أنظمة كشف مولد الضد (الأنتيجين)
ANTIGEN DETECTION SYSTEMS

ساندرا س. كلاود
Sandra S. Cloud

الملخص Summary

يمكن أن العوامل المعدية أو أجزائها المكونة (أنتيجينات أو أحماض نووية) تكتشف في الأنسجة الطازجة أو المجمدة أو المثبتة باستعمال مختلف الاختبارات المباشرة وغير المباشرة. يمكن أن تتحور الاختبارات لتعطي حساسية ونوعية أكبر، لكن في معظم الحالات يتم اختيار الطرق الخاصة اعتماداً على طبيعة العينة والأدوات المتاحة ونوعية الكواشف والوقت والتكلفة والخبرة التقنية. يمكن مشاهدة الفيروسات أو البكتيريا مباشرة باستخدام المجهر الإلكتروني. على الرغم أن هذه الطريقة يمكن أن تجرى بسرعة لكنها غير حساسة وتتطلب أدوات متخصصة ودعماً تقنياً. بعض الاختبارات مثل تفاعلات التلازن أو الانتشار المناعي بسيطة وغير مكلفة لكنها يمكن أن تستخدم فقط للتعرف على العامل المسبب الذي يمتلك أنتيجينات ملزنة أو ذائبة على التوالي. تعطي التقنيات الأكثر تكلفة مثل الإليزا المرتبطة للأنتيجين أو الصباغة النسيجية المناعية الكيميائية أو التهجين الموضعي حساسية ونوعية أكثر، لكن قد تحتاج لنوعية كواشف أفضل وخطوات إضافية قبل الاختبار ومستوى أعلى من التدريب التقني. من المهم لتحديد أنظمة كشف الأنتيجين للأغراض التشخيصية والبحثية أن تتلاءم شروط الاختبارات مع فهم التأثير المرضي للعامل المسبب المشتبه في اختيار التوقيت ونوع عينات النسيج التي تستخدم للاختبار.

المقدمة Introduction

تم تطوير أنظمة كشف أنتيجين مختلفة طوال العشر سنوات الأخيرة. وأفضل هذه الأنظمة يجب أن يكون حساساً ونوعياً. تقاس الحساسية بالقدرة على كشف كميات صغيرة جداً من الأنتيجين. تقلل زيادة الحساسية لنظام الاختبار من عدد العينات السالبة الخطأ. تقاس النوعية بالمقدرة على كشف أنتيجين معين أثناء تحديد تفاعلات غير نوعية أو تفاعلات متصالبة مع الأنتيجينات قريبة الصلة. تقلل زيادة نوعية الاختبار من عدد العينات الموجبة الخطأ،

إلا أن العديد من أنظمة كشف الأنتيجين تنتقى بناءً على الأسباب التقنية مثل الكواشف أو إتاحة الأدوات، وطول فترة الاختبار، والتكلفة لكل اختبار، والميكنة، واحتياجات البيئة والأمان، والصعوبة التقنية، وهكذا. يناقش هذا الفصل عدة تقنيات شائعة تستخدم لكشف الأنتيجين للممرضات المختلفة التي تصيب الطيور. بنظرة عامة على كل بروتوكول يتضح مع بعض المراجع الحالية إعطاء خيارات تقنية مختلفة والتي قد تكون مفيدة في تطوير نظام الاختبار المناسب لكل معمل على حدة.

ا هر الإلكتروني النافذ Transmission Electron Microscopy (TEM)

يمكن مشاهدة عوامل معدية متعددة مباشرة بواسطة المجهر الإلكتروني النافذ عقب التنقية والطرد المركزي عالي السرعة لعينات الأنسجة المشتبهة (10 ,24). إن تطور الطرد المركزي فائق السرعة للعينات مباشرة إلى شبكات المجهر النافذ قد حسنت جداً من طرق الكشف الأنتيجيني (14). استعملت تقنيات الصباغة السلبية باستخدام حمض الفوسفوتنجستيك الضوئي وخلات اليورانيل لزيادة الوضوح، لكن في بعض الأحيان قد تفقد الفيروسات أو البكتيريا البروزات المميزة وقد تكون متباعدة جداً على الشبكة أو بين البقايا لعمل التعرف الإيجابي. هذه التقنية غير حساسة نسبياً مع مستوى الكشف الأدنى الحرج لجزيئات الفيروس ١٠$^{-٦}$ – ١٠$^{-٧}$ لكل ملليتر تقريباً.

ا هر الإلكتروني المناعي Immune Electron Microscopy

يمكن زيادة حساسية المجهر الإلكتروني النافذ بإضافة مضادات أمصال أحادية أو عديدة النسيلة عالية النوعية عقب التنقية لكن قبل الطرد المركزي. اصطلحت هذه الطريقة بالمجهر الإلكتروني النافذ المناعي immune TEM أو المجهر الإلكتروني المناعي IEM (30). يتطلب مركب الأنتيجين—الجسم المضاد المكون فقط للطرد المركزي منخفض السرعة لوضع الشبكات. بديلاً عن ذلك، قد يدمج الجسم المضاد مباشرة إلى سحبات مغلفة للشبكات مكوناً السطح لاجتذاب الأنتيجين (10). حديثاً جداً، تم تطوير اختبار المجهر الإلكتروني المناعي غير المباشر باستخدام الذهب مع بروتين A، وثبت أنه طريقة حساسة سريعة لكشف الفيروسات التاجية خاصةً المعوية منها (9). تركز العينات بالطرد المركزي عالي السرعة مباشرة على شبكات النيكل. عقب طرق الغسيل المختلفة، تحضن الشبكات المغلفة بالفيروس على قطرة من المصل فائق المناعة. عقب خطوات الغسيل الإضافية تحضن الشبكات مع قطرة من مركب بروتين A المختلط مع الذهب وتغسل وتصبغ مع ٢٪ فوسفوتنجستات الصوديوم. يظهر المركب السابق خلفيات غير نوعية قليلة تعمل كمعلم كثيف الإلكترون وتجعل كشف الأنتيجين أسهل وتعطي زيادة من ١٠ — ٥٠ مرة في الحساسية عن المجهر النافذ (9).

العيب في أي نظام يستخدم المجهر النافذ هو توفر المجهر وأعضاء الدعم، إلا أنه إذا اشتبه في العامل المعدي الذي قد يكون غير قابل للزرع في أنظمة العزل التقليدية، فإن المجهر النافذ أو المجهر المناعي يقدم طريقة جيدة للفحص (10).

اختبار تلازن الدم Haemagglutination test (HA)

الأنتيجينات الملزنة للدم هي بروتينات نشوية glycoproteins تتكون على سطح العديد من العوامل المسببة للمرض. يمكن أن تكتشف هذه الأنتيجينات بسهولة بإضافة خلايا دم حمراء من الأنواع التي تحمل مستقبلات متممة (10)، إلا أن بعض العوامل المعدية مثل فيروس الالتهاب الشعبي المعدي قد يتطلب معاملة مسبقة بإنزيمات ليكشف ملزنات الدم السطحية (انظر الفصل الثاني والثلاثون).

إذا حقنت مواد من مسحات القصبة الهوائية في أجنة خالية من الممرضات النوعية، يمكن اكتشاف العامل الملزن للدم بسرعة بخلط حوالى ٠.٠٥ مل من ١٠٪ كرات دم حمراء مغسولة مع ٠.٥ مل من السوائل السقائية المجموعة على شريحة زجاجية (اختبار بقعة تلازن الدم spot test). في حالة حدوث تلازن، يمكن أن يظهر وقد يتم التعرف على العامل الملزن بواسطة اختبار منع تلازن الدم (HI) الموضح بالفصل السادس والأربعون. لأن بعض البكتيريا قد تلزن خلايا الدم الحمراء، يجب فحص التلوث البكتيري بزراعة العينة على بيئة ميكروبية أو بتكرار تفاعل التلازن على السوائل عقب الترشيح خلال مرشح محقن ٠.٢ ميكروملي قبل إجراء اختبارات التلازن ومنع التلازن الدموي.

الانتشار المناعي Immunodiffusion

يمكن أن تكتشف الأنتيجينات الفيروسية الذائبة الموجودة في النسيج المطحون وسوائل البيض وسوائل مزرعة النسيج وهكذا باستخدام الانتشار المناعي في اختبار الانتشار المناعي في هلام الآجار (AGID). تم وصف هذا الاختبار سابقاً.

اختبار الانتشار المناعي في الآجار هو اختبار بسيط جداً وغير مكلف. على سبيل المثال فيروس مرض البيرسا المعدي (جمبورو) أو البيرسا المصابة أو الأغشية الكوريوالانتويس من الأجنة المصابة بفيروس ريو يمكن أن تحضر كمتجانس ٥٠٪ (وزن/حجم) في محلول ملح منظم الفوسفات باستخدام طاحن النسيج أو الهون. بعد ثلاث دورات من التجميد والإذابة، يطرد الخليط المتجانس مركزياً على سرعة منخفضة ويستخدم الرائق كأنتيجين للاختبار (الانتشار المناعي). يمكن أن تستخدم السوائل الرائقة من مزارع الخلية المصابة أيضاً في نظام كشف الأنتيجين، إلا أن بعض الأنتيجينات قد لا تكون ذائبة ولا تنتشر خلال الآجار أو يكون تركيز الأنتيجين تحت حد الكشف في الاختبار. قد يسمح المعاملة بالمنظفات أو تركيز الأنتيجين على التوالي باستعمال اختبار الانتشار المناعي،

لكن طرق كشف الأنتيجين الأخرى قد تكون أكثر ملائمةً في هذه الحالات. إذا أمكن اكتشاف الأنتيجين باستعمال نظام اختبار الانتشار المناعي، يمكن أيضاً قياسه باستخدام اختبار مانشيني للانتشار المناعي القطري أو الفصل الكهربي المناعي Mancini radial immunodiffusion test or rocket immunoelectrophoresis (4).

الإليزا جاذبة الأنتيجين

Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (AC-ELISA)

يمكن اكتشاف الأنتيجين في تحضيرات النسيج باستخدام تقنية أقلمة الإليزا المشروحة في الفصل السادس والأربعون. هذه الأقلمة اصطلحت على أنها إليزا جاذبة الأنتيجين (AC-ELISA)، وتم استخدامها لاكتشاف ميكوبلازما الطيور وفيروس جمبورو والفيروسات المعوية وفيروس الالتهاب الشعبي المعدي وفيروس التهاب المخ الطيري (2, 15, 16, 26, 31, 33, 35). هذه التقنية بسيطة نسبياً واختبار سريع يعطى بديلاً للمعامل حيث لا تتاح عينات النسيج للصباغة النسيجية المناعية. يستطيع الاختبار قياس الأنتيجينات الحية المعدية وغير المعدية أو الأنتيجينات الميتة (15) وهي أكثر حساسية من اختبار الانتشار المناعي (31)، لكن أقل حساسية من الطرق التقليدية مثل عزل الفيروس في أجنة البيض إذا لم يجرى بعض التغذية الأولية للأنتيجين (2, 26).

الجسم المضاد الأولي الجاذب Primary Capture Antibody

تضم الطريقة الأساسية ربط الجسم المضاد الجاذب لأطباق إليزا خاصة التصميم خلال سلسلة من الخطوات. تغطى الأطباق ببروتين A من المكور العنقودي الذهبي (33) أو مركب أفيدين–بيوتين (15) قبل إضافة الجسم المضاد الجاذب وثبت أنها تزيد المقدرة على اجتذاب الأنتيجين. قد يكون الجسم المضاد الجاذب عديداً أو أحادي النسيلة اعتماداً على الغرض من نظام الاختبار. مضادات المصل عديدة النسائل عالية الجودة أكثر حساسية في مسح العينات للأنتيجين (16)، بينما الجسم المضاد وحيد النسيلة يكون أكثر فائدة في التعرف على وجود أنتيجين مصلي معين (26)، إلا أن مضاد المصل متعدد النسيلة النوعي جداً يمكن أن يحضر بالادمصاص مع تركيزات مختلفة مع الأنتيجينات المغايرة ذات الصلة (2).

الربط الأنتيجيني Antigen Binding

عقب خطوات الغسيل المختلفة، الأنسجة المطحونة حديثة التجميع أو العينات السابق حقنها في وسط مزرعة مناسب للتغذية (2, 26) تضاف إلى حفر الاختبار وتحضن مع الجسم المضاد الجاذب المرتبط مع سطح الطبق. إذا أدرك الأنتيجين بواسطة الجسم المضاد فسوف يجتذب على الطبق، والأنتيجين غير المجتذب سوف يغسل بعيداً، وقد يتطلب

خطوات إضافية في تحضير الأنتيجين لأن بعض الأنتيجينات قد تحتاج للتعرض بواسطة الإنزيم أو المعاملة بالمنظف أو يزرع سابقاً قبل المسح (26). الزراعة السابقة قد تدخل أخطاء جديدة للنظام. على سبيل المثال تميل الميكوبلازما للاتحاد مع جلوبيولينات جاما من بيئة الزرع على سطحها والتي قد تعطي تفاعلات إيجابية كاذبة (2).

الجسم المضاد الكاشف Detector Antibody

بعد خطوات الغسيل الإضافية يضاف الجسم المضاد الثانوي أو الكاشف. قد يلصق الجسم المضاد الكاشف مباشرة مع إنزيم مثل هورسرادش بيرأوكسيداز (38) أو بيوتين (33)، لكنه يترك عادة غير ملصق في معظم الطرق. عقب التحضين مع الجسم المضاد الكاشف غير الملصق، يضاف الجسم المضاد المقترن بالإنزيم. بمجرد إضافة المواد المناسبة إلى الاختبار، يكتشف الأنتيجين المجتذب بواسطة تغير اللون ويسجل على هيئة كثافة ضوئية أو قيم امتصاص مقارنة بالضوابط. يمكن اكتشاف الأنواع الأنتيجينية المتخصصة باستعمال الجسم المضاد أحادي النسيلة في الإليزا جاذبة الأنتيجين (33, 26) أو الإليزا قد تتغير إلى اختبار تنافس أو تثبيط (35).

الحساسية والنوعية Sensitivity and Specificity

تعتمد حساسية ونوعية هذا النظام الكاشف للأنتيجين مباشرة على اختيار الكواشف والطرق. يجب أخذ الحرص في اختيار أطباق أفضل ومحاليل التغليف ومحاليل التعطيل وفترات التحضين والحرارة والأجسام المضادة. تعرف عادة أفضل الطرق بالمحاولة والخطأ باستعمال عينات ضابطة إيجابية أو سلبية لأنتيجين معين. على النقيض لأنظمة اختبار الصباغة الخلوية الكيميائية المناعية، الكواشف والتفاعلات الضرورية لإجراء الإليزا جاذبة الأنتيجين يجب أن يكون لها تأثيرات مزيلة أقل على مواقع الأنتيجين الحرجة والتي قد تسمح باكتشاف أفضل أو زيادة الحساسية.

الصباغة النسيجية الكيميائية المناعية Immunohistochemical Staining (IHS)

الأنتيجين في معلق الخلايا الطازجة أو المجمد أو المثبت أو النسيج الكامل يمكن اكتشافه باستخدام أجسام مضادة نوعية متحدة مع صبغات أو إنزيمات. تعرف هذه العملية بالصبغ النسيجي المناعي. استخدام هذا النظام لرؤية الأنتيجين في الخلايا أو النسيج المصاب بفيروس التهاب الحنجرة والقصبة الوبائي، والالتهاب الشعبي المعدي، وفيروس مرض جمبورو، وفيروس أدينو، وفيروس الإنفلونزا، وفيروس الالتهاب المعوي في البط، وفيروس مرض نيوكاسيل، وفيروس التهاب المخ الطيري، وفيروس أنيميا الدجاج (37, 34, 32, 26, 20, 18, 17, 11, 8, 7, 5, 1). قد يكون فهم وتشخيص عملية العدوى بالتقييم النسيجي العادي محدوداً بعدد قليل من الخلايا أو الأنسجة لتقييم وجود النخر الشديد. بالإضافة إلى ذلك عند توافر البيانات المصلية قد تكون النتائج صعبة للحكم في حالة فشل

النظام المناعي. تسمح تقنية الصبغ المناعي بالوصف المورفولوجي للعامل المعدي وإيجاد الارتباط مع التغيرات الخلوية المرضية أو تطور الآفات إذا جمعت عينات النسيج في الوقت المناسب أثناء العدوى. لهذا السبب يستخدم هذا النظام في دراسات كيفية حدوث المرض. مع الضوابط المناسبة، تستخدم النتائج الإيجابية في تشخيص أمراض الطيور النوعية، إلا أن النتائج السالبة يجب أن تقيم بحرص (6). يجب أن يكون اختبار الصبغ المناعي النسيجي الجيد بسيطاً تقنياً لتقليل الأخطاء وغير مكلف ويسمح بتكبير كافي للعلامة لرؤية سهلة. الأكثر أهمية، يجب أن يكون النظام قادراً على كشف الأنتيجين الذي قد تغير تركيبياً بالتثبيت مناعياً.

تثبيت الخلية أو النسيج Cell or Tissue Fixation

يمكن أن تستخدم الخلايا غير المثبتة أو مزارع النسيج للصبغ المناعي (5)، لكن هذا يتطلب أن تفحص التحضيرات سريعاً. تثبت الخلايا أو عينات النسيج الكامل عادة بطريقة واحدة من عدة طرق لعمل هذا الاختبار. على سبيل المثال السطح حديث القطع من الغدة التوتية أو عينة نخاع العظم أو كحتات الغشاء المخاطي للقصبة قد تضغط على شريحة زجاجية بسلاح المشرط وتزال. تجفف الطبقة الرقيقة من الخلايا المطبوعة على الشريحة بالهواء وتثبت بالأسيتون لعشر دقائق (22, 1). تحفظ هذه الشرائح عند −٢٠ °م حتى تصبغ. الخلايا المصابة المزروعة على مزرعة نسيج قد توضع على شرائح وتثبت بطريقة مماثلة (38). قد تصمم شرائح المجهر خصيصاً مع غطاء من التيفلون Teflon لتسمح بعدد من العينات على شريحة واحدة. غطاء التيفلون المحيط بالمنطقة الملاصقة للخلية يسمح باحتجاز الجسم المضاد الأولي في مساحة صغيرة. حجم هذه المنطقة يمكن أن يضبط للمحافظة على الكواشف المستعملة للاختبار المباشر أو غير المباشر.

يمكن أن تستخدم قطاعات النسيج المجمدة بالتجميد السريع للنسيج في أيزوبنتان isopentane سابق التبريد مع النيتروجين السائل وبعد ذلك تقطع بالكريوستات، إلا أنه في معظم الحالات تثبت الأنسجة عند درجة حرارة الغرفة في فورمالين متعادل ١٠٪ للفحص النسيجي الروتيني. في حالة عمل الصبغ المناعي، لا يجب حفظ الأنسجة في مثبتات الفورمالين لأكثر من ٢٤ — ٤٨ ساعة قبل الإعداد بسبب إمكانية تدهور الأنتيجينية لدرجات متفاوتة (19, 13). يربط الفورمالين تصالبياً عديد الببتيدات بتكوين جسور ميثيللين التي يمكن أن تخفى أو تغير الأنتيجينات. بعض الأنتيجينات قد لا تخفى بمعاملة قطاعات النسيج بالإنزيمات محللة البروتين قبل الصبغ المناعي. نشر أن فيروس أنيميا الدجاج يصعب كشفه بعد التثبيت بالفورمالين إذا كانت فترات التثبيت طويلة جداً (أكثر من ست ساعات) أو إذا أُستخدمت العوامل المحللة التي تحتوي على ١٠٪ حمض فورميك و ١٠٪ فورمالين، ويحدث صبغاً مناعياً قليلاً جداً بغض النظر إلى المعاملة بمحللات البروتين (32). المثبتات الأخرى المحتوية على مكونات مختلفة من الكحول الميثيلي وفورمالدهيد وحمض الخليك أو الزنك الذي يفترض تثبيطه للارتباط التصالبي المسبب بالفورمالدهايد قد

استخدمت. Fitzgerald و Richard (12) أخبرا عن الاستعمال الفعال جداً للمثبتات غير الفورمالينية المتاحة تجارياً لكشف أنتيجينات الفيروس داخل الأنوية لفيروس أدينو الطيور مجموعة II باستعمال تقنية الصبغ المناعي. هذا الناتج لايحفز الارتباط التصالبي، ولكن يحفظ مواقع الأنتيجين ولا يحتاج النسيج معاملة بمحللات البروتين. لأن العديد من المثبتات أو أن طول فترة التثبيت يمكن أن تسبب نتائج مختلفة لأنتيجين معين، يجب أن تكون الطرق قياسية لكل مركب حتى نصل إلى نظم كشفية مرضية وعالية الدقة.

عقب التثبيت، تغمر الأنسجة في البارفين وتقطع إلى قطاعات لتجنب دمار إضافي للنسيج ويجب ألا تتعدى حرارة التخلل البارافيني ٦٠°م (13, 19). يجب وضع قطاعات النسيج على شرائح مغطاة بمواد لاصقة مثل بولي-L-ليسين أو بولي-D-ليسين أو ٣-أمينو بروبيل ترايسوكسي سيلان. عقب إزالة البارافين القياسية، يعاد الماء للشرائح ويعد للصبغة.

المعاملات المسبقة للنسيج Tissue Pretreatments

لأن العديد من أنظمة الصبغ المناعي تستخدم طريقة صباغة بيروكسيداز، يجب أن يوقف نشاط بيروكسيداز الداخلي داخل نسيج معين بالغمر في تركيزات منخفضة لفوق أكسيد الهيدروجين. تثبيط الإنزيمات النسيجية الداخلية يجب أن تجرى قبل الهضم بمحللات البروتين لتقليل تأثير فوق أكسيد الهيدروجين على أنتيجينات النسيج (13).

قد يتطلب الهضم الإنزيمي تحفيز الجسم المضاد في عملية الصبغ المناعي ولتقليل الارتباطات التصالبية بين مواقع البروتين، ومن ثم زيادة إدراك الأنتيجين بالأجسام المضادة الأولية (19, 13, 4). يجب لكل أنتيجين أن يحدد الهضم الإنزيمي بالتربسين وبروتياز وهكذا باستعمال تركيزات مختلفة وفترات زمنية على قطاعات تسلسلية لنسيج معلوم سالب وموجب. على سبيل المثال استعمال بروتياز XIV لمدة ٧ — ١٠ دقائق يعطي نتائج أفضل من المعاملة بالتربسين في الأنسجة المحتوية على فيروس أنيميا الدجاج (32). لا تتطلب غالبية الأجسام المضادة للبكتيريا والفطريات والطفيليات الأولية هذه المعاملة (6).

قبيل التحضين مع الجسم المضاد الأولي يجب معاملة الشرائح بـ ٢٪ - ٥٪ مصل عادي من أنواع غير ذات صلة أو، إذا استخدم الصبغ غير المباشر من أنواع يجهز فيها الجسم المضاد الثانوي، يمكن أن تحدث إيجابيات زائفة نتيجة للتفاعلات التصالبية للجسم المضاد الثانوي خاصة للخلايا الالتهابية التي بها مستقبلات قطع المتمم Fc على سطحها (13).

الصبغ المباشر Direct Staining

يتطلب هذا النظام أن يعرف الجسم المضاد النوعي للأنتيجين الأولي مع صبغة الفلورسين أو إنزيم ويحضن مع عينة النسيج. الفلوروسين هو صبغة تستطيع أن تستحوذ بسرعة بعد تعرض قصير للأشعة فوق البنفسجية، إلا أنها تستخدم بنجاح لعدة سنوات على الأنسجة الحديثة أو المجمدة (5 ,23). تساعد الأجسام المضادة المعرفة بالإنزيم في خلق تقنيات صباغة توضح الأنتيجينات في عينات النسيج المشتبه الظاهرة بالمجهر الضوئي. يكون منتج تفاعل الإنزيم-المادة مستديمة ويمكن أن تستخدم على الأنسجة المثبتة.

يجب أن يكون الجسم المضاد الأولي جسماً مضاداً عديد النسيلة أو أحادي النسيلة وعالي النوعية لتقليل الارتباط غير النوعي ويجب استخدام أعلى تخفيف ممكن الذي يعطي صباغة نوعية. يجب أن يعد الجسم المضاد الأولي عديد الصفة في أنواع ليس لها صلة بنوع نسيج العائل قيد الفحص، ومن ثم متجنباً الصباغة كنتيجة للأجسام المضادة المتفاعلة تصالبياً وغير النوعية (13). في هذا الخصوص، يتضح أن الأجسام المضادة أحادية النسيلة هي أفضل اختيار، لكن في الأنسجة المثبتة بالفورمالين قد يتدمر الموقع الخاص للكشف أثناء الإعداد (13 ,19). قد يتحد الجسم المضاد عديد النسيلة بأنتيجين متغير. يستطيع خليط الأجسام المضادة أحادية النسيلة المتعددة أن يدرك المواقع المختلفة لأنتيجين معين وقد يكون متفاعل أفضل (13).

يجب أن يلاحظ الأنتيجين المرتبط مع الجسم المضاد المعرف بالفلورسين بالمجهر باستخدام مصدر ضوء أشعة فوق بنفسجية. يجب أن تحضن العينات مع الجسم المضاد المعرف بالإنزيم مع مواد مناسبة لتحدث ترسيباً للتفاعل الملون غير الذائب عند موضع ارتباط الجسم المضاد مع الأنتيجين للرؤية بالمجهر الضوئي. تعتبر الصباغة النسيجية الكيميائية المناعية المباشرة سهلة واقتصادية لكن تحتاج إلى جسم مضاد أولي مقترن بصبغة الفلورسين أو أنزيم. عملية التعريف المطلوبة لربط صبغة الفلورسين نفسها قد تغير قدرة الاتحاد لجزيء الجسم المضاد الأولي (13). بالإضافة إلى ذلك فإن استخدام الصبغ المباشر يقدم تكبيراً قليلاً للأنتيجينات التي قد تتكون بمستويات قليلة جداً (6 ,10).

الصبغ غير المباشر Indirect Staining

يستخدم أكثر من الصبغ المباشر. يحضن الجسم المضاد الأولي الخاص بالأنتيجين غير معروف مع عينة النسيج وبعد عدة خطوات غسيل يضاف الجسم المضاد الثانوي المعرف بالفلورسين أو الأنزيم أو البيوتين. يتوفر الجسم المضاد الثانوي تجارياً كجسم مضاد للجلوبيولين المناعي G (IgG) للحيوان المستخدم لتحضير الجسم المضاد الأولى (6 ,13). المعامل التي تجهز لنفسها مضادات الأجسام الثانوية يمكن أن تختبرها على نوع مناسب من قطاعات أنسجة لمفية. خلايا البلازما وخلايا المجموعة B يمكن استخدامها بنجاح. في هذه الطريقة تحدث المشاهدة بعد استقبال الجسم المضاد الثانوي المعرف بالفلورسين أو الإنزيم، ويشاهد التألق مباشرة بمجهر الأشعة فوق البنفسجية لكن

للأجسام المضادة المعرفة بالإنزيم، والتحضين مع المادة الملونة يكون ضرورياً قبل المشاهدة. هذه الطريقة معقدة أكثر من الطريقة المباشرة، لكن الطريقة المباشرة لا تتطلب اقتران الجسم المضاد الأولي والفلورسين أو الأنزيم المتاح تجارياً المقترن مع الجسم المضاد الثانوي قد يستخدم مع العديد من الأجسام المضادة الأولية. الأكثر أهمية، لأن العديد من جزيئات الجسم المضاد الثانوي قد تتحد مع الجسم المضاد الأولي المفرد، فحساسية هذا الاختبار تزداد بتقوية علامة الكشف (13, 4).

يمكن زيادة حساسية الصبغ المناعي باستخدام مركب أفيدين-بيوتين-بيرأوكسيداز أو مركب ستربت أفيدين-بيوتين-بيروأكسيداز بواسطة استنفاذ القدرة عالية الارتباط للبيوتين مع الأفيدين وجليكوبروتين زلال البيض. أيضاً يرتبط ستربت أفيدين مع بيوتين، لكن ينتج بواسطة البكتيريا وقد يكون أكثر ملائمة لكشف العوامل المسببة للمرض في الطيور. في هذا النظام يحضن الجسم المضاد الأولي غير المعروف مع عينة النسيج. بعد الغسيل يحضن الجسم المضاد الثانوي المعرف بالبيوتين الموجه للجلوبيولين المناعي IgG للحيوان المستخدم لتحضير الجسم المضاد الأولي على عينة النسيج. بعد الغسيل يضاف مركب أفيدين أوستربت أفيدين المعرف بإنزيم بيروأكسيداز وتضاف المواد المتفاعلة عقب الغسلة الثالثة. يتضح أن هذا النظام أكثر استهلاكاً للوقت والتكلفة لكنه يقدم تكبيراً أكبر للأنتيجينات الضئيلة. المركب السابق بالاتحاد مع الجسم المضاد أحادي النسيلة اتضح أنه يعطي نتائج أفضل لكشف بعض الأنتيجينات (34, 28, 25, 8)، إلا أن البيوتين الداخلي الموجود في الكبد أو الكلى (6) يجعله صعباً للاستخدام في كشف الأنتيجين في بعض الأنسجة.

الحساسية والنوعية Sensitivity and Specificity

قد تختلف تبعاً للطرق والكواشف وهكذا. يُفضل الرجوع إلى نصوص عديدة وأبحاث مرجعية على الصبغ المناعي (13, 6, 4) قبل محاولة هذا الاختبار ذات فائدة.

التهجين الموضعي الكيميائي النسيجي
In Situ Hybridization Histochemistry (ISHH)

هي طريقة تحديد موقع تتابع حمض نووي فريد في قطاع نسيج مثبت بالفورمالين أو في عينة تم نقلها إلى غشاء النيتروسيلليلوز (تهجين الشف النقطي dot-blot hybridization). يضم هذا النظام للكشف الأنتيجيني طرق الصبغ المناعي النسيجي وبعض الأساسيات البيولوجية الجزيئية. وللمزيد عن طرق الكشف الجزيئية انظر الفصل السابع والأربعون.

يمكن من خلال خطوات فيزيائية وكيميائية مختلفة فصل الحمض النووي دي إن إيه مزدوج الشريط إلى شرائط منفصلة يمكن أن تعيد الارتباط ببعضها وترتبط تنافسياً إلى شريط متمم مشابه أو قريب (المسبار probe) معلم

بنظائر مشعة أو إنزيم أو بروتين. وهو نظام كشف عالي الحساسية يستعمل في بعض معامل التشخيص والبحوث للتعرف على الفيروسات (36, 29, 27, 3, 1). يسهل توافر المسابير المعلمة بالنظائر غير المشعة وأطقم التهجين التجارية استخدام التهجين الموضعي الكيميائي النسيجي. بالمقارنة بتقنية الكيمياء المناعية النسيجية يمكن أن يسهل هذا النظام اكتشاف الأنماط الكامنة المعدية والأنتيجينية باستعمال مسابير عالية التخصص، لكن الخبرة المطلوبة والتكاليف قد لا توجد في معامل عدة.

تحضير النسيج Tissue Preparation

تجهز قطاعات البارفين أو قطاعات متجمدة أو مسحات نسيج بنفس الطريقة في الصبغ المناعي النسيجي. يكون التثبيت حرجاً لحفظ الشكل الخلوي لأفضل مسبار محدد للموقع والتعرف على الخلايا المعلمة (3). يساعد التثبيت المفاجئ أو التجميد السريع في إبقاء الأحماض النووية. مثبتات ألدهايد مثل الفورمالين ترتبط تصالبياً للحمض النووي دي إن إيه مع بروتينات هستون histone التي تمنع التهجين بطريقة مرتبطة بالزمن. قد تبقي المثبتات المعتمدة على بارافورمالدهيد أكثر التركيبات الشكلية النسيجية (21). تفضل الشرائح المعاملة بمركب ٣-أمينوبروبيك تراي إيثوكسي سيلان لقطاعات النسيج المستخدمة مع التهجين الموضعي لأن درجات الحرارة العالية ومعاملات الإنزيم عادة تفصل النسيج من الشرائح غير المعالجة (3 ,21). لا يجب أن يستخدم الجيلاتين في الحمام المائي أثناء التقطيع والإزالة الكاملة لشمع البارافين تكون حرجة لتفادي التفاعلات غير النوعية (21). كما وصف سابقاً يجب أن تستحوذ أنشطة الإنزيم الداخلي ويعالج النسيج بمركبات (الإنزيمات المحللة للبروتين وهكذا) لزيارة نفاذية الخلية. يساهم أيضاً الهضم الإنزيمي في فصل البروتينات المتحدة للأحماض النووية دي إن إيه أو آر إن إيه لتسمح بحصول المسبار على الارتباط والاتحاد. يجب أن تجرى كل عمليات الهضم الإنزيمي بالإنزيمات الخالية من نيوكلييز.

اختيار المسبار Probe Selection

المسبار هو تتابع نوعي لنيوكليوتيدات مخلقة أو مستنسخة محضرة للتعرف والاتحاد بمنطقة معينة للحمض النووي دي إن إيه أو آر إن إيه. تتحد النيوكليوتيدات المعلمة مع التتابع أو تضاف كوصلة. ترتبط المسابير الطويلة أكثر بالنيوكلوتيدات المعلمة لكشف أفضل، إلا أن طول المسبار يؤثر على معدل اختراق الخلية (21). بالرغم من النظر لاستعمال النظائر المشعة أنها أكثر حساسية، إلا أنها غير عملية لمعظم المعامل لمشاكل الأمان والتخلص منها. تفضل النظائر غير المشعة وتنتج باندماج النيوكليوتيدات إلى الجزيئات المقررة مثل بيوتين أو ديجوكسيجنين أو فلوروسين.

التهجين Hybridization

في التحضير للتهجين، يوقف تفاعلات الإنزيم الهاضم بدورات غسيل كثيرة. يجب أن يكون المسبار وأهدافه مفردة الشريط لتهجين ناجح. عادة يصاحب دنترة الحمض النووي دي إن إيه بالتسخين في وجود فورماميد عند ٩٢ – ٩٦°م لمدة ٦ – ١٠ دقائق، إلا أن كل معمل سوف يحتاج لتقييم الحرارة الأفضل التي تنتج أفضل علامة بدون تغيير في شكل الخلية. قد تشمل بعض البروتوكولات الطرق لزيادة نفاذية النسيج لزيادة الحصول على المسابير. عادة يصاحب ذلك بإضافة المنظفات (ترايتون x–١٠٠ أو توين–٢٠، شركة سيجما) (Triton X-100 or Tween-20, Sigma, St. Louis, Mo.) إلى محاليل الغسيل المختلفة (21).

لتطوير تهجين موضعي ناجح، يجب أن تكون درجة حرارة الذوبان للهجن مزدوجة الشريط المبنية على تركيب نيوكليوتيدات معروفة ودرجة حرارة التحضين تحت التحكم. إذا سمح بتفاوت درجة الحرارة فإن الفيروسات غير المتماثلة سوف تكتشف. بمجرد حدوث التهجين يجب إزالة المسبار غير المرتبط. حساسية ونوعية الاختبار هي وظيفة كم عدد جزيئات المسبار تهجن إلى الهدف الفعلي مقابل المواضع غير النوعية وكيف يرتبط المسبار بقوة.

يطلق على مجموعة الظروف التجريبية مثل تركيزات الملح ودرجة الحرارة وهكذا التي يمكن أن تؤثر على خواص الارتباط للمسبار القريب لكنه غير المماثل بالحيطية stringency. تحت ظروف قلة الحيطية يسمح ببعض الاختلاف للنيوكليوتيدات بين الهدف والمسبار، بينما تحت الجدية العالية يتكون أزواج مختلفة قليلة جداً (21).

الصبغ النسيجي المناعي Immunohistologic Staining

مجرد حدوث التهجين وغسل كل المسبار غير المرتبط، يكتشف الأنتيجين برؤية المسبار المعلم أو المُعَنوَن. يمكن أن يفعل هذا مباشرة أو غير مباشر كما وصف في الصبغ المناعي. في الطريقة المباشرة يكتشف المسبار المعلم بالبيوتين بإضافة ستربت أفيدين المقترن مع الأنزيم وبعد ذلك التحضين مع المتفاعل المناسب. يمكن الحصول على تكبير أكثر للعلامة باستعمال الطريقة غير المباشرة والجسم المضاد للبيوتين أحادي النسيلة في الخطوة الأولى (3). يتبع ذلك بالجلوبيولين المناعي IgG للفئران المضاد المعامل بالبيوتين والذي يزيد من كمية البيوتين المرتبط مع المسبار. عندئذ يضاف ستربت أفيدين المقترن بالإنزيم والذي يرتبط بكل البيوتين المتاح مكبراً علامة الكشف الأنتيجيني.

استخدمت المسابير المعلمة بالديجوكسيجنين والمكتشفة بمضاد ديجوكسيجنين المقترن بإنزيم فوسفاتيز القاعدي أيضاً في نظام الكشف غير المباشر (29). طور نوع جديد من المسابير باستخدام الفلوريسين الذي يكتشف بواسطة مضاد الفلورسين المقترن بإنزيم الفوسفاتيز القاعدي. يعتقد أن الطريقة الأخيرة قد تقلل أكثر التفاعلات غير النوعية لأن الفلوروسين لا يوجد طبيعياً كمكون في نظام العائل (21).

الحساسية والنوعية Sensitivity and Specificity

في حالة تنفيذ تقنية التهجين الموضعي النسيجي الكيميائي جيداً، يجب أن تكون نظاماً عالي الحساسية لكشف التتابعات النوعية للحمض النووي في قطاعات النسيج أو الشف النقطي. قد يتطلب بعض الوقت قبل أن تصبح هذه التقنية الجديدة طريقة روتينية في معظم معامل التشخيص. قد تكون حساسية هذه الطريقة بالمقارنة بالأنظمة الأخرى مثل الصبغ المناعي لبعض أنتيجينات الطيور مصدر تساؤل (1).

References المراجع

1. Abbas, F., J. R. Andreasen, and M. W. Jackwood. Development of a polymerase chain reaction and a nonradioactive DNA probe for infectious laryngotracheitis virus. Avian Dis. 40:56-62. 1996.
2. Abdelmoumen, B. B., and R. S. Roy. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of avian mycoplasmas in culture. Avian Dis. 39:85-93. 1995.
3. Allan, G. M., J. A. Smyth, D. Todd, and M. S. McNulty. In situ hybridization for the detection of chicken anemia virus in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. Avian Dis. 37:177-182. 1993.
4. Barrett, J. T. Precipitation. In: Textbook of immunology: an introduction to immunochemistry and immunobiology, 5th ed. S. Bircher, ed., The C. V. Mosby Company, Washington, D.C. pp. 215-231. 1988.
5. Bhattacharjee, P. S., C. S. Naylor, and R. C. Jones. A simple method for immunofluorescence staining of tracheal organ cultures for the rapid identification of infectious bronchitis virus. Avian Pathol. 23:471-480. 1994.
6. Cartum, R. C. Immunohistochemistry of infectious diseases. J. Histotechnol. 18:195-202. 1995.
7. Chen, B. Y., S. Host, T. Nunoya, and C. Itakura. Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to infectious bronchitis virus in chicks. Avian Pathol. 25:269-283. 1996.
8. Cruz-Coy, J. S., J. J. Giambrone, and F. J. Hoerr. Immunohistochemical detection of infectious bursal disease virus in formalin-fixed, paraffin-embedded chicken tissues using monoclonal antibody. Avian Dis. 37:577-581. 1993.
9. Dea, S., and S. Garzon. Identification of coronaviruses by the use of indirect protein A-gold immunoelectron microscopy. J. Vet. Diagn. Invest. 3:297-305. 1991.
10. Fenner, F., P. Bachmann, E. Gibbs, F. Murphy, M. Studdert, and D. White. Laboratory diagnosis of viral diseases. In: Veterinary virology. Academic Press, Inc., San Diego, Calif. pp. 237-264. 1987.
11. Fitzgerald, S. D., W. M. Reed, K. A. Langheinrich, A. S. Porter, and L. A. Lumbert. A retrospective immunohistochemical study of type II avian adeno viral infection in turkey, pheasant and chicken tissues. Avian Dis. 38:78-85. 1994.
12. Fitzgerald, S. D., and A. Richard. Comparison of four fixatives for routine splenic histology and immunohistochemical staining for group 11 avian adenovirus. Avian Dis. 39:425-431. 1995.
13. Haines, D. M., and B. J. Chelack. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. J. Vet. Diagn. Invest. 3:101-112. 1991.
14. Hammond, G. W., P. R. Hazelton, and I. Chuang. Improved detection of viruses by election microscopy after direct ultracentrifuge preparation of specimen. J. Clin. Microbiol. 14:210-221. 1981.
15. Hassan, M. K., Y. M. Saif, and S. S. Shawky. Comparison between antigen-capture ELISA and conventional methods used for titration of infectious and bursal disease virus. Avian Dis. 40:562-566. 1996.
16. Hayhow, C. S., and Y. M. Saif. Development of an antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of enterovirus in commercial turkeys. Avian Dis. 37:375-379. 1993.
17. Hooper, P. T., G. W. Russell, P. W. Selleck, and W. L. Stanislawek. Observations on the relationship in chickens between the virulence of some avian influenza viruses and their pathogenicity for various organs. Avian Dis. 39:458-464. 1995.
18. Islam, M. R., and M. Khan. An immunocytochemical study on the sequential tissue distribution of duck plaque virus. Avian Pathol. 24:189-194. 1995.

19. Larsson, L.-I. Fixation and tissue pretreatment In: Immunocytochemistry: theory and practice. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. pp. 41-55. 1988.
20. Lockaby, S. B., F. J. Hoerr, A. C. Ellis, and M. S. Yu. Immunohistochemical detection of Newcastle disease virus in chickens. Avian Dis. 37:433-437. 1993.
21. Margraf, L. R., and D. Jennings-Siena. In-situ hybridization and molecular pathology for the histotechnician. In: Proceedings of the National Society for Histotechnology, Albuquerque, N. M. Workshop 71, pp. 1-30. 1996.
22. McNeilly, F., G. M. Allan, D. A. Moffett, and M. S. McNulty. Detection of chicken anemia agent in chickens by immunofluorescence and immunoperoxidase staining. Avian Pathol. 20:125-132. 1991.
23. McNulty, M. S., and G. M. Allan. Application of immunofluorescence in veterinary viral diagnosis. In: Recent advances in virus diagnosis. M. S. McNulty and J. B. McFerran, eds. Martinus Nijhoff, Dovdrecht, The Netherlands, pp. 15-26. 1986.
24. McNulty, M. S., W. L. Curran, D. Todd, and J. B. McFerran. Detection of viruses in avian faeces by direct electron microscopy. Avian Pathol. 8:239-247. 1979.
25. Naqi, S. A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. Avian Dis. 34:893-898. 1990.
26. Naqi, S. A., K. Karaca, and B. Bauman. A monoclonal antibody base antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious bronchitis virus serotypes. Avian Pathol. 22:555-564. 1993.
27. Nielsen, O. L., P. H. Jorgensen, M. Bisgaard, and S. Alexandersen. In situ hybridization for the detection of chicken anemia virus in experimentally-induced infection and field outbreaks. Avian Pathol. 24:149-155. 1995.
28. Oltishi, K., M. Senda, H. Yamamoto, H. Nagai, M. Norimatsu, and H. Sasaki. Detection of avian encephalomyelitis viral antigen with monoclonal antibody. Avian Pathol. 23:49-59. 1994.
29. Ramis, A., K. S. Latimer, F. D. Niagro, R. P. Campagnoli, B. W. Ritchie, and D. Pesti. Diagnosis of psitacine beak and feather disease (RBFD) viral infection, avian polyomavirus infection, adenovirus infection and herpesvirus infection in psitacine tissues using DNA in situ hybridization. Avian Pathol. 23:643-657. 1994.
30. Saif, L. S., Y. M. Saif, and K. W. Theil. Enteric viruses in diarrheic turkey poults. Avian Dis. 29:798-811. 1985.
31. Shafren, D. R., and G. A. Tannock. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of avian encephalomyelitis virus antigens. Avian Dis. 32:209-214. 1988.
32. Smyth, J. A., D. A. Moffett, M. S. McNulty, D. Todd, and D. P. Mackie. A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chicken anemia virus infection at one day of age. Avian Dis. 37:324-328. 1993.
33. Snyder, D. B., D. P. Lana, P. K. Savage, F. S. Yancey, S. A. Mengel, and W. W. Marquardt. Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. Avian Dis. 32:535-539. 1988.
34. Tanimura, N., K. Tsukamoto, K. Nakamura, M. Navita, and M. Maeda. Association between pathogenicity of infectious bursal disease virus and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry. Avian Dis. 39:9-20. 1995.
35. Thomas, C. B., and P. Sharp. Detection of antigenic variation among strains of Mycoplasma gallisepticum by enzyme-linked immunosorbent inhibition assay (ELISA) and western blot analysis. Avian Dis. 32:748-756. 1988.
36. Todd, D., J. L. Creelan, and M. S. McCoy. Dot blot hybridization assay for chicken anemia agent using a cloned DNA probe. J. Clin. Microbiol. 29:933-939. 1991.
37. Toro, H., V. Godoy, J. Lavenas, E. Reyes, and E. F. Kaleta. Avian infectious bronchitis: viral persistence in harderian gland and histological changes after eyedrop vaccination. Avian Dis. 40:114-120. 1996.
38. Tsukamoto, K., T. Matsumura, M. Mase, and K. Imai. A highly sensitive, broad spectrum infectivity assay for infectious bursal disease virus. Avian Dis. 39:575-586. 1995.