

تعريف وتصنيف الفيروسات

VIRUS IDENTIFICATION AND CLASSIFICATION

بيدرو فيليجاس وفيل د. لوكرت

Pedro Villegas and Phil D. Lukert

الملخص Summary

يتطور تصنيف فيروسات الحيوانات بثبات نظراً للاستعمال المستمر للتقنيات الجديدة التي تزيد معرفة الفيروسات غير المصنفة سابقاً كما حدث مع فيروس أنيميا الدجاج الذي صنف حالياً على أنه فيروس سيركو (Circovirus). طورت طرق جديدة لدراسة نوع الحمض النووي الموجود في الفيروس موفرة كمية وافرة من الوقت والحصول على نتائج أكثر دقة. يمكن التعرف على العديد من فيروسات الطيور بسهولة بمميزاتها مثل نشاط تلازن الدم كما في حالة فيروس مرض نيوكاسيل والإنفلونزا ومتلازمة انخفاض البيض. يعطي تأثير بعض الفيروسات الذي يحدث في العوائل التي تزرع فيها أحياناً مؤشرات جيدة جداً لنوع الفيروس الموجود. تعتبر مقدرة فيروسات هيريس لإحداث بقع في الطبقة الواحدة لخلايا الطيور الأولية، وتأثير المرض النمطي الذي يحدثه فيروس أدينو في الطبقة الواحدة لخلايا كبد أجنة الدجاج، والآفات التي يحدثها فيروس التهاب الشعبوي المعدي في أجنة الدجاج هي أمثلة للتعرف الفيروسي. يمكن تحديد حجم وشكل وتمائل ووجود أو غياب الغلاف بواسطة المجهر الإلكتروني. يمكن بالتقنيات الحديثة دراسة وتصنيف الفيروس إذا كان قادراً على النمو في مزارع الخلية أو الأجنة.

المقدمة Introduction

تعتمد المواصفات الموجودة لتصنيف فيروسات الحيوان على الصفات الفيزيائية والكيميائية للفيروس. تقسم الفيروسات إلى مجموعتين أساسيتين وهما: فيروسات تحتوي على حامض نووي ديوكسي ريبوزي وأخرى تحتوي على حامض نووي ريبوزي. تقسم فيروسات دي إن إيه إلى ثماني عائلات، ستة منها تضم ممرضات للطيور. عرفت ١٦ عائلة من فيروسات آر إن إيه، ١١ منها تحتوي على فيروسات ممرضة للطيور. قد تحتوي العوائل الأخرى على

فيروسات ممثلة في أنواع الطيور لكنها لم تعرف حتى الآن مع المرض الإكلينيكي. الجدول رقم (٤٤,١) ينص على عوائل فيروسات دي إن إيه و آر إن إيه، وأغلب أمراض الطيور المهمة المرتبطة بكل عائلة.

الجدول رقم (٤٤,١). عوائل فيروسات دي إن إيه و آر إن إيه وأهم فيروسات الطيور^٨.

النوع	العائلة	الجنس	فيروسات الطيور
فيروسات دي إن إيه			
ds - دي إن إيه	الجدري	جدري الطيور	جدري الطيور، جدري الكناري، جدري الحمام
	أدينوفيريدي	أدينوفيريدي الطيور	التهاب الكبد، متلازمة نقص إنتاج البيض، التهاب معوي نزفي في الرومي والتدرج والإوز
	بابوفيريدي	فيروس بوليوما	مرض أفراخ الببغاوات، سقوط الريش في الببغاء، التهاب الحنجرة والقصبية الهوائية المعدي
	هيريس فيريدي	فيروس ألفا هيريس	التهاب أمعاء البط الفيروسي (طاعون البط)
		فيروس جاما هيريس	مرض مارك وفيروس هيريس في الرومي وفيروسات هيريس الطيور الطليقة والمنزلية
ss - دي إن إيه	باروفيريدي	فيروس بارفو	فيروس بارفو الإوز والدجاج (مرض ديرزي)
		فيروس ديندو	فيروسات مصاحبة للأدينو
	سيركوفيريدي	فيروس سيركو	فيروس أنيميا الدجاج وفيروس المنقار والريش
فيروسات آر إن إيه			
ds - آر إن إيه	ريوفيريدي	فيروس أورثوريو	التهاب المفصل الفيروسي وريو فيروس الحمام (١-٩)
		فيروس روتا	فيروس روتا المسبب للتنظيف المعوي
	بيرنافيريدي	فيروس أفيبرنا	مرض البورسا المعدي
ss - آر إن إيه (-)	أورثومايكسوفيريدي	فيروس انفلونزا أ، ب	أنفلونزا أ
	بارامايوكسوفيريدي	فيروس روبيولا-فيروس بارامايوكسو	فيروس مرض النيوكاسل وفيروس بارامايوكسو الحمام (٢-٩) والتهاب الأنف والقصبية الهوائية الطيري

تابع الجدول رقم (٤٤،١).

التهاب الشعب في الحمام والفيروس التاجي المسبب للزيف المعوي في الرومي	فيروس تاجي	التاجية	ss - آر إن إيه (+)
فيروس كالمسي الطيور	فيروس كالمسي	كالمسي فيريدي	
فيروس التهاب الكبد من النوع الثاني في البط	فيروس أسترو	أسترو فيريدي	
التهاب المخ الطيرى (الارتعاش البوابي) وفيروس التهاب الكبد من النوع الأول والثالث وفيروس التهاب الكبد في الرومي	غير محدد	بيكورنا فيريدي	
فيروس أربو المعدي في الدجاج والتهاب المخ في الطيور البرية	فيروس توجا	توجا فيريدي	
التهاب المخ في الرومي	فيروس فلافي	فلافي فيريدي	
فيروس ساركوما وتكثر نسيج البيض ليكوسيس وشباك بطاني ريتيكيلواندوثيلوسيس والفيروسات السرطانية	فيروس ريترو	ريترو فيريدي	

^A ds = خيط ثنائي ، ss = خيط أحادي ، (-) = سلبى ، (+) = إيجابى .

تستخدم صفات عديدة لتصنيف وتعريف الفيروسات. ملخص هذه الصفات كالتالي :

- (١) صفات الفيروس : الحجم ، والشكل ، ووجود أو غياب الغلاف ، وتمائل البيلومر والكابسيد Peplomers and capsid.
- (٢) صفات المجين : نوع الحمض النووي (دي إن إيه أو آر إن إيه) ، وشكل الشريط (مفرد أو مزدوج) ، وخطي أو دائري ، والحاسة (إيجابي أو سلبى أو كلاهما) ، وعدد القطع ، وحجم المجين ، وتتابع القواعد النووية ... إلخ.
- (٣) خصائص البروتينات : العدد ، والحجم ، والأنشطة الوظيفية للبروتينات التركيبية وغير التركيبية ، وتتابع الحمض النووي.
- (٤) التكاثر : إستراتيجية تكاثر الحمض النووي ، والمرض الخلوي ، وتكوين الأجسام الاحتوائية.
- (٥) الخواص الفيزيائية : الثبات عند درجة الأس الهيدروجيني ، والحرارة ، والمذيبات ، والمنظفات ، والكاتيونات.
- (٦) الخواص البيولوجية : مدى العوائل الطبيعية ، وطريقة انتقال العدوى ، وعلاقة العامل الناقل ، والإمراضية ، والقابلية لنسج محدد ، والمرض المجهرى ، والتوزيع الجغرافى ، والعلاقات المصلية.

من هذه الخصائص ، تستخدم أربعة صفات رئيسية في تصنيف الفيروس وهي : نوع الحمض النووي ، والحساسية لمذيبات الدهون التي تعني وجود غلاف دهني بروتيني ، وقطر الفيروس ، وتماثل الكابسيد النووي (مكعب أو لولبي). تسمح معرفة هذه الخصائص الفيزيوكيميائية بوضع الفيروس في عائلة داخل مخطط التصنيف الموضوع لفيروسات الحيوان. يمكن أن يتم التعرف على الفيروس حالياً مع استخدام المجهر الإلكتروني النافذ ، وتجهيزات الصبغة السلبية يمكن أن يشاهد الفيروس والحجم والشكل والسطح والتماثل. تقلل هذه التقنية من استخدام أنظمة مجهدة لتحديد شكل وتماثل الفيروسات. يمكن أن تستخدم التقنية في مزرعة الخلية أو الأنسجة المصابة أو التحضيرات الفيروسية غير المنقاة (6).

أيضاً مع استخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة والبيتيدات المخلقة وخريطة الموقع البروتيني ، توجد قواعد جزئية جديدة الفهم لهذه العلاقات المصلية التي تستخدم أساساً لتصميم العائلات والأجناس. حالياً نفذ تتابع المجين أو التتابع الجزئي مبكراً في تعريف الفيروس وحتى الأنشطة التشخيصية (8).

يمكن استخدام بعض الصفات الخاصة لفيروسات الطيور المختلفة للتعرف السريع (6، 8) ، شاملة الآتي :

- (١) القدرة لتلزن كرات الدم الحمراء للدجاج تستخدم للتعرف على فيروس مرض نيوكاسيل وفيروس الإنفلونزا ومتلازمة انخفاض البيض لأن هذه الفيروسات تلزن تلقائياً الخلايا الحمراء للدجاج.
- (٢) تنمو معظم فيروسات أدينو الطيور جيداً في خلايا الطبقة الواحدة من كبدة الدجاج محدثة إمرضية خلوية نمطية مع وجود احتوائيات داخل الأنوية.
- (٣) تكوين البقع على الغشاء الكوريوالانتويس لأجنة البيض مع احتوائيات نمطية سيتوبلازمية يميز فيروسات جدري الطيور.
- (٤) تكوين مدمج خلوي في وحيدة الطبقة لخلايا الطيور الطلائية الابتدائية يمكن أن يحدث بواسطة فيروس الريو خاصة بعد معالجة التجهيزات بمذيبات الدهون ، وأيضاً تحدث فيروسات ريو أنزفة واحتقاناً في أجنة الدجاج. تكوين المدمج الخلوي يمكن أن ينتج بالعديد من فيروسات الطيور ولا يجب أن يستعمل كوسيلة وحيدة لتعريف الفيروس.
- (٥) يلاحظ طبيعياً تقزم الأجنة مع فيروس التهاب الشعبي المعدي (فيروس كورونا) وفيروسات أدينو ، إلا أن العترات المتأقلمة في الأجنة لفيروس التهاب الشعبي المعدي تحدث تقزماً أكثر شدة وخللاً في تكوين الريش والتصاقاً قوياً للجنين لغشاء الكوريوالانتويس.
- (٦) فيروس مارك وفيروسات هيريس الطيور الأخرى يمكن أن تدرك في الخلايا الطلائية الأولية وحيدة الطبقة بتكوينها للبقع أو البؤر النمطية. بمجرد التأقلم ، يمكن أن تلاحظ هذه الإمرضية الخلوية في الخلايا الليفية النخاعية وحيدة الطبقة لجنين الدجاج.

تجرى التقنيات لتحديد الصفات الفيروسية بسهولة بمجرد عزل الفيروس وتطور طريقة القياس لمعايرته أو في حالة وجود كمية كافية من الفيروس يمكن تنقيتها من أنسجة العائل المصاب بالفيروس. إن تحديد نوع الحمض النووي يعتبر أحد الخطوات الرئيسية في تعريف الفيروس.

تحديد نوع الحمض النووي Determining Type of Nucleic Acid

الطرق المباشرة Direct Methods

تتطلب هذه الطرق تركيزاً وتنقية لفيروس يتبعها استخلاص وتوصيف الحمض النووي بإنزيم نيوكلييز أو التحلل المائي الكيميائي التفريقي. بداية، ينتج كمية كبيرة من الفيروس وتمزق الخلايا أو الأنسجة بالطحن و/أو التجميد والإذابة. تزال بقايا الخلايا بالطرد المركزي عند ١٠٠٠٠ إكس جي لمدة ١٠ - ١٢ دقيقة، وعندئذ يغطى الرائق بطبقة من سكروز ٤٥٪ ويرسب بالطرد المركزي عند ١٤٠٠٠٠ إكس جي لمدة ساعتين عند ٤ م. يعاد تعليق الفيروس المرسب في محلول تريس منظم عند بي إتش ٧.٤ وينقى بجعل الفيروس في حلقة في كلوريد السيزيوم أو السكروز المتدرج.

قد يركب كلوريد السيزيوم المتدرج بإعادة تعليق الفيروس في محلول تريس، وتضبط الكثافة إلى ١.٤ جم/مل مع كلوريد السيزيوم ويطرد مركزياً للاتزان (٢٧٠٠٠٠ إكس جي لمدة ١٦ ساعة عند ٢٠ م). يجمع الفيروس بثقب جانبي بواسطة محقن له إبرة مقاس ٢٢.

يتم تكوين السكروز المتدرج الخطي (٢٠٪ - ٦٠٪ وزن/حجم) في محلول تريس ويعاد تعليق الراسب وتغطى من أعلى. بعد الطرد المركزي عند ٢٧٠٠٠٠ إكس جي لمدة ٩٠ دقيقة عند ٤ م تجمع ربة الفيروس بالثقب الجانبي.

بعد التنقية يضبط معلق الفيروس إلى تركيز ١٪ من سلفات دوديسيل الصوديوم (SDS) لتمزيق الفيروس. يستخلص عندئذ الحمض النووي مع فينول : كلوروفورم : كحول إيزوأميلي (٢٤:٢٤:١ حجم/حجم/حجم) بحجم مساوي لحجم العينة المائية. يرسب عند ذلك الحمض النووي في الحالة المائية مع ٣ جزيئات من خلات الصوديوم والكحول الإيثيلي (حمض نووي : خلات صوديوم : كحول إيثيلي بنسبة ١:٠,١:٢ حجم/حجم/حجم) عند ٧٠ م. يرسب الحمض النووي ويعاد إذابته في ماء مقطر. ويخضع عندئذ لإنزيمات نيوكلييز المختلفة لتحديد نوعه. يجري تحليل فصل كهربائي على الآجاروز المصبوغ بالأكردين البرتقالي أو بروميد الإيثيديوم للعينة المعالجة بالنيوكلييز أو غير المعالجة. في حالة حساسية الحمض النووي لإنزيم نيوكلييز معين، تشهد الحرارة المعالجة كحلقة عند النقطة حيث يلاحظ الحمض النووي غير المعالج. وصفت الطريقة السابقة بالتفصيل في أماكن عديدة (2, 11).

الحمض النووي لكل من الفيروسات مفردة أو مزدوجة الشريط يُهضم كاملاً بوحدة واحدة من إنزيم دي إن إيبز البنكرياسي لكل ٠.٥ من الميكروجرامات من دي إن إيه عند ٣٧ م لمدة ٣٠ دقيقة. تهضم وحدة واحدة من نيوكليز S1 ٠.٥ ميكروجرام من الحمض النووي مفرد الشريط في ٣٠ دقيقة عند ٣٧ م، لكنها لا تؤثر على دي إن إيه مزدوج الشريط. يهضم الحمض النووي آر إن إيه لفيروسات آر إن إيه مفردة أو مزدوجة الشريط بإنزيم آر إن إيبز البنكرياسي في تركيزات منخفضة من كلوريد الصوديوم (١ ملليمول)، لكن يُهضم فقط آر إن إيه مفرد الشريط في تركيز عالي من كلوريد الصوديوم (١٥٠ مللي مول). الطريقة الأخرى لتفريق آر إن إيه من دي إن إيه بإخضاع الحمض النووي إلى ٠.٣ مول من هيدروكسيد الصوديوم الذي يحطم آر إن إيه وليس دي إن إيه. عند استخدام الأكريدين البرتقالي لصبغ الحمض النووي في الفصل الكهربائي في الآجاروز سوف يشع الجزيء مفرد الشريط أحمر ومزدوج الشريط يشع اللون الأخضر. تحدد الطبيعة المقسمة للمجين الفيروسي بالفصل الكهربائي في الآجاروز للحمض النووي المجيني في أي من هلام الآجاروز أو عديد الأكريلاميد مع ملاحظة أكثر من حلقة من الحمض النووي عندما يصبغ الهلام (2).

تشمل الطرق التقليدية لاستخلاص الأحماض النووية من العينات الإكلينيكية الهضم بإنزيم بروتيناز K ويليها الاستخلاص بالفينول والكلوروفورم : الكحول الأيزوأميلي (٢٤ : ١ حجم/حجم). ترسب الأحماض النووية الناتجة في وجود أملاح وإيثانول بارد. يغسل راسب دي إن إيه بالإيثانول البارد ٧٠٪ لإزالة أي ملوثات، ويجفف ويذاب في نظام محلول مناسب لطرق التقييم (12).

نُقلت الطريقتان التاليتان لتحضير دي إن إيه من الأنسجة ومزارع الخلية من نشرة الطرق الجزئية لاكتشاف الفيروس (12).

طريقة ١ Method 1

- (١) اجمع خلايا مزرعة الخلية الملتصقة بعملية الترسين أو الكحت واتبعها الطرد المركزي. الخلايا النامية في معلق قد تطرد مركزياً مباشرة. اغسل الخلايا المترسبة مرتين في محلول ملح فوسفات لإزالة الوسط الغذائي وبروتينات المصل.
- (ب) البديل، اطحن الأنسجة جيداً بقدر المستطاع. قد تجمد هذه العينات في نيتروجين سائل وتطحن. تعطي الخطوة السابقة دي إن إيه أكثر لكن تُنتج هذه الطريقة مواداً كافية لعديد من الهضم القصري حتى من العينات الصغيرة المأخوذة من طائر حي (biopsy).
- (٢) أعد تعليق العينات في كلوريد تريس ١٠ ملليمول، بي إتش = ٨، ٢٥ ملليمول إديتا و ١٠٠ ملليمول كلوريد صوديوم. أضف سلفات دوديسيل الصوديوم وبروتيناز K (لتحليل الخلايا ولتعطيل البروتين) إلى التركيزات النهائية ١٪ و ٠.١ مجم/مل على التوالي وحضن العينات ٢١ - ١٨ ساعة عند ٣٧ م.

- (٣) استخلص العينات المهضومة مرتين بواسطة فينول : كلوروفورم : كحول إيزوإيثيلي ، ورسب مع ٢ مجم كحول إيثيلي ١٠٠٪. استعد الحلقات البيضاء من الحمض النووي دي إن إيه (والحمض النووي آر إن إيه الملوث) بالطرد المركزي. اغسل الراسب بكحول إيثيلي ٧٠٪ وجفف.
- (٤) أعد تعليق الراسب في كلوريد تريس ١٠ ملليمول ، رقم حموضة ٨ ، ١ ملليمول إديتا و ١ ميكروجرام/مل إنزيم ريبونوكليز خالي من دي إن إيز.
- (٥) أعد الاستخلاص العضوي المذكور في خطوة ٣ ، يعقبه الترسيب بالكحول الإيثيلي في وجود ٠.٥ مجم من خلاص الأمونيوم ٧.٥ مول.

طريقة ٢ Method 2

- وصفت هذه الطريقة بواسطة Grimberg et al. (7) وصممت للاستخلاص السريع للحمض النووي دي إن إيه من الدم الكامل لكن تعمل جيداً مع الخلايا المزروعة والأنسجة. يعتبر دي إن إيه عالي الوزن الجزيئي ومناسباً للهضم الإنزيمي القصري وكذلك تفاعل البلمرة المتسلسل يمكن أن يتم مع معاملات قليلة في ٢ - ٣ ساعات جاعلاً هذه الطريقة تقنية جذابة لمعامل التشخيص الجزيئي.
- (١) أطلق الأنوية بإضافة تريتون x ١٠٠ محتويًا على محلول (٠.٣٢ مول سكروز ، ١٠ ملليمول هيدروكلوريد تريس ، رقم حموضة ٧.٦ ، ٥ ملليمول كلوريد ماغنيسيوم ، ١٪ تريتون x ١٠٠) إلى الدم الكامل أو الخلايا المترسبة. اجمع بواسطة الطرد المركزي عند ٩٠٠ إكس جي لمدة ٥ دقائق.
- (٢) علق الأنوية في ١٠ ملليمول هيدروكلوريد تريس ، رقم حموضة ٨ ، ١٠ ملليمول كلوريد الصوديوم ، ١٠ ملليمول إديتا ، ١ مجم/مل بروتيناز K وحضن لمدة ساعتين عند ٦٥ م°.
- (٣) استخدم الحمض دي إن إيه الناتج مباشرة أو عرضه إلى المعالجة بإنزيم آر إن إيز والاستخلاص العضوي كما وصف في طريقة ١.

من نفس البحث المنشور (12) نقلت طريقة تحضير آر إن إيه. كما تم في عزل دي إن إيه ، تحتاج تحضيرات آر إن إيه الكامل إلى فصل سريع للحمض آر إن إيه من إنزيمات النواة الداخلية (endogenous nucleases). آر إن إيز RNase هو بروتين عالي الثبات قادر على مقاومة التعقيم بالأوكلاف ، ومن ثم يجب أن تؤخذ احتياطات عديدة لتجنب التلوث بإنزيم آر إن إيز. يجب أن ترتدي دائماً قفازات عند تحضير آر إن إيه لأن الجلد يمثل مصدراً لإنزيم آر إن إيز. يجب أن تعامل المحاليل المائية بمحلول ثنائي إيثيل بيروكربونات التي تعطل آر إن إيز. على الرغم من أن طرق التخلص من ريبونوكليز من الأوعية الزجاجية والبلاستيكية بسيطة نسبياً ، إلا أن الماصات وأنايب الاختبار التي تستخدم مرة واحدة تكون خالية من ريبونوكليز ولا تحتاج إلى معالجة مسبقة.

تستعمل طرق عديدة شائعة لتحضير آر إن إيه من الأنسجة والخلايا المزروعة. اعتماداً على أملاح جوانيديوم ومعدلات البروتين القوية لإيقاف نشاط ريبونوكليز وتحلل الخلايا. الطريقة الأكثر تكراراً المذكورة بواسطة Chirgwin *et al.* (3) وتعديلاتها تنتج عطاءً عالياً من آر إن إيه قليل الجودة من مصادر غنية بالريبونوكليز، إلا أن هذه الطريقة تتطلب معاملات عديدة، وكذلك طرد مركزي فائق السرعة طوال ليلة كاملة جاعلاً إياها أقل استخداماً لمعامل التشخيص الجزيئي. بدلاً من ذلك تفضل الطريقة البسيطة والأكثر سرعة Puissant and Houdebine (9) وفيها يعزل الحمض النووي آر إن إيه الكامل (عالي الكمية منخفض الجودة) خالي من الجزئيات الكبيرة الأخرى باستخدام ثيوسينات جوانيديوم وفينول وكلوروفورم عند درجة بي إتش حامضية.

(١) جهاز مقدماً محلول مركز من ثيوسينات جوانيديوم ٤ مول، ٢٥ مللي مول سترات صوديوم بي إتش = ٧ و ٥٪ ساركوسيل. هذا المحلول ثابت لأكثر من ٣ شهور عند درجة الغرفة. قبل الاستخدام اضع ٢- ميركاتبتوايثانول لتركيز نهائي ١.٥ مول.

(٢) اطحن الأنسجة الحديثة أو المجمدة عند ٤ م في ١٠ مل من المحلول السابق (denatured solution). يمكن أن يحضر آر إن إيه من المزارع وحيدة الطبقة بإضافة المحلول مباشرة إلى الطبق.

(٣) انقل ٥ مل من المواد إلى أنبوبة بولي برويلين التي تستخدم مرة واحدة. أضع التالي مع التقليب بعد كل إضافة: ٠,٥ مل خلاص صوديوم، ٢ ملليمول، بي إتش = ٤، ٥ مل ماء مشبع بالفينول، ١ مل كلوروفورم.

(٤) اطرده مركزياً عند ١٠٠٠٠ إكس جي لمدة ١٠ دقائق. تخلص من الحالة المائية ورسب آر إن إيه بكمية مساوية من أيزوبروبانول ١٠٠٪ عند ٢٠ م. عند درجة بي إتش حامضية يبقى دي إن إيه والبروتينات في الحالة العضوية وعند السطح الفاصل.

(٥) احصل على آر إن إيه بالطرده المركزي عند ٣٠٠٠ إكس جي لمدة ١٠ دقائق.

(٦) قلب بشدة الحبة عقب إضافة ٢ مل كلوريد ليشيوم ٤ مول لإذابة السكريات العديدة الملوثة. آر إن إيه غير الذائب يستخلص ثانية بالطرده المركزي عند ٣٠٠٠ إكس جي لمدة ١٠ دقائق.

(٧) أذب حبة آر إن إيه في ٢ مل تريس ١٠ ملليمول، بي إتش = ٧، ١ ملليمول إديتا، ٠,٥٪ سلفات دوديسيل الصوديوم واستخلص بواسطة ٢ مل كلوروفورم.

(٨) اطرده مركزياً عند ٣٠٠٠ إكس جي لمدة ١٠ دقائق. اجمع الطبقة العليا (المائية) ورسبها مع كمية مساوية من ١٠٠٪ أيزوبروبانول في وجود ٠,٢ مول خلاص الصوديوم، رقم حموضة ٥.

يمكن أن تتم هذه العملية كاملة في أقل من أربع ساعات.

الطرق غير المباشرة Indirect Methods

يمكن أن يتحدد أيضاً نوع الحمض النووي بطريقة غير مباشرة باستخدام مشبطات الأيض النوعية المختلفة التي تتداخل مع تكاثر الفيروس. هذه الطرق تفيد خاصة مع الفيروسات التي لا تتكاثر إلى مستويات عالية كافية لتركيزها وتنقيتها والتصنيف المباشر للأحماض النووية.

استخدام مثيلات الثيميدين thymidine analogs هي أبسط طريقة لتحديد ما إذا كان الفيروس يحتوي على حمض نووي دي إن إيه (10, 11). مشبطات دي إن إيه الأكثر استخداماً هي 5-bromo-2'-deoxyuridine (BDU) و 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) (Calbiochem Corp., San Diego, Calif.). يفضل نظام مزرعة الخلية لتنمية الفيروس بهذه الطريقة. توجد طريقتين أساسيتين: الأولى، يمكن معايرة الفيروس في مزارع خلية تحتوي على وسط مع ٥٠ ميكروجرام/مل من إما IDU أو BDU. قارن المستوى من هذه المعايرة مع معيار متوازي في وسط خالي من مثيلات الثيميدين. يكون الفيروس محتويًا على دي إن إيه إذا كان المستوى ١ لوغاريتم ١٠ أقل مع مثيل ثيميدين. في الطريقة الثانية يمكن تنمية الفيروس في مجموعة من مزارع الخلية مع وسط يحتوي على أحد مثيلات الثيميدين بمعدل ٥٠ ميكروجرام/مل، ومجموعة أخرى بدون. بعد ٢٤ - ٤٨ ساعة يجمع الفيروس ويقاس مستواه ويقيم كما ذكر سابقاً. يجب أن يشمل مجموعات ضابطة بفيروس معروف مسبقاً احتوائه آر إن إيه وفيروس يحتوي على دي إن إيه. عندما يعامل كفيروس مجهول ويجب أن لا يثبط المجموعة الضابطة آر إن إيه بواسطة مثيلات ثيميدين، بينما يجب فيروسات مجموعة دي إن إيه يجب أن تتأثر.

حساسية الفيروس لأكتينومييسين D ذات قيمة في تفريق بعض فيروسات آر إن إيه. يمنع أكتينومييسين D نسخ الحمض النووي آر إن إيه المرسل من الحمض النووي مزدوج الشريط ومن ثم سوف يتداخل مع تخليق البروتين من فيروسات دي إن إيه مزدوجة الشريط وفيروسات آر إن إيه أو مع تخليق بروتين العائل. يحتاج فيروس الإنفلونزا نسخ بعض الحمض النووي آر إن إيه المرسل من العائل كحدث مبكر في دورة التكاثر ويشبط بواسطة أكتينومييسين D. تعتبر أعضاء عائلة فيروس ريو آر إن إيه أيضاً حساسة للأكتينومييسين D لأنها مزدوجة الشريط. يمكن أن تجرى حساسية الفيروس للأكتينومييسين D كالتالي (9):

- (١) حضر وسط مزرعة خلية يحتوي على أكتينومييسين D بمعدل ١ ميكروجرام/مل. تحذير: تأكد أن هذا المستوى من المضاد الحيوي غير سام للخلايا المستخدمة.
- (٢) عالج الخلايا بالأكتينومييسين D لمدة ساعتين قبل تحضينها مع الفيروس. اجمع الفيروس بعد ٢٤ ساعة و ٤٨ ساعة من التحضين وقيم الإراضية. قارن المعيار مع الفيروس الضابط المحصود بعد ٢٤ و ٤٨ ساعة بدون أكتينومييسين D يدل على حساسية الفيروس.

قارن المعيار مع الفيروس الضابط المحصود بعد ٢٤ - ٤٨ ساعة بدون أكتينومييسين D في الوسط. الانخفاض المعنوي في المعيار في الوسط المعالج بأكتينومييسين D يدل على أن الفيروس حساس.

الجدول رقم (٢، ٤٤). مقارنة الطرق المباشرة وغير المباشرة لخصائص الحمض النووي الفيروسي^٨.

آر إن إيه		دي إن إيه		المعالجة
مزدوج الشريط	مفرد الشريط	مزدوج الشريط	مفرد الشريط	
-	-	+	-	DNAse 1
-	-	-	-	Nuclease S1
+	+	-	-	Low NaCl RNA
-	+	-	-	High NaCl RNA
+	+	-	-	NaOH 0.3 mol
-	-	+	-	مثيلات ثيميدين
+	+	+	-	أكتينومييسين

^٨ (+) = الهضم أو التثبيت، (-) = عدم الهضم أو التثبيت.

الحساسية لمذيبات الدهون Sensitivity to Lipid Solvents

ترتبط حساسية الفيروس لمذيبات الدهون مع ما إذا كان يحتوي على غلاف بروتيني دهني أم لا. تستخدم مذيبان للدهون (الإيثير والكلوروفورم) لمعالجة الفيروسات وتحديد تأثيرها على تدمير القدرة الإراضية للفيروس.

الحساسية للإيثير Sensitivity to Ether

أضف إيثيل الإيثير ٢٠٪ بالحجم إلى كمية معينة من الفيروس في أنبوبة بغطاء حلزوني. أغلق الأنبوبة بشرط. جهز فيروساً ضابطاً مع ٢٠٪ بالحجم من كلوريد الصوديوم ٠.٨٥٪. ضع الأنابيب عند ٤ م لمدة ١٨ - ٢٤ ساعة، ورج الأنابيب يدوياً عدة مرات أثناء هذا الوقت. اسكب محتويات كل أنبوبة إلى طبق بتري معقم، واترك الإيثير ليتبخر. قيم كل فيروس. فقد الإراضية في الفيروس المعالج بالإيثير للوغاريتيم ١٠ أو أكثر يدل على أن الفيروس له غلاف (1).

الحساسية للكلوروفورم Sensitivity to Chloroform

أضف ٠.٠٥ مل من الكلوروفورم على ١ مل من الفيروس. الفيروس الضابط يتكون من ١ مل من الفيروس و ٠.٠٥ مل من كلوريد صوديوم ٠.٨٥٪ ويجب تجهيزه في نفس الوقت. رج كلتا الأنبوبتين لعشرة دقائق

واطرد مركزياً ٥ دقائق عند ٣٣ إكس جي. استخدم الطبقة العليا لقياس إمراضية الفيروس. فقد الإمراضية للوغاريتم ١٠ أو أكثر يدل أن الفيروس له غلاف (5).

قطر الفيروس Diameter of the Virion

باستعمال المجهر الإلكتروني النافذ يمكن تقدير حجم الفيروس باستخدام المرشحات الغشائية المتوفرة بمتوسط قطر فتحات ٤٥٠ و ٣٠٠ و ٢٠٠ و ١٠٠ و ٥٠ نانومتراً. تؤثر عدة عوامل على نتيجة ترشيح الفيروس منها التجمع، وتعدد الشكل، وانسداد الفتحات ببقايا الخلايا، والشحنات الكهربائية الساكنة على المرشح. ترشيح عينة الفيروس خلال مرشح أولي و/أو مرشح ٤٥٠ نانومتراً يقلل النتائج الغريبة التي يسببها تجمع بقايا الخلايا ويفضل غمر أو نقع المرشح الأولي في مصف عجل أو تمريرها عليه (٥ مل من مصف عجل ١٠٪ في محلول ملح) لمعادلة الشحنات على الغشاء. الطريقة هي كالتالي:

- (١) نقّ معلق الفيروس بالطرد المركزي لعشر دقائق عند ٢٠٠ إكس جي و/أو مرر المعلق خلال وسادة مرشح أولي للتنقية واحفظ العينة للقياس.
- (٢) مرر العينة خلال مرشح ٢٠٠ نانومتراً متصل بمحقن وتُشترى المرشحات غير معقمة ويجب تعقيمها بالأوتوكلاف واحفظ العينة للتحليل.
- (٣) مرر ٢٠٠ نانومتراً من الراشح خلال مرشح ١٠٠ نانومتراً واحفظ العينة للتحليل ثم مرر الباقي خلال مرشح ٥٠ نانومتراً. الراشح من كل المرشحات يقاس عند ذلك ويقارن المعيار بالمعلق المنقى الأصلي.
- (٤) قد يكون حجم الفيروس حتى ١.٢ مرة لمتوسط قطر الفتحات على المرشح التي من خلالها لا يمر الفيروس.
- (٥) لا اختبار صلاحية المرشح يمكن تمرير مزرعة بكتيريا خلال المرشح مباشرة عقب تجهيز الفيروس واختبار الراشح لتعقيمه.

تماثل الكابسيد النووي Symmetry of the Nucleocapsid

يجب أن يحدد بالمجهر الإلكتروني النافذ وليس ضرورياً تحديد التصنيف الأولي للفيروس. يعطى المجهر الإلكتروني النافذ تقريباً كل المعلومات المطلوبة لتعريف وتصنيف الفيروس وهي: الغلاف البروتيني الدهني، والحجم، والشكل. Doane و Anderson (4) قاما بنشر دليل ممتاز وأطلس للمجهر الإلكتروني للفيروسات. الطريقة الأساسية تشمل تركيز الفيروس بالطرد المركزي فائق السرعة وإعادة تعليق الفيروس في ماء مقطر منخفض الملح أو خالٍ منه. عند ذلك توضع قطرة من الفيروس على شبكة مغطاة بالبلاستيك وتخلط مع نقطة من ٢٪ حمض فوسفوتنجستيك في ماء مقطر (اضبط رقم الحموضة عند ٦.٥ بواسطة هيدروكسيد بوتاسيوم ١ عياري). تركيزات

الفيروس ١٠/مل أو أكثر يجب أن توجد لكشف الفيروس بهذه الطريقة. يوضح الجدول رقم (٤٤,٣) الصفات التي يمكن أن تستخدم للتفريق بين عائلات الفيروسات الأكثر أهمية لعوائل الدواجن. بعد وضع الفيروس في عائلة يجب أن يصنف أكثر بوسائل أخرى. التعرف المصلي يكون أكثر تخصصاً ويكون لتقنيات تعادل الفيروس، والترسيب في الهلام، وتثبيط التلازن، وتثبيت المتمم، والإليزا أهمية قصوى للتعرف على الفيروسات النوعية. نوقشت هذه التقنيات في أماكن عدة في هذا الكتاب.

الجدول رقم (٤٤,٣). الخصائص المفرقة لعائلات فيروسات دي إن إيه وآر إن إيه التي تمثل أهمية في أمراض الطيور.

I حساس لمثيلات ثيميدين	فيروس دي إن إيه
أ- حساس للإثير	
١- يمر من مرشح ٢٠٠ نانومتر	عائلة فيروسات هيريس
٢- يحتجز بمرشح ٢٠٠ نانومتر	عائلة فيروسات الجدري ^A
ب- مقاوم للإثير	
١- يحتجز بمرشح ٥٠ نانومتر	عائلة فيروسات أدينو
٢- يمر من مرشح ٥٠ نانومتر	عائلة فيروسات بارفو
	عائلة فيروسات بابوفا
٣- يحتجز بمرشح ٢٠٠ نانومتر	عائلة فيروسات جدري ^A
II مقاوم لمثيلات ثيميدين	فيروسات آر إن إيه
أ- حساس للإثير	
١- إيجابي لتلازن الدم	
أ. حساس لأكتينومييسين D	عائلة فيروسات أورثوميكسو
ب. مقاوم لأكتينومييسين D	عائلة فيروسات باراميكسو
٢- سلبي لتلازن الدم	
أ. حساس لأكتينومييسين D	عائلة للفيروسات الارتدادية
ب. مقاوم لأكتينومييسين D	عائلة للفيروسات الناجية
	عائلة فيروسات فلافي ^B
ب- مقاوم للإثير	
١- حساس لأكتينومييسين D	عائلة فيروسات ريوي ^C
	عائلة فيروسات بيآر إن إيه ^C
٢- مقاوم لأكتينومييسين D	عائلة فيروسات بيكوآر إن إيه ^B

^A قد تدمر فيروسات الجدري أو لا بالإثير و/أو الكلوروفورم.

^B يمر من مرشح ٥٠ نانومتراً.

^C ينخفض المعيار بشدة بمرشح ٥٠ نانومتراً.

المراجع References

1. Andrews, C., and D. Horstmann. The susceptibility of viruses to ethyl ether. *J. Gen. Microbiol.* 3:290-296. 1949.
2. Berger, S. L., and A. R. Kimmel. *Methods in enzymology*. Vol. 152. Guide to molecular cloning techniques. Academic Press, New York. 1987.
3. Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, R. J. MacDonald, and W. J. Rutter. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299. 1979.
4. Doane, F. W., and N. Anderson. *Electron microscopy in diagnostic virology*. Cambridge University Press, New York. 1987.
5. Feldman, H., and S. Wang. Sensitivity of various viruses to chloroform. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 106:736-738. 1961.
6. Fields, B. N., and D. M. Knipe, eds. *Fields virology*, 2nd ed. Raven Press, New York. pp. 9-14. 1990.
7. Grimberg, J., S. Nawoschik, L. Belluscio, R. McKee, A. Turck, and A. Eisenberg. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* 17:8390. 1989.
8. Murphy, F. A., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers, eds. *Virus taxonomy*, sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag Wien, New York. 1995.
9. Puissant, C., and L. M. Houdebine. An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *BioTechniques* 8:148-149. 1990.
10. Rovozzo, G. C., and C. N. Burke. *A manual of basic virological techniques*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. 1973.
11. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. *Molecular cloning-a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
12. Wiedbrauk, D. L., and D. H. Farkas. *Molecular methods for virus detection*. Academic Press, San Diego, Calif. pp. 41-43, 1995.