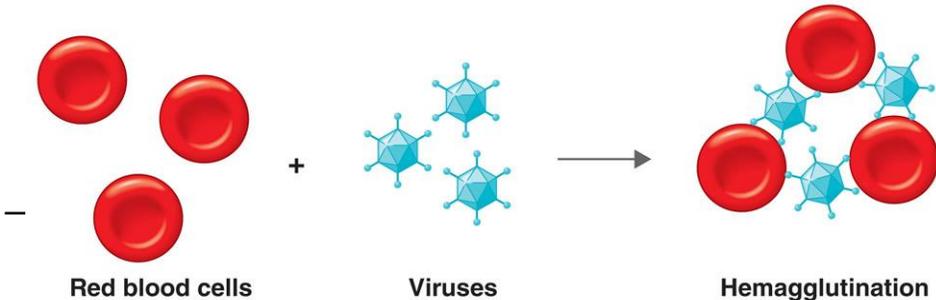
### علامات نمو وتضاعف الفيروسات داخل المزارع المختلفة :

#### ١- التأثير القاتل للخلية: Cytopathic effects

حيث تسبب غالبية الفيروسات عدة تأثيرات في الخلايا المصابة من بينها استدارة الخلايا وانكماشها، ومع بعض الفيروسات الاخري يحدث انتفاخ واتساع في الخلايا بالاضافة الي ان بعض أنواع من الفيروسات قد تسبب تكوين خلايا عملاقة عديدة الانوية تسمى سينكيتيا.

#### ٢- امتزاز او ادمصاص لكرات الدم الحمراء:

حيث انه وعند اضافة كرات الدم الحمراء لمحلول ماخوذ المزارع المصابة بالفيروس، فإن كرات الدم الحمراء تلتصق -إمتزاز- بالخلايا المصابة مما يؤدي الي تجميعها **agglutinate** بسبب وجود الفيروس وتضاعفه بالخلايا المنزرعة (شكل ١٠٣).



شكل (١٠٣) يبين طريقة إمتزاز الفيروس علي كرات الدم الحمراء

### ٣- اضافة الصبغة الفلورنسية:

هذه الطريقة تتم في صورتين أحدهما وهي الطريقة المباشرة والتي يتم فيها ربط الاجسام المضادة المتخصصة للفيروس بالصبغة الفلورنسية، ثم نستخدمها في تتبع وجود الفيروس في محلول مأخوذ من الخلايا المنزرعة حيث ترتبط هذه الأجسام المضادة المعلمة **labelled** بالفيروس حال وجوده لذلك نقيس وجوده بوجود (نتيجة ايجابية) أو عدم وجود الصبغة الفلورنسية (نتيجة سلبية).

في الطريقة الغير مباشرة وهي الأكثر استخداما فيتم فيها استخدام أجسام مضادة للفيروس غير معلمة بالصبغة)، واستخدام ايضا اجسام مضادة للجاما جلوبيولين معلمة بالصبغة الفلورنسية والتي تقوم عند وجود اي أجسام مضادة بالارتباط بها، فاذا فرض ووجد الفيروس في المزراع فتضاف أولا الاجسام المضادة للفيروس حيث ترتبط به مباشرة، ثم تضاف بعد ذلك الاجسام المضادة للجاما جلوبيولين (المعلمة بالصبغة) والتي ترتبط بدورها بالاجسام المضادة فيدل ذلك (بطريق غير مباشر) علي وجود الفيروس.

### ٤- التداخل:

وحيث انه من المعروف أن وجود اصابات فيروسية بسلالة معينة من بعض الفيروسات يمنع اي سلالة اخري من الفيروس من أن تكون تأثيرات خلوية قاتلة CPE من التغيرات التي تحدثها الفيروسات بالخلايا وهذا ما يسمى بالتداخل.

ثانيا: الحقن في جنين الدجاج المخصب:

## السرطان والفيروسات...

يستخدم في هذه التقنية طريقة حقن الفيروس في بيض الدجاج المخصب، حيث كانت تستخدم بشكل أوسع قبل التوسع في استخدام مزارع الأنسجة بديلا عنها لان جنين الدجاج ثابت ويتحمل الإصابة وحساس للإصابة حتي ولو بعدد قليل من الفيروسات بعكس مزارع الانسجة التي تستخدم لأكثار أعداد كبيرة من الفيروسات، وما زالت تستخدم تلك الطريقة عند إكثار فيروس الإنفلونزا.

يتم الحقن في البيضة (التي تحتوي جنين) في ثلاث مواضع فيها هي:

١- في الغشاء الكوريوألانتويك

٢- في التجويف الأمنيوتي

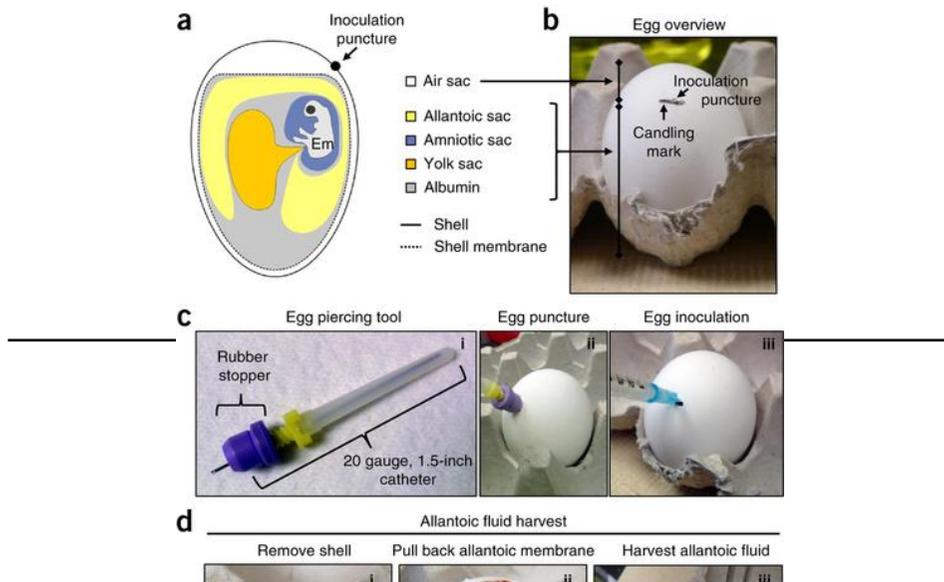
٣- في التجويف الألاتوني

تتم عملية الحقن عندما يكون عمر الأجنة ٧-١٢ يوم ويختلف تقدير العمر المناسب للحقن حسب موضع الحقن (شكل ١٠٤).

ويمكن ملاحظة وتتبع نمو الفيروس في الأجنة بوجود مايلي:

- تكوين بقع داكنة **Pocks** علي الغشاء الكوريوألانتوني تسمي «بوكس»

- التلازن أو تجميع كرات الدم الحمراء: وذلك عند اضافتها للمحاليل المحتوية علي الفيروس وذلك في التجويف الألاتوني وكذلك التجويف الأمنيوتي، حيث أن عملية تجميع كرات الدم الحمراء تدل علي وجود الفيروس الذي ساعد في تجميعها.



شكل (١٠٤) حقن بيض الدجاج المخصب بفيروس الإنفلونزا لإكثاره

ثالثا: اكثار الفيروسات في حيوانات التجارب:

تستخدم لهذا الغرض العديد من الحيوانات لاكثار الفيروسات فيها بعد حقنها بالفيروس، بعد ذلك يتم ملاحظة العلامات الخاصة بالمرض الفيروسي (الأعراض) أو موت الحيوان نتيجة الإصابة. يتم الكشف وتعريف الفيروسات التي يتم عزلها من الحيوانات المصابة عن طريق إجراء اختبارات تستخدم فيها الاجسام المضادة المتخصصة للفيروس (القياسية **standard**) أو عن طريق تثبيط أو منع تجميع كرات الدم الحمراء.

الخطوة الثانية: الاختبارات السيرولوجية

تستخدم الطرق السيرولوجية (نسبة الي السيرم المضاد **antiserum** والذي يتكون فيه الأجسام المضادة **antibodies** عند اصابت الانسان بالفيروس)، يوجد طرق سيرولوجية عديدة تستخدم للكشف عن الاصابات الفيروسية وهي شديدة التخصص، حيث يتم فيها الكشف أو استخدام الأجسام المضادة المتخصصة للفيروس (أنواع مختلفة) **Antibodies** والذي يتسبب في تكوينها بالحيوان أو الانسان المصاب بالفيروس هو بروتينات الفيروس نفسه **antigen** وأنواع تلك

الاجسام المضادة كالتالي (شكل ١٠٥).

### ١- الأجسام المضادة من النوع IgM

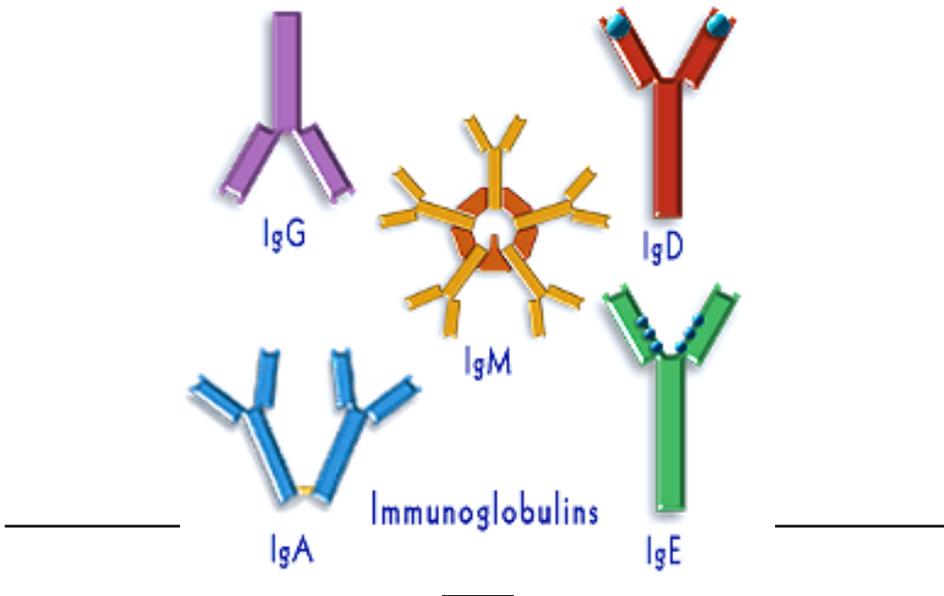
وهي جزيئات كبيرة توجد في السيرم (سائل مكون من مواد بروتينية موجود بالدم) وهي أول أجسام مناعية تتكون في بداية الإصابة الفيروسية ويستمر وجودها في دم المصاب أسابيع قليلة. ويعتبر وجودها في الدم دليل على ان الإصابة الفيروسية حديثة (حدثت قريبا) حيث تتكون خلال الأسابيع الأولى للإصابة.

### ٢- الأجسام المناعية من النوع IgG

وهي صغيرة الحجم بالمقارنة بالنوع السابق **IgM** وتوجد في السيرم وتظهر في الدم بعد تكون النوع السابق، لكنها تظل موجودة في دم المريض الذي اصيب بالفيروس فترات طويلة قد تمتد الى سنوات عديدة وهي التي تعطيه مناعة ضد ذلك الفيروس

### ٣- الأجسام المناعية من النوع IgA

تتواجد هذه الأجسام المناعية في افرازات الجهاز التنفسي واللعاب وافرازات الأمعاء وكذلك في لبن الام



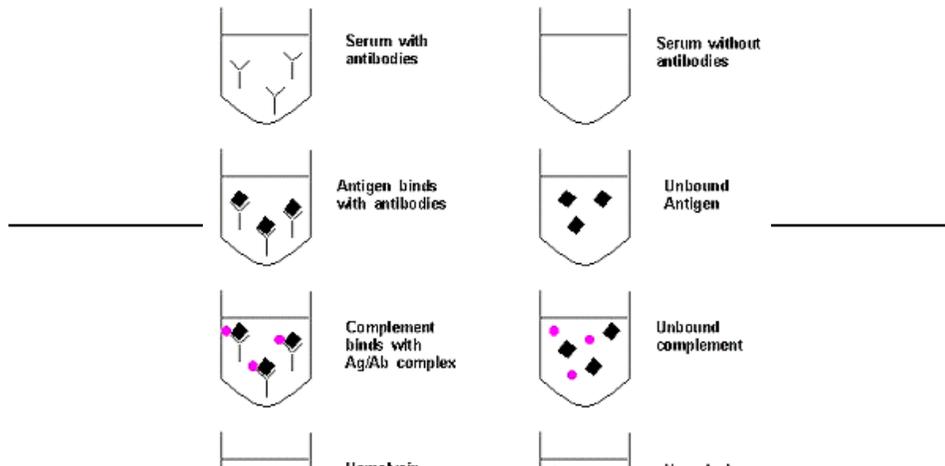
## شكل (١٠٥) أنواع الأجسام المضادة المختلفة

### طرق الكشف عن الأجسام المضادة:

#### ١- طريقة تثبيت المكمل:

وفي هذه الطريقة يتم اضافة المكمل (عبارة عن بروتينات عديدة حوالي ٢٠ توجد في السيرم وتساهم في التخلص من الخلايا الغريبة وكذلك يرتبط بشدة بمعقد الفيروس وهو الانتيجن والجسم المضاد المتخصص للفيروس (Ag-Ab) الي السيرم المأخوذ من المريض فاذا وجدت أجسام مضادة بالسيرم فانها سوف ترتبط بالفيروس ويكونا معقد والذي يقوم المثبت بدوره في الارتباط مباشرة بالمعقد ويعقبه اضافة كرات الدم الحمراء (دليل) وبذلك فان المثبت يرتبطه سوف لا يكون حرا للقيام بتحليل كرات الدم الحمراء (لان المثبت من خصائصه تحليل كرات الدم الحمراء) لذلك يحدث تجميع لكرات الدم الحمراء في قاع الانبوبة ويبدو السائل رائقا ويدل ذلك علي ان التفاعل ايجابي، في المقابل في حالة عدم وجود اجسام مضادة في السيرم فان الفيروس (الانتيجن) سيظل حر دون ارتباط مع شيء لذلك عند اضافة المكمل سيقتي حر حيث لا يوجد معقد كما سبق، وعند اضافة كرات الدم الحمراء يتم تحليلها وتكسيروها عن طريق المكمل لوجوده بشكل حر ويبدو في النهاية السائل أحمر (تفاعل سلبي) اي غير متفاعل (شكل ١٠٦).

### Complement Fixation Test



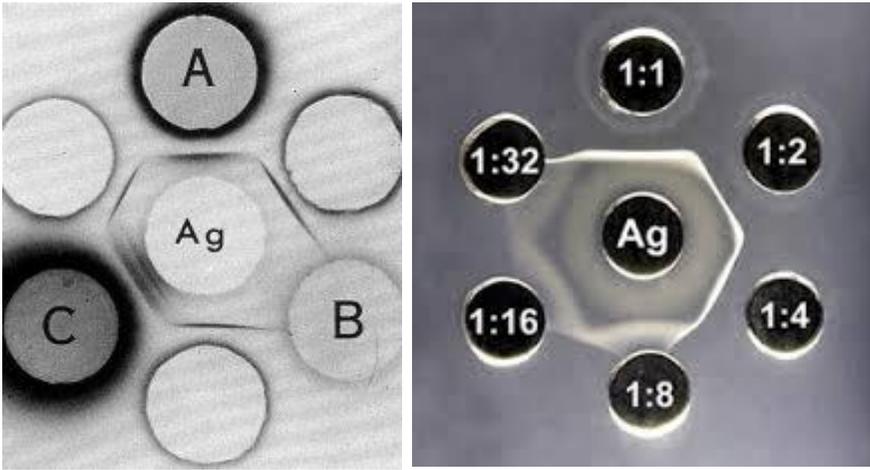
شكل (١٠٦) طريقة تثبيت المكمل

## ٢- اختبار التعادل:

تعتمد هذه الاختبارات علي خصوصية الارتباط لتعادل الأجسام المضادة بالسيرم مع سلسلة من محلول الفيروس المخففة، لكن هذه الطريقة تستهلك وقت طويل وتحتاج لكميات كبيرة من المواد المتفاعلة.

## ٣- الانتشار خلال الآجار «أوخترلوني Ouchterlony»

يتم في هذه الطريقة وضع الأجسام المضادة المتخصصة للفيروس والموجودة بالسيرم وكذلك الفيروس (كل علي حده) في حفر منتظمة داخل الآجاروز عن طريق عمل حفر wells (تكون ثقوب صغيرة تسمح للمتفاعلات بالمرور خلال الآجاروز بالانتشار) ثم يسمح لهما بالانتشار خلال الآجار حتي تتقابل المتفاعلات (الأنتيجين وهو الفيروس والأجسام المضادة المتخصصة له) ويحدث بينهما ارتباط في صورة خطوط ترسيبية يمكن صبغها وتحديدتها بسهولة، وتتميز بأنها طريقة سريعة الي حد ما في تحديد الفيروس بالعينة (شكل ١٠٧).



شكل (١٠٧)

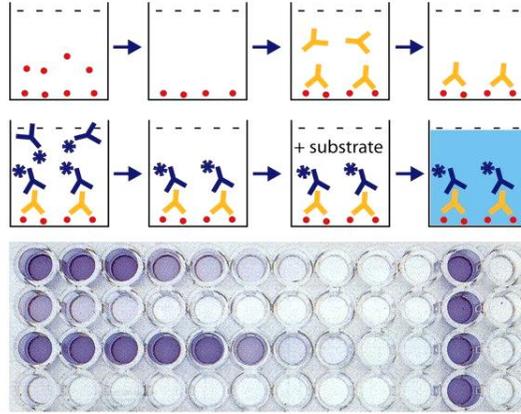
تبين تفاعل الفيروس مع الأجسام المضادة مكونة خطوط ترسيبية «أوخترلوني»

#### 5-تقنية الاليزا ELISA

إسم هذه التقنية «إليزا ELISA» مأخوذ من الحروف الأولى للعبارة **enzyme-linked immunosorbent assay**، تستخدم هذه الطريقة السريعة والحساسة للكشف عن الأجسام المناعية المتخصصة للفيروس نفسه **antibodies**، أو الفيروس **antigen**. في تلك الطريقة يتم إضافة الأجسام المضادة لفيروس أولاً في حفر طبق الاليزا (٩٦ حفرة) ثم يضاف العينة التي قد يكون بها الفيروس، وحيث أنه تم مسبقاً ربط انزيم بنفس نوع الاجسام المناعية المضادة للفيروس بحيث اذا وجد الفيروس المراد الكشف عنها فان الطبقة الثالثة من الأجسام المضادة بالانزيم ومن ثم يرتبط في النهاية بمادة التفاعل الخاصة بالانزيم فيكونا بعد تفاعلها معطيا لونا محدد -يعتمد علي نوع الإنزيم ومادة التفاعل المستخدم- يدل علي ان التفاعل ايجابي (اي ان العينة بها فيروس)، والاليزا اختبار له صور عديدة، وبعد فترة التحضين في الخطوة الأخيرة يتم وضع الطبق في جهاز يسمى «قارئ الاليزا **Elisa reader**»، والذي يقيس شدة اللون الناتج من التفاعل

(شكل ١٠٨).

An example  
of enzyme-  
linked  
immunosorbent  
assay  
(ELISA)



شكل (١٠٨) طريقة إيزا في تشخيص الفيروسات

### الخطوة الثالثة: الكشف المباشر عن الفيروس

#### ١- استخدام الميكروسكوب الالكتروني:

تستخدم هذه الطريقة السريعة في التشخيص حالياً وبشكل واسع وذلك للكشف عن وجود الفيروسات في عينات مأخوذة من المرضى، حيث باستخدام هذه الطريقة يظهر شكل وكذلك تركيب جزيئات الفيروس تفصيلاً مما يساعد في التفرقة بين مجموعات الفيروسات المختلفة، علماً بأن عدم ظهور جزيئات الفيروس أثناء فحص العينة بهذه الطريقة ليس معناه عدم وجوده أو إبعاده من تكملة باقي طرق التشخيص لأنّه أحياناً يستلزم وجود تركيز عالي من جزيئات الفيروس في العينة حتى يسهل مشاهدته بالميكروسكوب الالكتروني، وبرؤية شكل الفيروس يكون بذلك ما يعبر عنه أنه عين اليقين.

#### ٢- الاختبارات الومضية باستخدام الأجسام المضادة:

وفيها يتم تحديد الفيروس في عينات مأخوذة من الأماكن المصابة باستخدام

أجسام مضادة متخصصة للفيروس في السيرم والتي يتم ربطها بصبغة فلورنسية، هذه الطريقة تعطي تشخيص سريع وأيضا لا تحتاج الي تركيز عالي من الفيروس في العينة في المقابل قد يحدث وأن تعطي نتائج ايجابية كاذبة نتيجة لانه قد يتم صبغ بعض مكونات اخري موجودة بالعينة وعند رؤيتها نتوهم وجود الفيروس وهو غير حقيقي.

### ٣- طريقة التفاعل الانزيمي المتسلسل « PCR » polymerase chain reaction

تلك التقنية كمن يبحث عن ابرة (حمض الفيروس النووي) في كومة من القش، ثم عن طريقها يمكن توين كومة من الابر (الحمض النووي الفيروسي) يمكن التعرف عليه بسهولة. يعتمد هذا الاختبار علي نوع الحمض النووي للفيروس فاذا كان DNA يتم عمل الاختبار مباشرة كما سنشرح تاليا، اما اذا كان الفيروس يحتوي علي RNA فيتم تحويله الي DNA اولا ثم يجري الاختبار ويسمي RT-PCR ومعناها reverse transcription polymerase chain reaction

وتوجد شكل جديد للاختبار يسمي «qPCR» وهو real-time polymerase chain reaction وهو اكثر دقة وكمي اما السابقة فهي كفي فقط اي اقل دقة منها (شكل ١٠٩).

#### خطوات عمل PCR

١- استخلاص الحمض النووي بطريقة الغليان في حمام مائي (تقليدية) او باستخدام متفاعلات جاهزة «كيتس».

٢- اكثار الحمض النووي (جزء خاص ومعروف منه) وتتم هذه الخطوة في جهاز يشبه الحمام المائي يتم التحكم في درجة الحرارة فيه كما يلي:

٣- تفكيك خيطي الحمض النووي Denaturation بالتسخين عند ٩٢ م لمدة ٥ دقائق.

## السرطان والفيروسات...

٤- خطوة الالتحام **Annealing** وهي ارتباط البادئات **Primers** بأجزاء مكملة علي خيطي الحمض النووي وتتم عند درجة ٦٠ م لمدة دقيقة (يتم تخليق البادئات حسب نوع الفيروس وتركيب حمضه النووي) بحيث ترتبط كل بادئة في اتجاه معاكس للبادئة الاخرى.

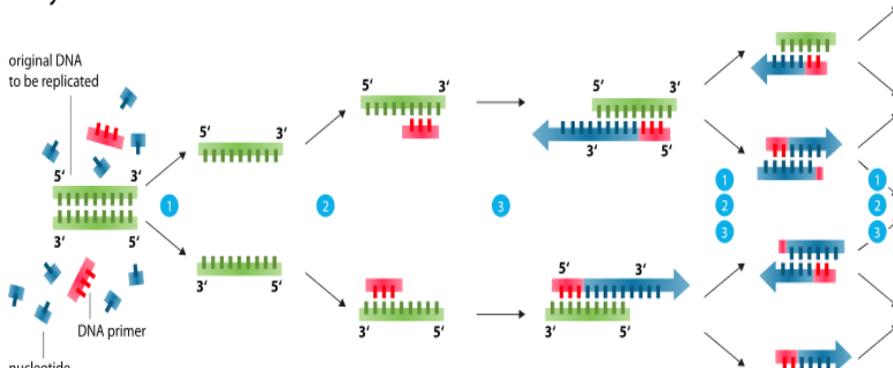
٥- خطوة الامتداد **Extension** وتتم علي حساب انزيم معين مثل (بوليميراز) **Polymerase-Taq** (مستخرج من بكتريا تعيش في الينابيع الساخنة) في وجود قواعد نيتروجينية تعمل علي تكوين اجزاء جديدة من الحمض النووي الهدف وذلك عند درجة حرارة ٧٢ م (انسب درجة لعمل الانزيم) لمدة دقيقة ثم تكرر هذه الخطوة نهائيا لمدة ١٠ دقائق.

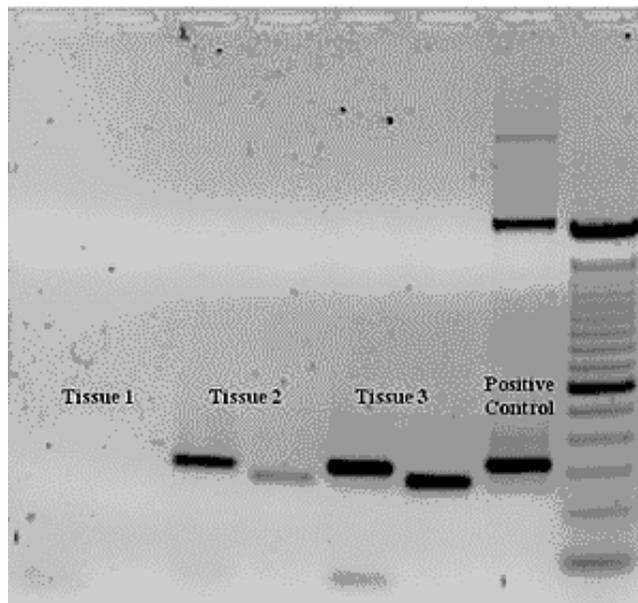
أخيراً يتم عمل هجرة كهربية خلال الاجاروز (نوع من الآجار اكثر نقاوة) **agarosegelectrophoresis** وذلك حسب الوزن الجزيئي للجزء من الحمض النووي الناتج ويتم التعرف عليه بسهولة من خلال اجزاء من **DNA marker** معروفة الحجم والوزن الجزيئي ومرتبة للمقارنة تسمى واسمات **marker** بجانب الناتج المراد بحثه، يتم فحص الجل من خلال **UV-transilluminator**، ثم التصوير بكاميرا بولارويد.

### ملحوظة:

في تقنية **qPCR** تظهر قراءة رقمية تعكس تركيز الفيروس بل ايضا يتم ترجمة النتيجة الي عدد الجزيئات الفيروسية وذلك بعد الرجوع لمقياس تم اعداده من قبل مما يعكس مدي دقة هذا الاختبار.

### Polymerase chain reaction - PCR





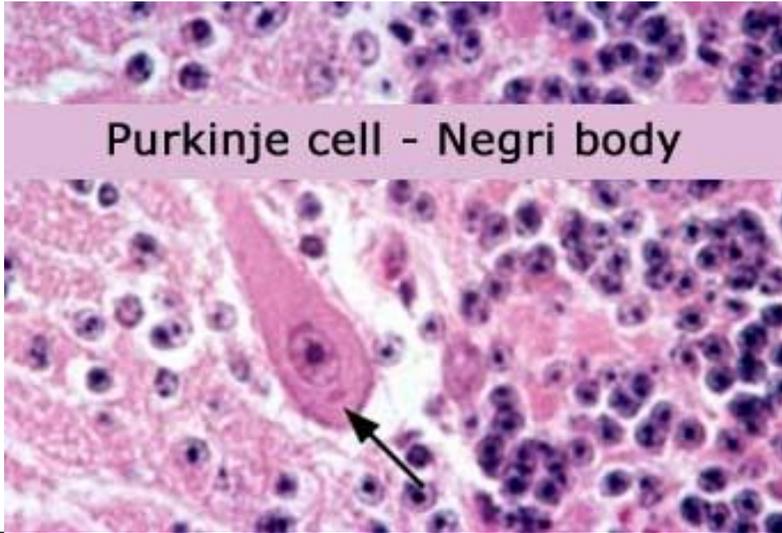
**Figure 3: Ethidium bromide-stained PCR products after gel**

**electrophoresis**. Two sets of primers were used to amplify a target sequence from three different tissue samples. No amplification is present in sample #1; DNA bands in sample #2 and #3 indicate successful amplification of the target sequence. The gel also shows a positive control, and a DNA ladder containing DNA fragments of defined length for sizing the bands in the experimental PCRs

شكل (١٠٩) خطوات الفك وارتباط البادئات وتكوين اجزاء جديدة من الحمض النووي

#### ٤-الكشف عن الأجسام الداخلية (المصاحبة للاصابة) **Inclusion bodies**:

وهي أجسام يسهل صبغها بصبغات حامضية أو قاعدية في النواة أو السيتوبلازم بالخلايا، وهي تتكون فقط غي الاصابات الفيروسية ولها أشكال وأحجام مختلفة حسب نوع الفيروس. بعض هذه الأجسام يتكون من تجمع لجزيئات الفيروس أو عبارة عن خليط من جزيئات فيروسية ومواد من الخلية. في بعض الاصابات الفيروسية يعتمد تشخيص الفيروس أساسا علي هذه الأجسام، مثال علي ذلك أجسام «نيجري **Negri bodies**» والتي تصاحب الاصابة بفيروس السعار (داء الكلب) (شكل ١١٠)



شكل (١١٠) يوضح أجسام نجري في خلايا مصابة بفيروس السعار

## ■ ■ الفصل التاسع عشر

### الفيروسات وعلاقتها بمرض السرطان

توجد أدلة قوية تؤكد علي إرتباط الإصابة الفيروسية بمرض السرطان وتكوين الأورام السرطانية، ذلك ما أكدته التجارب التي أجريت، والتي من خلالها تم عزل بعض الفيروسات من مرضي مصابون بالسرطان، ترتبط العديد من الفيروسات بمرض السرطان الذي يصيب

