الباب السابع

إنتاج الأمصال المضادة والتشخيص السيرولوجى لفيروسات النبات

Production of Antisera and Serological Diagnosis of Plant Viruses

إنتاج الأمصال المضادة والتشخيص السيرولوچى لفيروسات النبات

Production of Antisera and Serological Diagnosis of Plant Viruses

الفصل الأول

الانتيجينات والأمصال المضادة

Antigens and Antibodis

عندما تحقن الفيروسات النباتية فى الحيوانات ذوات الدم الحار، فإنها تشجع على تكوين بروتين متخصص فى مصل دم هذه الحيوانات، يطلق عليه اسم الأجسام المضادة Antibodies أو أميونوجلوبولين، وهذه الأجسام المضادة تسبح فى الدورة الدموية، ولها القدرة على الاتحاد مع الفيروسات النباتية التى شجعت على تكوينها (الإنتيجين)، وقد كان Dvorak سنة ١٩٢٧ أول من نبه إلى أن الفيروسات النباتية تملك خاصية الإنتيجينية.

ويعتبر تفاعل الأجسام المضادة مع الفيروسات النباتية الكاملة أو مكوناتها على جانب كبير من الأهمية فى الكشف عن الفيروسات النباتية Detection of Plant Viruses وتشخيص مسببات الأمراض الفيروسية Diagnosis، وفى التقديرات الكمية للفيروسات وكذا فى تقسيم الفيروسات، ويعتبر هذا التفاعل أساس علم السيرولوچى Serology .

الإنتيجينات : Antigens

يعرف الإنتيجين بأنه المادة التى لها القدرة على تنشيط أو تنبيه عملية تكوين الأجسام المضادة فى دم الحيوانات ذات الدم الحار، والتى لها القدرة على التفاعل أو الاتحاد مع هذه الأجسام المضادة عند خلطهما معاً خارج جسم الحيوان **Invitro**.

وهناك خاصيتان يتميز بها الإنتيجين أولهما أنه يكون قادراً على تنشيط تكوين الأجسام

المضادة فى دم الحيوان المحقون به، وتسمى هذه الخاصة بالقدرة المناعية Immunogenicity.

أما الخاصية الثانية فهى قدرة هذه الإنتيجينات على الاتحاد مع الأجسام المضادة، وتشير هذه الخاصة إلى القدرة الإنتيجينة للمادة Antigenicity ، وتكون الجزيئات الكبيرة أكثر قدرة مناعية عن الجزيئات الصغيرة، وحيث إن الفيروسات النباتية عبارة عن جزيئات كبيرة تحتوى على البروتين فإنها تعتبر ذات قدرة عالية على تنشيط تكوين الأجسام المضادة عند حقنها بصورتها الكاملة، فى حين تكون الوحدات البنائية Portein subunit للكابسيد أقل كفاءة فى ذلك.

الخصائص العامة للأنتيجينات:

يمكن التأكد من أن مادة ما لها صفة الأنتيجينية عن طريق حقنها فى حيوان التجارب مثل الأرانب أو الفئران أو خنازير غينيا أو الخيول، ثم فصل سيرم الدم وخلطه مع هذه المادة بوسيلة أو بأخرى من وسائل الكشف السيرولوچى فإذا كان التفاعل إيجابيًّا كانت المادة أنتيجينًا.

وقد أشار لاندستينر Landsteiner أن هناك بعض المواد التى ليس لها قدرة مناعية، أى لا تنشط تكوين الأجسام المضادة فى دم الحيوان، ولكن لها القدرة على التفاعل مع الأجسام المضادة Invitro وأطلق على هذه المواد اسم Haptens أو الهابتينات. وقد وجد لاندستينر أن بعض الليبيدات والسكريات العديدة تسلك مثل هذا السلوك، واستلزم الأمر مزيداً من الدراسة لتحديد مفهوم الهابتينات.

فقد أطلق Topley & Wilson اصطلاح الهابتينات المركبة Complex Haptens على المواد التى تتحد بالأخص مع الأجسام المضادة المتخصصة مكونة راسباً مرئيًّا، دون أن تكون لها القدرة على تنشيط تكوين مثل هذه الأجسام. على سبيل المثال عند حقن الأرانب بمستخلص كحولى لكلية خنزير غينيا، لا تتكون أجسام مضادة، ولكنها تتفاعل مع الأجسام المضادة المستخلصة من أرنب محقون بمستخلص كلية الخنزير فى محلول ملحى.

كما أطلق اسم الهابتينات البسيطة Simple haptens على المواد التى ليس لها القدرة على تنشيط تكوين الأجسام المضادة عند حقنها فى دم الحيوان، وكذا لا تعطى تفاعلاً مرئيًّا

عند خلطها بالمصل المتخصص، ولكنها تتحد مع هذه الأجسام المضادة، وتمنع تفاعلها مع الأنتيجين الكامل، الذى أدى إلى ظهورها، فعلى سبيل المثال فعند التحليل المائى للسكريات العديدة المستخلصة من البكتريا pneumococcal يتجمع مركب عند خلطه مع المصل المضاد للسكر العديد من هذه البكتريا، أخفق فى تكوين راسب يمكن رؤيته، ولكن هذا المركب منع تكوين راسب أيضاً عند خلط السكر العديد مع المصل المضاد له، ويطلق على هذا الاختبار اسم اختبار التثبيط Inhibition Test .

وغالباً ما تكون الهابتينات البسيطة عبارة عن جزيئات صغيرة مثل حمض الطرطريك Tartaric Acid أو حمض البنزويك benzoic .

ولقد أوضحت بعض التجارب الحديثة أن بعض الهابتينات المركبة من الممكن أنه تكون أنتيجينات، إذا ما حقنت فى بعض الحيونات، بينما تكون هابتينات إذا ما حقنت فى البعض الآخر. فقد وجد ان السكريات العديدة للبكتريا تنشط تكوين الأجسام المضادة إذا ما حقنت فى الفئران أو الخيول والإنسان، بينما لا تنشط تكوين مثل هذه الاجسام إذا ما حقنت فى الأرانب.

العوامل التى تحدد الانتيجينية :

غالباً ما يكون الوزن الجزيىء للأنتيجين ١٠,٠٠٠ أو أكثر، وتعتبر بروتينات الدم أنتيجينات مثالية لأن وزنها الجزيىئى أكثر من ٦٠,٠٠٠ والمواد ذات الوزن الجزيئى المرتفع مثل الهيموسيانين (٦٧,٠٠٠) وفيروس TMV (١٧,٠٠٠,٠٠٠) تعتبر أنتيجينات مثالية، وكذا البيومين البيض يعتبر أنتيجينا جيداً لأن وزنه الجزيئى ٤٠,٠٠٠ ، ومع ذلك فقد وجدت أنتيجينات ذات وزن جزيئى منخفض يصل إلى ١٤,٠٠٠ مثل الرايبونيوكليز Ribonaclease و ٥٠٠٠ مثل Phenyliso cyanate .

غالباً ما تكون الأنتيجينات ذات سطح جزيئى كبير، وقد لوحظت أهمية السطح على الانتيجينية عندما أمكن تحويل بعض المواد غير الأنتيجنية ذات الوزن الجزيئى المنخفض إلى مواد أنتيجينة عند ادمصاصها على سطح مواد أخرى غير أنتيجينة مثل الفحم وأيدروكسيد الألومونيوم والكوارتز، وتجدر الإشارة إلى أن السطح لا يعتبر العامل الأساسى، بل ترجع

أهميته إلى إظهار العوامل المحددة للأنتيجين Determinant Sites الموجودة على سطح الجزيئات.

ولقد ثار جدل الباحثين واهتمامهم لفترة طويلة حول سبب عدم تكوين الكائن الحى (الحيوان) أجسام مضادة لانتيجينات جسمه، وقد أطلق Finner & Burnet سنة ١٩٤٩ على ذلك اسم التمييز الذاتى Self recognition؛ أى قدرة جهاز تكوين الاجسام المضادة فى جسم الحيوان على تمييز ما هو ينتمى إلى الحيوان نفسه، أو ما هو غريب عنه. ولذلك فإن المادة تكون أنتيجينًا بالنسبة للحيوان التى تعتبر غريبة عنه، ولذلك يجب الإشارة عند التحدث عن الأنتيجينية لمادة ما إلى نوع الحيوان، الذى ثبت ان هذه المادة تعتبر أنتيجينة بالنسبة له، فعلى سبيل المثال فإن البيومين سيرم دم الارانب يعتبر أنتيجينًا بالنسبة للدجاج ولكن ليس أنتيجينًا بالنسبة للأرانب.

وفى بعض الحالات النادرة والشاذة تعتبر بعض الخلايا أو المواد أنتيجينات بالنسبة للحيوان الذى استخلصت منه، وفى هذه الحالة يطلق على الاجسام المضادة الناشئة عنها اسم Auto Antibodies؛ أى أجسام مضادة ذاتية، كما يطلق على عملية التحصين ذاتها اسم عملية التحصين الذاتى Auto Immunization ، فعلى سبيل المثال.. فإن البروتين المستخلص من عدسة العين من الممكن أن يؤدى إلى تكوين اجسام مضادة إذا ما حقن فى فرد آخر من النوع نفسه، وتحت ظروف خاصة فى الفرد نفسه. وعند حقن خنازير غينيا بالحيونات المنوية لهذه الخنازير يتكون Spermocidin ، وهى عبارة عن أجسام مضادة للحيوانات المنوية Sperm ، ويمكن أن تتحد معها **In Vitro** ، ويجب أن نشير إلى أن المواد التى تسبب تكوين أجسام مضادة ذاتية Auto Antibodies تكون موجودة أساساً فى أنسجة خاصة، ولا ترتبط بالأنسجة المكونة للاجسام المضادة.

كما أن وجود كرات الدم الحمراء لفرد ما (إنسان مثلاً) من الممكن أن تحتوى على أنتيجينات تسبب تكوين أجسام مضادة، إذا ما حقنت فى فرد آخر أى إنسان آخر، ويطلق على هذه العملية اسم Iso - Immunization .

ولكى تؤدى الأنتيجينات إلى تكوين الاجسام المضادة يجب أن يتم حقنها فى الحيوان، وغالباً يتم هذا الحقن فى الوريد أو الغشاء البروتونى أو الحقن فى العضل، وينتج عن هذا

الحقن تغير فى مصل هذا الحيوان مثل تحول فى جلوبيولين الدم ينتج عنه تكوين أجسام مضادة Antibodies، أو أمينوجلوبيولين Immunoglobulin تكون لها القدرة على الاتحاد مع الأنتيجين Antigen ، والذى يسمى أيضاً أمينوجين Immunogen مكونة راسبًا مرئيًا.

الأجسام المضادة : Antibodies

يعتبر ظهور الأجسام المضادة فى دم الحيوانات أحد ردود الأفعال، التى تتم من جانب الحيوانات ذوات الدم الحار عند دخول جسم غريب له صفة الأنتيجن إلى دمائها.

والجسم المضاد عبارة عن أميونوجلوبيولين، وله القدرة على الاتحاد أو الالتحام مع الأنتيجين الذى سبب ظهوره.

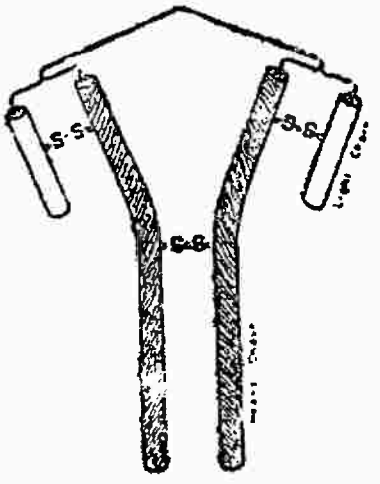
ويتركب جزئ الجسم المضاد (الأميونوجلوبيولين) من سلسلتين بولى ببتيد خفيفتين وسلسلتى بولى ببتيد ثقيلتين، وتلتحمان مع بعضهما برابطة ثنائى الكبريت، وتتكون كل سلسلة من منطقتين إحداهما ثابتة والأخرى متغيرة Variable ، ولكل جزئ منها مكانان للاتصال بالأنتيجين، كما هو الحال بالنسبة للأميونوجلوبين IgG حيث يوجد منها خمس أنواع هى G, M, A, E, D ، والخلايا التى تقوم بإفراز الأجسام المضادة هى خلايا البلازما الموجودة فى الخلايا الليمفاوية (B) ، وتوجد مرحلتان أساسيتان عند تكشف وإفراز الأجسام المضادة. المرحلة الاولى وليس لها علاقة بوجود الأنتيجين، وتبدأ فى المهد، وتظهر باستمرار فى نخاع العظام عند البلوغ؛ حيث يظهر على سطح كل خلية جديدة عند تكونها جزىء الأميونوجلوبيولين بتركيبه الخاص، وكذلك خاصية الالتحام مع الأنتيجين، وكل أبناء هذه الخلايا تحمل نفس الأميونوجلوبيولين، ثم تهاجر تلك الخلايا إلى الأعضاء الأخرى الخاصة بالجهاز المناعى مثل العقد الليمفاوية، حيث تبقى كخلايا ساكنة فى غياب الأنتيجين المناسب، والمرحلة الثانية فى تكشف الخلايا المناعية تحدث عندما يمر الأنتيجين فى الدم حيث يلتحم مع المستقبلات السطحية لجزئ الأمينوجلوبيولين، وهذا يشجع الخلية المناعية على الانفصال والتحول إلى خلايا بلازما التى تفرز فى تيار الدم كميات كبيرة من جزيئات الأميونوجلوبيولين، ذات التخصص نفسه مثل ما هو موجود على الخلية المناعية الام. وخلال عملية الانفصال تتكون أعداد كبيرة من نقاط التطفر فى DNA الموجود فى المنطقة المتغيرة

من السلسلة البولى ببتيدية، وتخضع هذه الطفرات للانتخاب من قبل الأنتيجين، ومن هنا يتواجد التوافق بين الجسم المضاد ومراكز الالتحام عند الانتيجين.

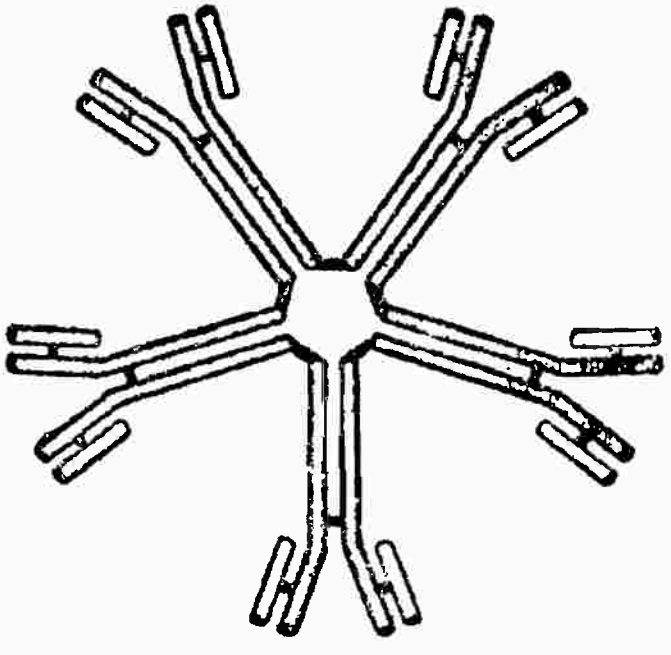
وجزئ الانتيجين البروتينى يملك عديداً من التراكيب البنائية أو المراكز المحددة للأنتيجينة Antigenic Determinants على سطحه، وتلك يمكن تمييزها بواسطة المستقبلات الموجودة على سطح جزئ الاميونوجلوبيولين (الجسم المضاد) الخاص ببعض الخلايا المناعية الليمفاوية، ولذلك فإن لكل أنتيجين يوجد عديد من الخلايا الليمفاوية التى تختلف فى مناطق الالتحام الموجودة عليها، والتى يمكن تنشيطها عند دخول الأنتيجين، ولذا يكون المصل متعدداً Polyvalent؛ لأنه يحتوى على عديد من الاجسام المضادة المختلفة، التى تتحد مع الأنتيجين، وكل منها ينشأ من خلية مناعية مختلفة.

بعض خواص الأميونوجلوبيولين

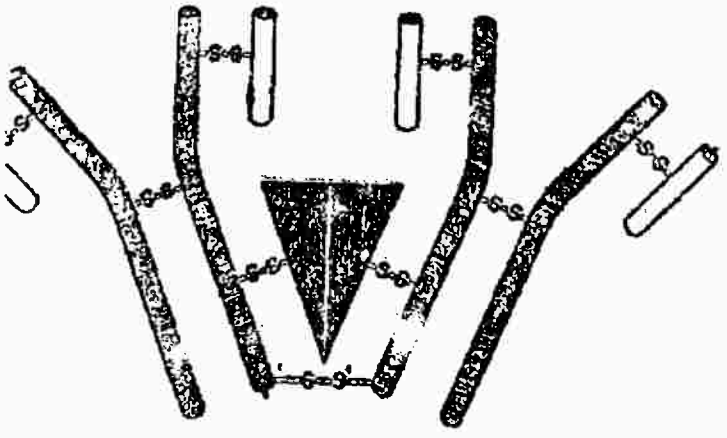
أميونوجلوبيولين	mg/100ml	الوزن الجزيئى	نصف الحياة يوم	الوظيفة البيولوجية
IgG	١٨٠٠–٩٠٠	١٦٠,٠٠٠	٢٢ – ١٨	Fix complement cross placenta Hetero cytorophic antibody
IgA	٢٩٤–١٥٦	١٧٠,٠٠٠ and polymars	٦,٥ – ٥	Secretary Antibody (surface protection)
IgM	١٤٥–٦٧	٩٦٠,٠٠٠	٥	1- Fix Complement 2- Efficient agglutination
IgD	٤٠ – ,٣	١٨٤,٠٠٠	٢,٨	غيرمعروف
IgE	١٣٠–١٠ ug	١٨٨,١٠٥	٢,٣	Raginic antibody



(شكل ٧ – ١) أميونوجلوبيولين IgG



(شكل ٧ – ٢) أميونوجلوبيولين IgM



(شكل ٧ – ٣) أميونوجلوبيولين IgA

طبيعة الأجسام المضادة Nature of Antibodies :

نظراً لأهمية الاجسام المضادة فى المناعة ونظراً لكونها مواد حيوية متخصصة التفاعل، فقد لاقت طبيعتها الكيمائية كثيراً من المحاولات للكشف عنها. وعلى أية حال فحتى الآن **لم يمكن معرفة الأساس التركيبى لهذه المكونات بالطرق الكيميائية؛ لوجود بعض الصعوبات، هى:**

١ – من الصعب الحصول على كميات كبيرة من الاجسام المضادة بصورة نقية.

٢ – عدم تقدم طرق التحليل للبروتينات بما فيه الكفاية.

وعلى كل حال فقد أظهرت بعض الدراسات الخاصة بتغير تركيب الدم بعد عملية حقن الأنتيجين أن الأجسام المضادة تتبع مجموعة الجلوبيولين Globulin من بروتينات المصل. وقد كان التمييز بين الجلوبيولين والألبيومين فى المصل مبنيًّا على درجة الذوبان فى محاليل ملحية متعادلة، ولكن أمكن الفصل بينهما بسرعة الحركة فى مجال كهربائى؛ حيث يتحرك الجلوبيولين ببطء أكثر فى وسط يميل إلى القاعدية. وقد قسمت مكونات الجلوبيولين إلى ثلاثة أقسام تبعاً لحركتها، وأعطيت الأسماء ألفا – بيتا – جاما، مرتبة الأسرع فالأقل، وقد وجد أن الأجسام المضادة جميعها إلا القليل منها تتبع المجموعة الأخيرة أى الجاما جلوبيولين.

والخلايا الليمفاوية لم يمكن زراعتها فى بيئة صناعية In Vitro ، وللتغلب على ذلك قام

كيوهلر وميلستين Kohler & Milstein سنة ١٩٧٥ بانتزاع الخلايا الليمفاوية B-Lymphocytes من فأر بعد حقنه، ثم خلط هذه الخلايا مع خلايا فأر، وعن طريق انتخاب خلايا فردية معينة تم الحصول على خلايا تعطى نوعاً واحداً من الأجسام المضادة، وهى الأجسام المضادة الوحيدة Monoclonal، والتى تكون قد أفرزت من خلية ليمفاوية واحدة.

وقد سبق أن ذكرنا أن الفيروسات النباتية لها صفات أنتيجينة مميزة، ولكن ذلك لا يعنى أنه أمكن تحضير أمصال مضادة لكل الفيروسات النباتية المعروفة، فمازالت هناك بعض الفيروسات مثل فيروس التفاف أوراق البطاطس PLRV لم يفلح الباحثون حتى الآن فى تحضير مصل مضاد له. وقد يعزى الفشل فى تحضير أمصال مضادة لبعض الفيروسات النباتية إلى أسباب متباينة، منها أن يكون تركيز الفيروس ضئيلاً أو إلى عدم ثبات الفيروس حيث يفقد خواصه الأنتيجينة عند استخلاصه، أو إلى احتواء عصير بعض النباتات على نسب عالية من المواد التينينية مثل الشليك، وهذه قد تؤدى إلى تغير فى خواص البروتين الفيروس عند الاستخلاص.

تحضير المصل المضاد للفيروس:

يتم تحضير المصل المضاد لفيروس نباتى ما بالحصول على هذا الفيروس بصورة نقية؛ أى تخليصه من كل الشوائب ذات الصفة الأنتيجينة مثل البروتين النباتى ثم حقن الفيروس النقى فى حيوان التجارب مثل الأرانب أو الفئران، ويتم الحقن فى الوريد أو العضل أو بكليهما معاً أو فى الغشاء البريتونى، أو تحت الجلد، وذلك بجرعات متساوية من الأنتيجين خلال فترة زمنية محددة؛ حيث ثبت أن حقن الحيوان بكميات صغيرة من الأميونوجين (الفيروس) خلال فترة من الوقت يعطى أجساماً مضادة أكثر منها لو حقنت هذه الكمية دفعة واحدة، كما يفضل إجراء الحقن بجرعات متزايدة متعددة للحصول على مصل ذى تركيز عال.

أما فى حالة الفيروسات التى يصعب الحصول عليها بصورة نقية تماماً، فإن الحقن يتم بجرعات صغيرة تتزايد من ٢سم فى المرة الأولى إلى ١٠سم فى الأخيرة، ويتراوح عدد

الحقنات ما بين ٥–١٠ مرات، ويفضل أن يكون الحقن فى العضل بمثل هذه التحضيرات، وعند الحقن فى الوريد يفضل استخدام معلق الفيروس فى محلول ملحى متعادل مع أقل كمية من الفوسفات والبورات، أما عند الحقن فى العضل أو تحت الجلد فعادة ما يخلط التحضير الفيروس قبل الحقن مع مساعد يشجع قدرتها الأنتيجينية، ومن أكثر هذه المساعدات استعمالاً هو مساعد فروند Freund Adjuvant ، ويكون فى صورته غير الكاملة Incomplete عبارة عن برافين معدنى (٨٥٪) Mannide Monolecetos كعامل استحلاب (١٥٪) بينما يضم فى صورته الكاملة Complete حوالى ٠,٠٥٪ وزن/ حجم من البكتريا Mycobacterium . ويتكون المستحلب من حجم واحد من المساعد مع حجم واحد من تحضير الفيروس. كما نستعمل مواد أخرى كمساعدات مثل الآجار والجينات الصوديوم، ولكنها لا تضارع مساعد فروند، الذى ظهر أنه يعطى أمصالاً مضادة ذات تركيز أعلى بكثير من الحقن فى الوريد، وعلى الأخص عند استعمال مساعد فروند الكامل.

وبعد أسبوعين إلى أربعة أسابيع من آخر حقنة، يمكن إجراء عملية الفصد للحصول على مصل. فإذا كان الحقن فى الوريد فغالباً ما تجرى عملية الفصد فى الأذن، التى لم تستعمل فى الحقن؛ حيث يتم تنظيف الأذن بالكحول، ويعمل جرح صغير فى العرق الأساسى للأذن بواسطة شفرة حلاقة حادة، ويستقبل الدم فى مخبار زجاجى معقم، ويراعى أنه يجمع الدم على جدار المخبار؛ حتى لا تنفجر كرات الدم الحمراء وبعد جمع كمية الدم المطلوبة يوقف النزيف، وإذا كان المطلوب هو الحصول على دم الأرنب فيمكن ذبحه.

يترك الدم فى المخبار أو الأنبوبة عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين، ثم يفصل عن جدار المخبار برفق بواسطة ساق زجاجية معقمة، ثم يوضع فى الثلاجة لمدة ٢٤ ساعة ثم يفصل المصل، وتجرى له عملية طرد مركزى بطئ لمدة ١٠ ق على سرعة ٢٠٠٠ ؛ لإزالة الفيبرين وشوائب الدم. ثم يحفظ المصل بطريقة خاصة حتى لا يتلف، وذلك بوضع المصل فى عبوات صغيرة مع إضافة مادة حافظة مثل الجلسرول أو أوزيد الصوديوم، وتحفظ على حالة سائلة على درجة حرارة ٤°م، كما يمكن حفظها على صورة مجمدة، أو مجففة، وهذه هى

الطريقة الأفضل للمحافظة على فاعلية الأمصال لعدة سنوات.

الأجسام المضادة المونوكلونال : Monoclonal Antibodies

خلال الثمانينيات من هذا القرن زاد الاهتمام بشدة بالأجسام المضادة الـ (Mabs) Mon-oclonal لاستخدامها فى نواحٍ متعددة للبحث فى فيروسات النبات، وعلى وجه الخصوص فى اكتشاف وتشخيص تلك الفيروسات.

إنتاج الأجسام المضادة الـ: Monoclonal

يتم إنتاج تلك الأجسام المضادة حسب الشكل التوضيحى التالى:

١ – حقن الفأر بالأنتيجين الفيروس

٢ – خلايا الميلوما المنزرعة التى

لا تعيش فى بيئة تحتوى على

التيمدين والأمينوبترين (HAT)

خلط خلايا الطحال وخلايا الميلوما ثم

نقل لأطباق تحتوى على ٩٦ نقرة

٣ – فى بيئة HAT تحتوى

خلايا الميلوما، ثم لا يمكن

خلايا الطحال مفردة أن تعيش، وتظل خلايا الهيبوديرما فى المزرعة.

٤ – Hypreourma Cells لاحظ أن خلايا الهيبوديرما تنمو، ثم تختبر المعلق لوجود الأجسام المضادة ذوات التحصن المطلوب.

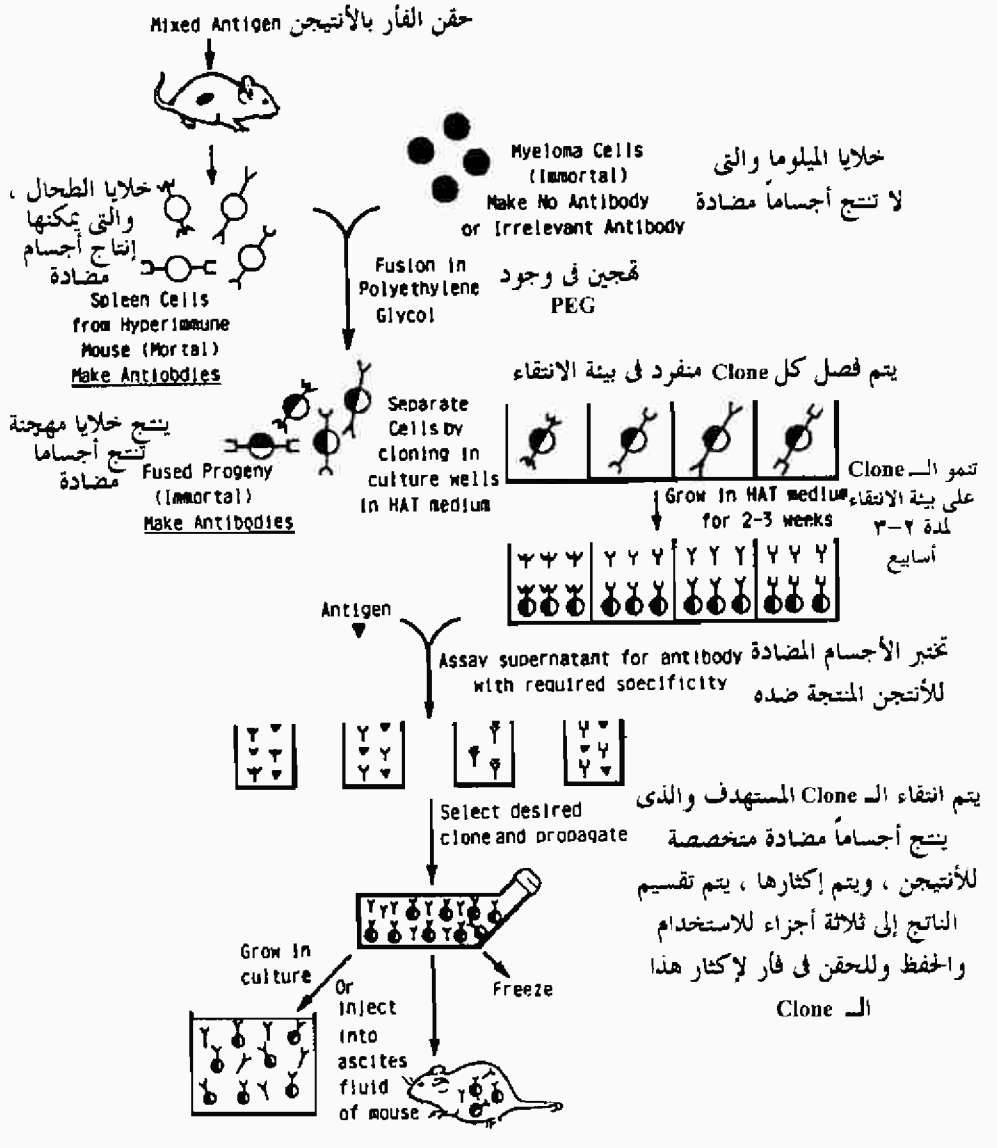
إعادة زرع الهيبوديرما لتأكيد

وجود الزراعات الفردية، ثم تجميد

عينة الخلايا للتأكد من عدم فقد الخلايا.

ثم تحفظ المزرعة، المعلقات تعتبر

عينة للأجسام المضادة ذوات Titre منخفض.

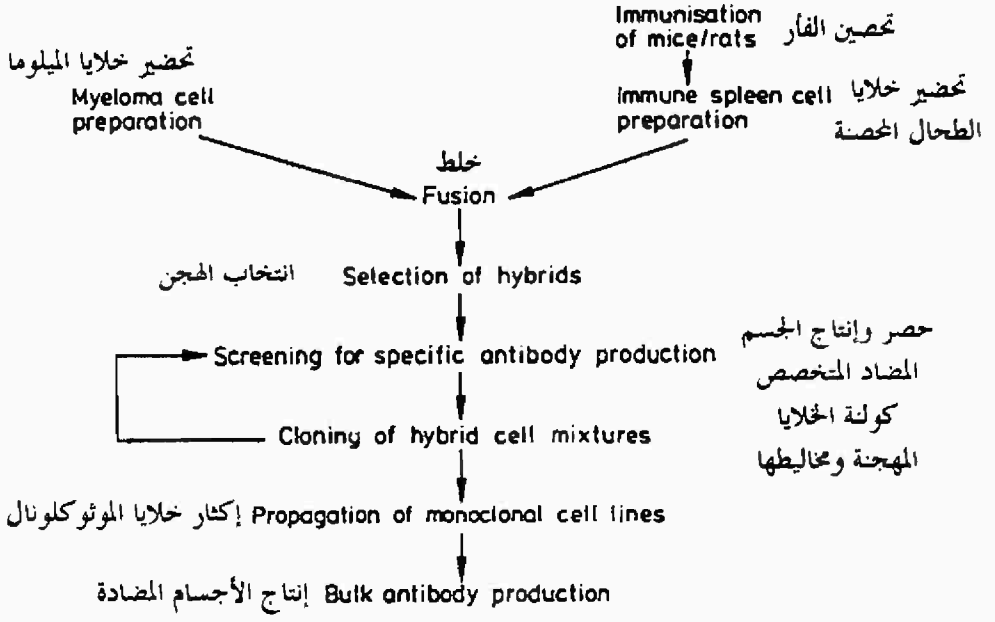


شكل (٧ – ٤) الأجسام المضادة المونوكلونال

ملاحظة: قدرة انسياب الخلايا لتعيش فى hypoxanthion; aminopterin, Thymi-dine (HAT) المأخوذة من خلايا الطحال؛ حيث تكون القدرة على التضاعف فى بيئة ماخوذة من خلايا الميولوما. نوع اختبار التعرف الذى يستعمل فى الخطوة 111 ليتعرف الأجسام المضادة ذات أهمية خاصة، وبعض المشتغلين يستعملون بعض أشكال من ELISA.

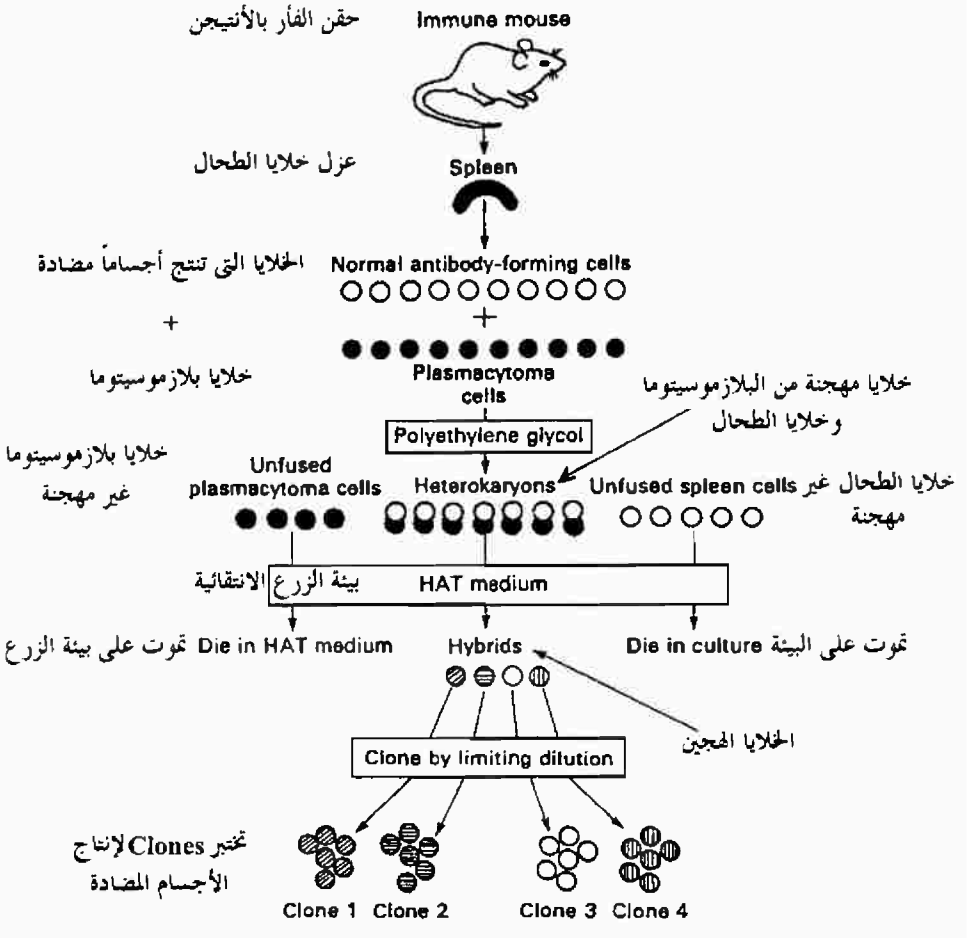
الدليل المعملى للأجسام المضادة المونوكلونال شكل (٧ – ٥)

A Practical Guide To Monoclonal Antibodies

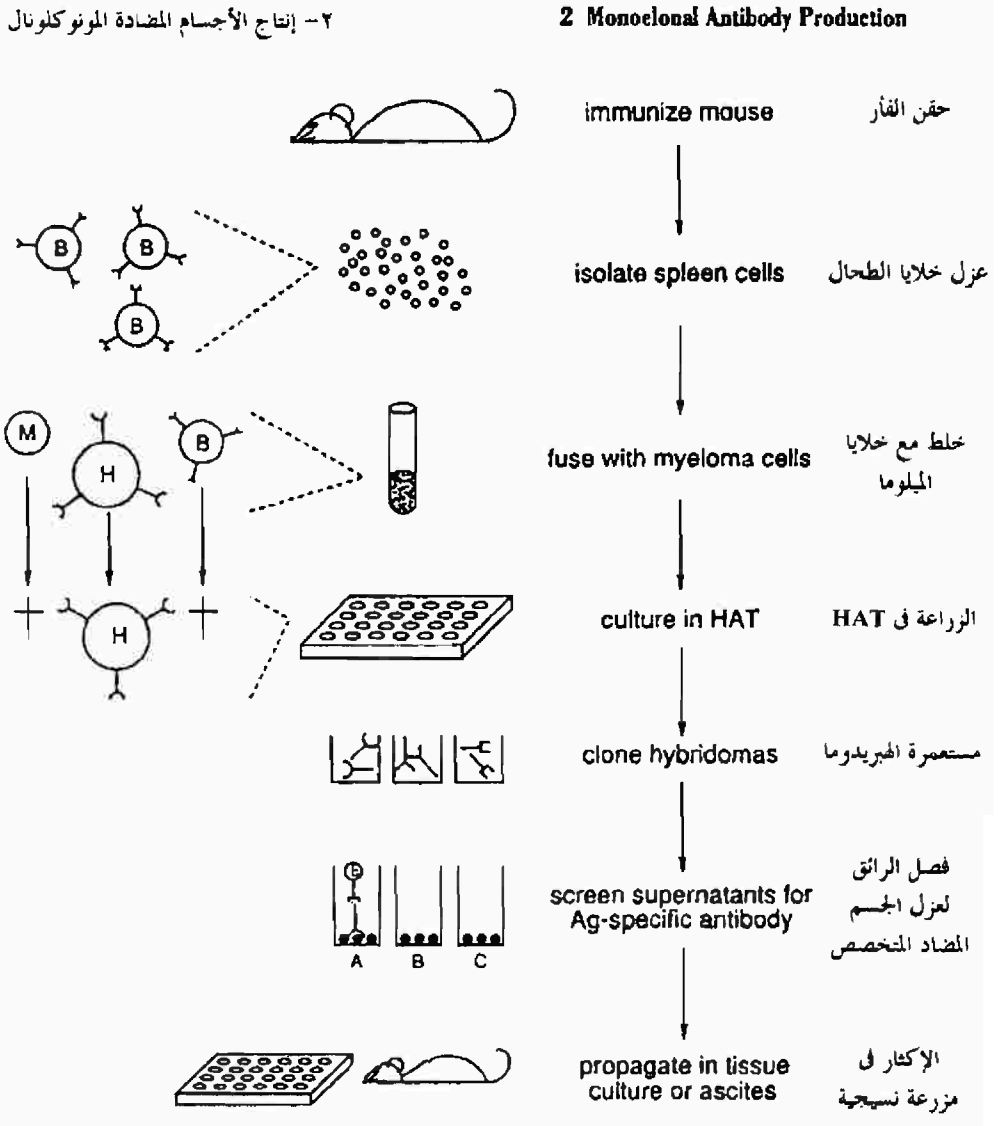


شكل (٧ – ٥)

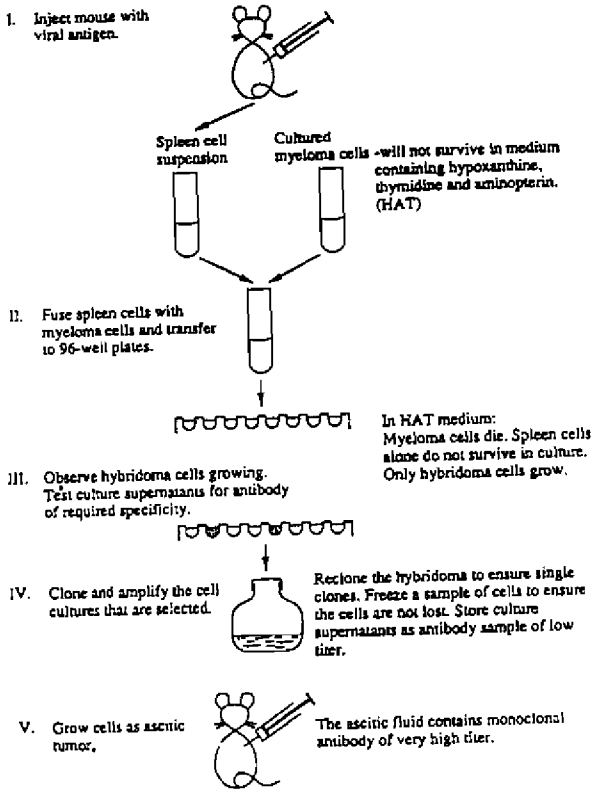
شكل (٧ - ٦) : الأجسام المضادة المونوكلونال : أساسيات والتطبيق
Monoclonal Antibodies: Principles and practice



إنتاج الهيبوديرما . اندماج خلايا الطحال لفار محصن مع HGPRT خلايا نيولوما (بلازما سيتوما) مستعملين بولى إيثيلين جليكولل . اندماج منتجات البانيوكليت bi-nucleate تعرف باسم heterokaryons، وفى الانقسام التالى تنتشر النواة nuclei خلايا هجن التى تنمو فى بيئة HAT . خلايا الميولوما غير المندمجة (المتداخلة unfused) الميتة فى بيئة HAT وخلايا الطحال غير المندمجة يمكنها أن تعيش لمدة أيام قليلة فى المزرعة . تختبر الهجن لإنتاج الأجسام المضادة ذات الميزات المرغوبة، وتكون بواسطة تخفيف محدود .



شكل (٧ – ٧ أ) الطرق العامة لإنتاج أجسام مضادة مونوكلونال فى الفأر



شكل (٧ – ٧ ب)

إنتاج الهيبوديرما. عندما يستحلب الانتيجين (imulsified) فى أدجوفنت (adjuvant) مثل أدجوفنت فروند (Freund)، والذى يستعمل بعد ذلك لتحصين فار أو حيوان آخر. يحصن الفار باستمرار Frequently بانتيجين. ١ – ٢ أسبوع بعد التحصين الأساسى، وتعزل خلايا الطحال أو العقد الليمفاوية من الحيوان. ٣ – ٤ أيام بعد ذلك.

كما هو مبين فى الرسم، فإن مسئولية الانتيجين تكون بولى كلونال – خلايا ب B تتحلل؛ بحيث تربط الانتيجين بواسطة تخصص مختلف قليلاً affinities ، ونشاطات مضادة. (للتبسيط فإن تكوينات شكلها y استعملت فى هذا الرسم لتوضح الأجسام المضادة. كل هذه الأجسام المضادة طبيعة لها سلسلتان ثقيلتان وسلسلتان خفيفتان

ومكانان لارتباط الأنتيجين) يتخلل البولى إيثلين خلايا B فى مخلوط خلايا الطحال بواسطة HGPRT خلايا الميليوما باختلافاتها. تزرع الخلايا بعد ذلك فى بيئة HAT ، وتكون الخلايا قادرة على خلق بيورينات Purines بواسطة طريق Pathway Salvage ، الذى به HGPRT لـ hypoxanthine guanine phosphosibosal transferase إنزيم أساسى.

يحتوى محلول الأورام على الأجسام المضادة الفردية بتركيز عال، وتنمو الخلايا على هيئة أورام.

هذا الشكل يوضح خطوات إنتاج الأجسام المضادة Monoclonal.

ملحوظة:

قدرة الخلايا المخلوطة على البقاء فى بيئات الهيبوزانثين والاميزيترين والثايميدين المستخلصة من خلايا البنكرياس فى حين قدرتها على التكاثر فى نبات مستخلص من خلايا الميلوما myeloma. ويعتبر نوع الاختبار الذى يستخدم فى الخطوة رقم ٣ للكشف عن وجود الأجسام المضادة على جانب كبير من الأهمية. ومعظم الباحثين يستخدمون بعض أشكال اختبار الاليزا ELISA

الاختبارات التى تستخدم فيها الأجسام المضادة: MABs

فى حالة الكشف من الفيروسات أو تشخيص مسببات الأمراض الفيروسية، فقد شاع استخدام الأجسام المضادة MABs بطريقة الـ ELISA. وللمرة الثانية يمكن القول أن توفير الظروف المناسبة لإجراء الاختبار من حيث الـ pH وغيره من العوامل ضرورى جداً لنجاح الاختبار. وفى عدد من التطبيقات، يمكن استخدام بروتوكول طريقة ELISA نفسها، التى استخدمت للكشف عن الأجسام المضادة MABS أثناء عملية الفصل، حيث إنه من الممكن أن تنتخب اجساماً مضادة MABS مختلفة تماماً حسب طريقة ال ELISA التى تستخدم، كما أن قدرة MAB على التفاعل مع أنتيجين معين تختلف كثيراً حسب طريقة اختبار الـ ELISA المستخدمة.

مزايا الأجسام المضادة : MABs

١ - متطلبات الحقن :

الفيران والأرانب يمكن حقنها بكميات قليلة من الانتيجين (بين ١٠٠ ميكروجرام أو أقل) ولو كان التحضير الفيروس ملوثًا ببعض مركبات العائل أو غيره من الفيروسات، فإنه يظل من الممكن اختبار الـ MABs التى تتفاعل فقط مع الفيروس المطلوب .

٢ -أنها تعتبر طريقة قياسية : Standardization

حيث إن الأجسام المضادة MABs تعطى مركبًا تفاعليًا واحدًا الذى يمكن نشره فى المعامل الأخرى، وبذلك يمكن التخلص من التضارب، الذى كان يحدث فى الماضى عند استخدام الأمصال الـ Polyclonal . وبالإضافة إلى ذلك فإنه يمكن الحصول على كميات غير محدودة من الأجسام المضادة MABs عندما تتوفر الظروف المناسبة .

٣ - التخصص العالى : Specificity

تتحد الأجسام المضادة MABs فقط مع موقع أنتجينى واحد فقط على سطح الأنتيجين، ولذلك فإنها تتمتع بالتخصص العالى، وبذلك يمكن استخدامها كأداة فعالة فى تميز السلالات الفيروسية، كما أنه يمكن استخدام الأجسام المضادة MABs فى دراسة بعض نواحى التركيب البنائى للفيروس، وكذا انتقاله بالحشرات .

٤ - التوافق العالى : High Affinity

إن عملية التصفية للكشف عن الأجسام المضادة MABs تؤدى إلى اختبار الأجسام المضادة التى تتمتع بخاصية الـHigh Affinity التوافق العالى مع الأنتيجين. والأجسام المضادة التى تتمتع بهذه الخاصية يمكن استخدامها بتخفيضات عالية، كما أنه يمكن استخدامها فى تنقية الفيروسات باستخدام طريقة affinity chromotography .

عيوب الأجسام المضادة الفردية : MABs

١ - التحضير : Preparation

تتميز الأمصال العديدة Polyclonal بسهولة تحضيرها. بينما تحتاج طريقة عزل الأجسام

المضادة الفردية MABs إلى جهد كبير ووقت طويل وإلى حد ما مكلفة. ولذلك فإنه عند اقتراح مشروع ما تستخدم فيه الـMABs فلابد من أن يوضع فى الاعتبار تلك العيوب أمام الميزات التى سبق الإشارة إليها.

٢- التخصص: Specificity

الأجسام المضادة الفردية MABs تكون على درجة عالية من التخصص فى بعض التطبيقات خاصة التشخيص، ومع ذلك فإنه يمكن خلطها حتى يمكن أن تعطى تفاعلات على نطاق أوسع.

٣ - الحساسية للتغيرات:

حيث إن الأجسام المضادة MABs على درجة عالية من التخصص، فإنها تكون حساسة جدا لأى تغيرات فى الأنتيجين الذى يمكن أن تحدث نتيجة للتجفيف والتحول الى الحالة الصلبة أو أى ظروف أخرى تحدث أثناء الاختبار. ومع ذلك فلا زالت الأجسام المضادة الفردية MABs تعتبر من أفضل الوسائل لدراسة كثير من النواحى فى الفيروسات النباتية، ولكنها لا يمكن أن تحل كلية محل الامصال Polyclonal.

الفصل الثانى

طرق تشخيص الفيروسات النباتية سيرولوجيًا

Serological diagnosis of Plant Viruses

إن أساس الطرق السيرولوجية المستخدم فى الكشف عن الفيروسات النباتية هو اتحاد أنتيجن الفيرس مع الأجسام المضادة له وتكوين راسبا مرئيا.

ويمكن إجراء التفاعل بين الأنتيجين الفيروس والأجسام المضادة له antibodies بطرق مختلفة، وبالنسبة للفيروسات النباتية يمكن استخدام الطرق التالية لإجراء هذا التفاعل:

١ ـ اختبار التجمع Aggluination test

٢ ـ اختبارات الترسيب Precipitation test

٣ ـ اختبار الانتشار فى الآجار Agar gel diffusion test

٤ ـ اختبار ربط العامل المذيب Complement fixatation

٥ ـ اختبار إبطال العدوى Nutralization of infection

٦ ـ اختبار الحساسية Anaphylaxis

٧ ـ اختبار المصل المرتبط بالأنزيم Enzyme - linked Immuno - Sorbent assay (ELISA)

٨ ـ اختبار Dot - Blot

٩ ـ اختبار Westetrn Blotting

١٠ ـ الميكروسكوب الإليكترونى للتحليل السيرولوجى SSEM

١ - اختبار التجمع: Agglutination test

وقد كان هذا الاختبار فى الماضى شائعًا لسهولة إجرائه ولإمكانية رؤية التفاعل مباشرة

وإمكانية استخدامه فى الحقل . ومن أبسط الطرق التى استخدمت منذ الثلاثينيات هى طريقة النقطة Drop test method عن العالمان دونين وبابوفا Dounin & Papova حيث توضع نقطة من عصير النبات المصاب بالفيرس على شريحة زجاجية، ثم تخلط مع نقطة من المصل المضاد للفيرس، ويقلب المخلوط فينتج عن ذلك راسب مرئى، يمكن ملاحظته بالعين المجردة فى خلال ثوان قليلة، ويساعد على رؤية الراسب تجمع الكلوروبلاستيدات عند اتحاد الفيرس مع الأجسام المضادة، ومن هنا اطلق على الاختبار اسم اختبار التجمع، وعموماً يطلق هذا الاسم؛ حينما يكون الأنتيجين الداخل فى التفاعل خلية كاملة مثل البكتريا، وحيث يطلق على اتحاد الفيرس النباتى النقى مع الأجسام المضادة له يطلق عليه اسم راسب، بينما يطلق على الاختبار باسم اختبار الترسيب .

وقد ظهرت مواد أخرى مثل خلايا الدم الحمراء للغنم أو جزئيات اللاتكس، التى تدمص عليها جزئيات الفيرس، أو الأجسام المضادة لإجراء اختبار التجمع .

٢ - اختبارات الترسيب : Precipitation tests

الغالبية العظمى من الأنتيجينات عليها العديد من مناطق الالتحام، وهذا يعنى أن كل جزئ أو جسيمة فيرسية من الممكن أن تتحد مع العديد من جزئيات الأجسام المضادة، وحيث إنه يعتقد أن الأجسام المضادة ثنائية الأوجة أى يحتوى كل منهما على منطقتين، أو على وجهين للالتحام مع الأنتيجين المتجانس معه فإنه عند خلط التحضير الفيرس مع المصل المضاد له، يتم الالتقاء بين طرفى التفاعل ويتم الالتحام بينهما؛ أى إنه كل جسيم فيروسى تتحد مع عديد من الاجسام المضادة، وهذه بدورها تلتحم من مكان الالتحام الثانى بانتيجين آخر، وبذلك يتكون راسب يكبر باستمرار حتى يمكن رؤيته .

ويمكن إجراء اختبار الترسيب للكشف عن الفيروسات النباتية بعدة طرق، نذكر منها اختبار الترسيب فى أنابيب Tube precipitation test ، وهى أكثر الاختبارات وأبسطها استعمالاً، وفى هذا الاختبار يتم خلط كميات صغيرة متساوية من الأنتيجين والمصل المضاد فى أنابيب صغيرة فى ظروف مناسبة، ثم يراقب تكون الراسب .

وهناك عدة عوامل تؤثر على دقة هذا الاختبار، وأهمها :

تركيز كل من الأنتيجين والأجسام المضادة؛ حيث من الممكن أن يمتنع ظهور الراسب نتيجة لزيادة تركيز الأنتيجين عن حد معين، وكذا نتيجة لزيادة الأجسام المضادة فى المصل المستخدم؛ ولذا فمن الضرورى عمل المخلوط من تخفيفات مختلفة لكل منهما؛ حتى يمكن التأكد أن عدم ظهور الراسب لايرجع الى زيادة أحد العنصرين.

وبالنسبة للفيروسات والامصال فإنه يوجد تخفيف لا يمكن للفيرس أو للمصل أن يعطى تفاعلاً عنده، ويطلق عليه بالنسبة للفيرس نقطة التخفيف النهائية Dilution end point ، وبالنسبة للمصل Titre ، كما أن وجود الأملاح ورقم الأس الأيدروجينى من العوامل التى تؤثر على دقة اختبار الترسيب؛ حيث ظهر من بعض التجارب، التى أجريت على فيروسات عصوية أن التغير فى رقم الاس الأيدروجينى pH يؤثر أو يغير من درجة تجمع الجزئيات الفيرسية، الأمر الذى يؤثر بالتالى على سرعة الترسيب، وكذا على التخفيف المناسب لإجراء التفاعل؛ فعلى سبيل المثال وجد أن فيرس TMV عند تخفيف ١/١٢٨ يعطى راسبًا مرئيًّا عند خلطه بالمصل المضاد، إذا كان رقم الـpH ٧ .

كما أن وجود الأملاح مهم للغاية لاختبار الترسيب؛ حيث وجد أن وجود الأملاح ضرورى لظهور الراسب، ولذا يجرى تخفيف المواد الداخلة فى التفاعل بمحلول ملحى فسيولوجى، كما أن الحرارة عامل من العوامل المهمة التى تؤثر على اختبار الترسيب؛ ولذا فإن الأنابيب التى تحتوى على الأنتيجين والمصل المضاد بعد خلطهاجيدا توضع رأسيًّا فى حمام مائى ذى درجة حرارة، يمكن التحكم فيها بواسطة ثرموستات، وتتوقف درجة الحرارة المستخدمة على مدى ثبات الفيرس. بالنسبة للفيروسات النباتية يمكن استخدام درجة حرارة ٥٠م، أما بالنسبة للفيروسات الأقل ثباتًا فتستخدم درجة حرارة أقل من ذلك ٣٧م، كما يراعى عند وضع الأنابيب فى الحمام المائى أن يكون نصف محتواها مغموراً فى الماء، إذ إن ذلك يسرع من الترسيب، كما أنه يسهل من مشاهدة الراسب فى المراحل الأولى لتكونه.

وقد ذكر باودن وبيرى Bawden & Pirie أن الفيروسات كروية الشكل، تعطى راسبًا متماسكًا وحبيبيًّا بينما الفيروسات ذات الشكل العصوى تعطى راسبًا هشًّا ومتجمعًا،

ويمكن للفيروسات العصوية أن تعطى النتيجة نفسها (راسب حبيبى متماسك) إذا ما تم تقصير أو تكسير تلك العصويات، ويجرى ذلك بإجراء عملية تجميد وإسالة لعدة مرات متتالية؛ مما يرفع من كفاءة التفاعل ونجاحه فى حالة الفيروسات العصوية او الخيطية.

ويستخدم اختبار الترسيب فى الأنابيب، بالإضافة إلى تشخيص الفيروسات النباتية فى معايرة كل من الفيرس والمصل المضاد، فعند معايرة الفيرس يوضع $\frac{1}{2}$ نصف مم من الفيرس فى سلسلة تخفيفات متضاعفة، ويخلط كل تخفيف من الفيرس مع $\frac{1}{2}$ نصف مم من المصل المضاد ذى تركيز ثابت، والعكس يتم عند معايرة المصل المضاد؛ حيث يتم تخفيف المصل، بينما يظل تخفيف الفيرس ثابتًا. وللحصول على أفضل صورة لاختبار الترسيب، تعمل مخاليط لكل من الأنتيجين مع كل تخفيف من المصل المضاد، ثم يسجل الوقت اللازم لظهور الراسب فى كل مخلوط، ويمكن التعبير عن هذه النتائج بخطوط كونتور بيانيا، يتضح منها المخاليط التى تظهر رواسبها فى الوقت نفسه، كما يتضح منها أيضًا أن نسبة الخلط المثلى لكل تركيز مصل مضاد تكون مختلفة عن تلك الخاصة بالفيرس.

كما يستخدم اختبار الترسيب على نطاق واسع لتقدير تركيز أنتيجين الفيرس فى التحضيرات المختلفة أو فى العوائل المختلفة وذلك بمعرفة نقط التخفيف النهائية لكل منها، كما سبق أن شرحت فى اختبار المعايرة.

كما يستخدم اختبار الترسيب فى تعريف الفيرس وتقدير درجة القرابة السيرولوجية لفيروسين أو بين السلالات المختلفة لفيرس ما، حيث تحمل الأنتيجينات الفيروسية أعدادًا من المواقع المحددة Determinat site فإذا كانت العزلتان عبارة عن فيروسين مختلفين أى إنه لا يوجد بينهما أى اشتراك أو تشابه فى المواقع المحددة، فإن المصل المضاد لأحدهما لا يعطى أى تفاعل مع الآخر. أما إذا كانت العزلتان لهما المواقع المحددة نفسها، فإن المصل المضاد لإحداهما يعطى مع الأخرى. أما إذا كانتا تشتركان فى عدد من المجموعات المحددة دون الأخرى، فإن التفاعل يتم بينهما بهذا القدر نفسه من الاشتراك.

وفى سنة ١٩٦٥ قام فان سلوجترن van slogtern بإجراء اختبار أسماه اختبار الترسيب

الدقيق Microprecipitin test ، وهو صورة مصغرة لاختبار الترسيب فى أنابيب؛ حيث يستخدم أطباق بترى صغيرة، تغلف بمادة الفورمفار أو السليكون Formvar or Silicon أو تستخدم أطباق معدة خصيصًا ذات شبكة من الثقوب غير العميقة، وتوضع نقطة واحدة من كل من المواد المتفاعلة (أنتيجين – أجسام مضادة)، ثم تعطى النقط بسائل البرافين لوقف عملية البخر، وتحضين هذه الأطباق، التى تحتوى على نقط بنسب مختلفة بين الأنتيجين إلى المصل المضاد، ثم يختبر الراسب باستعمال الميكروسكوب، وتعتبر هذه الطريقة أكثر حساسية من اختبار الترسيب فى أنابيب، كما أنها تستخدم كميات صغيرة جدًا من المواد المتفاعلة.

ومن اختبارات الترسيب أيضًا اختبار الحلقة: Ring interface test

وهو اختبار بسيط حيث يتلاقى الأنتيجين مع الجسم المضاد بواسطة الانتشار، ولإجراء هذا الاختبار يوضع قليل من المصل المضاد فى أنبوبة زجاجية ضيقة أو أنبوبة شعرية، وتوضع طبقة من تحضير الفيرس بعناية على القمة. تنتشر جزئيات الفيرس والأجسام المضادة، ويتكون الراسب حينما يتلاقيان بنسب مناسبة، ويتم ذلك خلال دقائق.

٣ – اختبارات الانتشار فى الآجار: Gel - diffusion test

وهذا الاختبار يشبه اختبار الحلقة، ويختلف عنه فى أن الطبقة السفلى تكون فى آجار جل مخفف، وتحتوى عادة على الأنتيجين، وهذا يطلق عليها الانتشار الفردى Single dif-fusion ، وقد وضعه Oudin سنة ١٩٤٦ . وفى هذه الحالة تتكون طبقة من الراسب فى الجل (بدلاً من السائل) عندما تتلاقى كميات مناسبة من الأنتيجين والأجسام المضادة . وحدث تعديل لهذا الاختبار، وذلك بوضع المصل المضاد فى ثقب من الآجار فى طبق بترى، ثم تعمل ثقوب فى الآجار حوله، وملأها بتحضيرات الأنتيجين، وفى هذه الحالة تتكون هالة من الراسب حول الثقب الأوسط، ويطلق على هذا الاختبار اسم الانتشار الإشعاعى Redial diffusion test ، وأكثر اختبارات الجيل شيوعًا فى الاستعمال هو اختبار (أوختر لونى)، والذى يطلق عليه two dimensional double diffusion test ، ويجرى هذا الاختبار

بصب الآجار الساخن أو محلول أجاروز على شريحة زجاجية أو طبق بترى ويترك ليبرد؛ ليكون طبقة من الجيل، ثم تعمل ثقوب بعد ذلك فى الجيل وتملأ بالمواد المتفاعلة (الأنتيجن والأجسام المضادة) وفى هذه الحالة عندما توضع الأمصال المضادة المختلفة المناسبة، وتحضير الفيرس فى ثقوب متجاورة، تتكون طبقة الراسب عند الزاوية الصحيحة لأقصر خط يصل ما بين الثقبين.

ومن أهم مميزات طريقة الانتشار فى الآجار ما يلى:

١ - يمكن فصل مخاليط الأنتيجينات بواسطة الأجسام المضادة لكل منها، وذلك بناء على معدل انتشار كل منها فى الآجار، أو على أساس معدل هجرة كل منها فى وسط كهربى Immuno electropheresis ، أو بناء على هاتين الخاصتين مجتمعتين.

٢ - إجراء مقارنة مباشرة بين نوعين مختلفين من الأنتيجينات، وذلك بوضعهما فى ثقبين متجاورين على الطبق نفسه، ومن المعتاد ان يوضع المصل فى الثقب الاول بينما توضع الأنتيجينات فى ثقوب تحيط بثقب الوسط، وتنتشر الأنتيجينات والأجسام المضادة باتجاه بعضهما خلال الآجار جل، وبعد مضى بعض الوقت تتكون منطقة يلتقى بها شقًّا التفاعل بنسب مناسبة لتكوين راسب، وينضم إلى المنطقة المزيد من الأنتيجين والأجسام المضادة مما ينتج عنه بناء خط ترسيب واضح يمكن رؤيته، إلا ان هذه الطريقة لا تستخدم إلا مع الفيروسات التى تنتشر خلال الآجار.

٤ - اختبار ربط العامل المذيب لكرات الدم الحمراء: Complement fixation test

لم ينتشر هذا الاختبار فى الكشف عن الفيروسات النباتية حاليًا لصعوبة إجرائه من ناحية، ولوجود بعض المواد فى عصير بعض النباتات تعوق إجراء التفاعل من ناحية أخرى.

وفى هذا الاختبار يكشف عن حدوث التفاعل أو الاتحاد بين الفيرس والأجسام المضادة بطريقة الأدلة Indicator method؛ أى بطريقة غير مباشرة لعدم ظهور راسب يمكن رؤيته.

وأساس هذا الاختبار أن المصل الطازج يحتوى على عدة مواد غير متخصصة، يطلق عليها مجتمعة اسم Complement ، ويمكن لهذه المواد أن تتدخل فى اتحاد الأنتيجين مع الأجسام المضادة، فلو حدث هذا التفاعل بين الأنتيجين والأجسام المضادة فى وجود هذه

المواد فإنها ترتبط؛ أى لا تصبح حرة فى المصل، ولكى يمكن التعرف عما إذا كانت هذه المواد ارتبطت أم لا، ويجرى اختبار يطلق عليه اسم الاختبار الدال Indication reaction، الذى يعتمد على وجود الـ Complement ، بصورة حرة فإذا ما حقن الأرنب بكرات الدم الحمراء المأخوذة من الغنم فإنه يمكن الحصول على أجسام مضادة لها، ويحتوى هذا المصل على Complement، والذى إذا ما خلط مع كرات الدم الحمراء للغنم يسبب إذابتها ولذا يعتبر هذا الاختبار دليلا على وجود الـ Complement حرًّا أو مرتبطا ومن الممكن إزالة هذا الـ Complement من المصل عن طريق تسخينه عند درجة حرارة ٥٦م لمدة نصف ساعة. ولذا فإن إجراء اختبار ربط العامل المذيب لكرات الدم الحمراء يتم على مرحلتين: ففى المرحلة الاولى يخلط الانتيجين مع المصل المضاد له بدرجات تخفيف مختلفة، فى وجود العامل المذيب Complement لكرات الدم الحمراء، وتحتفظ هذه المخاليط لمدة ساعة عند درجة حرارة ٣٧م حتى يتم ربط العامل المذيب تمامًا.

وفى المرحلة الثانية: يتم الاختبار الدال على ربط العامل المذيب، حيث يضاف إلى الانابيب كريات دم حمراء مأخوذة من الغنم بعد غسلها، وكذا مصل أرنب بعد تسخينه، ثم يحفظ المخلوط عند درجة حرارة ٣٧م، ثم تراقب درجة ذوبان كريات الدم الحمراء على فترات مختلفة.

فإذا كان العامل المذيب Complement ارتبط تمامًا فلا يحدث إذابة لكريات الدم الحمراء، وهذا معناه أنه قد حدث تفاعل بين الأنتيجين والأجسام المضادة، أما إذا ذابت كريات الدم الحمراء وانتشر اللون الأحمر فى أنبوبة الاختبار، فيدل ذلك على أن العامل المذيب لكرات الدم الحمراء لم يرتبط وما زال حرا، وبالتالى يدل على عدم حدوث تفاعل بين الأنتيجين والأجسام المضادة.

٥ - اختبار المصل المرتبط بالإنزيم

Enzyme - linked Immuno - Sorbent Assay (ELISA)

وتعتبر هذه الطريقة الآن من أحدث وأدق الطرق السيرولوجية التى تكشف عن الفيروسات فى العينات المحتوية على أقل كمية من الفيروسات، ويمكن أيضًا استخدامها فى التقدير الكمى، وترجع هذه الطريقة إلى الجهود التى قام بها Clark & Adams سنة ١٩٧٧

للكشف الدقيق والتقدير الكمى للفيروسات النباتية سيرولوجيا.

وتعتمد هذه الطريقة على القياس اللونى الناتج من تفاعل الإنزيم المرتبط بالمصل المضاد المتخصص للفيرس، وعند تفاعله مع الفيرس الخاص به يعطى اللون الاصفر، وهذا اللون يرى بالعين المجردة، وكذا يمكن قياسه بجهاز القياس الضوئى على موجة طولها ٤٥ نانوميتر.

وفى هذه الطريقة يجهز المصل المضاد للفيرس فى صورة جاما جلوبيولين نقى، وكذا يرتبط جزء من المصل النقى بإنزيم Alkaline Phos phatase ، والذى يتفاعل بعد ذلك مع مادته المتخصصة p - Nitrophengl phosphate ، ويجرى هذا التفاعل فى الـ microtiter-plate ، وهى تحتوى على ٩٦ أو ١٠٠ نقرة سطحها من مادة البولى ستيرين، وتستعمل لمرة واحدة فقط.

ولقد ظهر فى السنوات الأخيرة عديد من التعديلات والتطوير فى الطريقة الأساسية بهدف جعل الاختبار مناسبًا لأغراض معينة، وهذه الطريقة مفيدة جدًّا، حينما يكون مطلوبا إجراء عدد كبير من الاختبارات إذ إنها على درجة عالية من الحساسية حيث يمكنها الكشف عن التركيزات القليلة والتى تقل عن ١ إلى ١٠ ميكروجرام، كما أن هذه الطريقة اقتصادية فى استخدام الأمصال.

وهناك الآن طريقتان أساسيتين لإجراء الاليزا، هما:

الطريقة المباشرة Direct وقد شاع استخدام الطريقة المباشرة إلا أنه يحدد استخدامها عاملان أساسيان أولهما أنها تكون شديدة التخصص للسلالة، وهذا يعتبر مفيداً للتمييز بين سلالات الفيرس الواحد، ولكنها تقلل من قيمتها عند إجراء التشخيص الروتينى، إذ يمكن لبعض السلالات ألا تظهر فى الاختبار، والعامل الثانى هو احتياجها إلى تحضير مركبات مختلفة من الإنزيم المرتبط والأجسام المضادة لكل فيرس يراد اختباره.

والطريقة غير المباشرة أى طريقة ساندويتش الأجسام المضادة المزدوج فإن الإنزيم المستخدم فى الخطوة الأخيرة للكشف يكون مرتبطًا بأجسام مضادة، لأنتجلوبيولين الدجاج المضاد للأرانب يمكن استخدامه لربط الإنزيم، وعلى هذا الأساس فإن تحضيراً واحداً

للأنتجلوبيولين يمكن استخدامه فى عدد كبير من الفيروسات، التى حضرت أجسامها المضادة فى الأرانب وبالإضافة إلى ذلك.. فإن الطريقة غير المباشرة يمكنها الكشف عن عدد كبير من الفيروسات المتقاربة باستخدام مصل واحد.

كما ظهر فى السنوات الأخيرة اختبار الاليزا المكرر Repeat - ELISA وتعتبر هذه الطريقة أحدث تطوير لطريقة الاليزا حيث إنه بعد قراءة اللون للمرة الأولى، تحضن الأطباق لمدة ساعة، فى وجود محلول الإزالة لإزالة الجسم المضاد الأول، والثانى المرتبط بالإنزيم دون إزالة الأنتيجين من آبار آطباق الاليزا، ثم الغسيل حوالى عشر مرات بالماء المقطر، ثم بالـ TTBS، وإعادة وضع التخفيفات نفسها من المصل المضاد للفيرس أو السيرم العادى ثم تكرار مراحل الإزالة السابقة نفسها.

٦ - طريقة : Immnno Dot Blot

وفى هذه الطريقة تستخدم أغشية النيتروسيليولوز كبيئة صلبة لإجراء الاختبار. فى بعض الحالات فإن الفيرس الموجود فى العصير النباتى يتم حجزه على الغشاء كخطوة أولى ولإظهار اللون النهائى، يضاف الإنزيم المرتبط بالأجسام المضادة Ig G ، الذى يتحول إلى مادة غير ذائبة ملونة، ويمكن قياس كثافة اللون إما بالعين أو بجهاز قياس الكثافة الانعكاسى Reflectance densitometer.

ومن أهم مميزات هذه الطريقة Dot Blot : السرعة والتكلفة البسيطة وقلة كميات المواد المستخدمة فى التفاعل، وهذا التفاعل يناسب الاختبارات المعملية؛ حيث تكون بساطة الاختبار وقلة التكلفة مطلوبة.

٧ - طريقة Western Blotting :

وتعتمد هذه الطريقة على استخدام قدرة الاليكتروفوريس على فصل وتحليل البروتين فى الآجار فى الوقت نفسه، مع كفاءة فى تعريف وتقدير البروتين الفيرسى. والمراحل الأساسية للطريقة تنحصر فى فصل البروتين الفيرسى باستخدام دوديسيل الصوديوم سلفات وبولى اكريلاميد جيل اليكتروفوريس SDS - PAGE، ثم النقل الكهربى للبروتين من الجيل إلى

أغشية النيتروسيليولوز، ثم قص أغشية النيتروسلولوز المحتوية على بروتين الفيرس، ثم بحقن الشرائط بعد ذلك مع المصل المضاد للفيرس، ثم الغسيل ثم التحضين فى وجود الجسم المضاد الثانى المرتبط بإنزيم الفوسفاتيز، ثم الغسيل والتحضين فى وجود المظهر لإظهار اللون.

ومن أهم خصائص هذه الطريقة: أنه يمكن عن طريقها تعريف الفيرس عن طريق خاصيتين مستقلتين من خصائص الكابسيد البروتينى، هما: الوزن الجزيئى، والتخصص السيرولوجى.

٨ - الميكروسكوب الإليكترونى المتخصص للتحليل السيرولوجى: SSEM

ذكر ماثيوز (١٩٩٤) أن هذه الطريقة تعتمد فى التشخيص على خاصيتين من خصائص الفيرس، هما: قدرة الفيرس على التفاعل مع المصل المضاد الخاص به، وكذا الشكل المورفولوجى لجزئيات الفيرس.

وفى هذه الطريقة تُغطى الغشاء المغلف لشباك العينات الخاصة بالميكروسكوب الإليكترونى بالمصل المضاد الخاص بالفيرس المراد اختباره، ثم توضع الشبكات طافية فوق المعلق الفيرسى، وفى هذه الأثناء تلتصق أعداد كبيرة من جزئيات الفيرس، ويمكن مشاهدتها بالميكروسكوب الإلكترونى بطريقة الصبغ السالب.

وفى تعديل للطريقة السابقة، فإنه بعد التصاق الجسيمات الفيرسية على شبكة العينة تتم تغطيتها بالمصل المضاد المتخصص للفيرس، وهذا يؤدى الى إحاطة جسيمات الفيرس بهالة من جزئيات الاميونوجلوبيولين، والتى يمكن رؤيتها باستخدام طريقة الصبغ السالب بالميكروسكوب الإليكترونى للاندماج المتخصص بين فيروس ما والأمينوجلوبيولين.

ومن أهم مميزات هذه الطريقة أن النتائج تكون واضحة؛ فيتم التشخيص بالجسيمات الفيروسية ذات الشكل المورفولوجى المحدد، ولهذا فإنه من النادر أن تعطى هذه الطريقة نتائج إيجابية كاذبة. كما أن دقة هذه الطريقة تقارب طريقة ELISA ، ومن الممكن أن تكون دقتها أكثر لألف مرة من استخدام الميكروسكوب الإليكترونى العادى.

كما أن تغطية الأغشية المبطنة للشبكة بالأجسام المضادة تقلل جداً من الجسيمات التى تنتمى للعائل النباتى من أن تعلق بها. كما أن هذه الطريقة تسمح باستخدام الأمصال كما هى وحتى الأمصال ذات التركيز المنخفض، كما أنها لاتستهلك كمية كبيرة من هذه الأمصال أو الأنتيجين.

كما أن هذه الطريقة تسمح بنقل الشباك المعدة إلى معامل أخرى لمعاملتها بالمستخلص الفيرس، ثم إعادتها مرة أخرى لاستكمال بقية خطوات الفحص.

إلا أنه توجد بعض العيوب التى تعترض طريق شيوع استخدام هذه الطريقة، ومنها أنها لا تمكن من فحص بعض الجزيئات التى تقل فى حجمها كثيراً عن أن تظهر فى الميكروسكوب الإليكترونى، مثل: الوحدات البنائية للكابسيد البروتينى. كما أن هذه الطريقة مكلفة، وذلك لارتفاع سعر الميكروسكوب الإليكترونى وأدواته والمواد المستخدمة، كما أن الميكروسكوب يحتاج إلى خبرة وكفاءة خاصة فى تشغيله، مما يجعل هذه الطريقة لا يمكن أن تنافس طريقة الاليزا ELISA فى الاستخدام على نطاق واسع، ولكن مع ذلك يظل الميكروسكوب الإليكترونى ذا قيمة كبرى فى تعريف الفيروسات المجهولة، وفى حالة الحاجة إلى عدد قليل من الاختبارات التشخيصية.