الفصل الرابع والأربعون

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 هيربس لإحداث بقع في الطبقة الواحدة لخلايا الطيور الأولية، وتأثير الممرض النمطي الذي يحدثه فيروس أدينو في الطبقة الواحدة لخلايا كبد أجنة الدجاج، والآفات التي يحدثها فيروس الالتهاب الشعبي المعدي في أجنة الدجاج هي أمثلة للتعرف الفيروسي. يمكن تحديد حجم وشكل وتماثل 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

obeikandl.com

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[A].

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 والقصبة الهوائية المعدي
	هيربس فيريدي	فيروس ألفا هيربس	التهاب أمعاء البط الفيروسي (طاعون البط)
		فيروس جاما هيربس	مرض مارك وفيروس هيربس في الرومي وفيروسات هيربس الطيور الطليقة والمنزلية
ss - دي ان ايه	بارفوفيريدي	فيروس بارفو	فيروس بارفو الإوز والدجاج (مرض ديرزي)
		فيروس ديبندو	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 للنزيف المعوي
	بيرنافيريدي	فيروس أفيبرنا	مرض البورسا المعدي
ss - آر إن إيه (-)	أورثومايكسوفيريدي	فيروس انفلونزا أ، ب	أنلونزا أ
	بارامايوكسوفيريدي	فيروسروبيولا-فيروس بارامايوكسو	فيروس مرض النيوكاسل وفيروس بارامايوكسو الحمام (٢-٩) والتهاب الأنف والقصبة الهوائية الطيري

تابع الجدول رقم (٤٤,١).

ss - آر إن إيه (+)	التاجية	فيروس تاجي	التهاب الشعب في الحمام والفيروس التاجي المسبب للنزيف المعوي في الرومي
	كاليسيفيريدي	فيروس كاليسي	فيروس كاليسي الطيور
	أستروفيريدي	فيروس أسترو	فيروس التهاب الكبد من النوع الثاني في البط
	بيكورنافيريدي	غير محدد	التهاب المخ الطيرى (الارتعاش الوبائي) وفيروس التهاب الكبد من النوع الأول والثالث وفيروس التهاب الكبد في الرومي
	توجافيريدي	فيروس توجا	فيروس أربو المعدي في الدجاج والتهاب المخ في الطيور البرية
	فلافيفيريدي	فيروس فلافي	التهاب المخ في الرومي
	ريتروفيريدي	فيروس ريترو	فيروس ساركوما وتكثر نسيج البيض ليكوسيس وشباك بطاني ريتيكيلواندوثيليوسيس والفيروسات السرطانية

[A] ds = خيط ثنائي، ss = خيط أحادي، (-) = سلبي، (+) = إيجابي.

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

١) صفات الفيروس: الحجم، والشكل، ووجود أو غياب الغلاف، وتماثل الببلومر 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 سلبي أو كلاهما)، وعدد القطع، وحجم المجين، وتتابع القواعد النوائية ... 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 لنسيج محدد، والمرض المجهري، والتوزيع الجغرافي، والعلاقات المصلية.

obeikandl.com

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 والببتيدات المخلقة وخريطة الموقع البروتيني، توجد قواعد جزيئية 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 (8, 6)، 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 كبد الدجاج محدثة إمراضية 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 الالتهاب الشعبي المعدي (فيروس كورونا) وفيروسات أدينو، إلا أن العترات المتأقلمة في الأجنة لفيروس الالتهاب الشعبي المعدي تحدث تقزماً أكثر شدة وخللاً في تكوين الريش والتصاقاً قوياً للجنين لغشاء الكوريوالانتويس.

٦) فيروس مارك وفيروسات هيربس الطيور الأخرى يمكن أن تدرك في الخلايا الطلائية الأولية وحيدة الطبقة بتكوينها للبقع أو البؤر النمطية. بمجرد التأقلم، يمكن أن تلاحظ هذه الإمراضية 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 ١٠٠٠ 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 ربطة 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 إيزوإميلي (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 إيثلي 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. يجرى تحليل فصل كهربائي على الآجاروز المصبوغ بالأكريدين البرتقالي أو بروميد الإيثيديوم للعينة المعالجة بالنيوكلييز أو غير المعالجة. في حالة حساسية الحمض النووي لإنزيم نيوكلييز معين، تشاهد الحارة المُعالجة كحلقة عند النقطة حيث يلاحظ الحمض النووي غير المعالج. وصفت الطريقة السابقة بالتفصيل في أماكن عديدة (11, 2).

الحمض النووي لكل من الفيروسات مفردة أو مزدوجة الشريط يُهضم كاملاً بوحدة واحدة من إنزيم دي إن إييز البنكرياسي لكل ٠.٥ من الميكروجرامات من دي إن إيه عند ٣٧° م لمدة ٣٠ دقيقة. تهضم وحدة واحدة من نيوكلييز 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 إييز 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 أيٍّ 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 بروتينيز K ويليه الاستخلاص بالفينول والكلوروفورم : الكحول الأيزوإميلي (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 الجزيئية لاكتشاف الفيروس (12).

طريقة ١ Method 1

١أ) اجمع خلايا مزرعة الخلية الملتصقة بعملية التربسين أو الكحت ويتبعها الطرد المركزي. الخلايا النامية في معلق قد تطرد مركزياً مباشرة. اغسل الخلايا المترسبة مرتين في محلول ملح فوسفات لإزالة الوسط الغذائي وبروتينات المصل.

١ب) 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 و١٠٠ ملليمول كلوريد صوديوم. أضف سلفات دوديسيل الصوديوم وبروتينيز 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 إيزوإميلي، 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 و١ ميكروجرام/مل إنزيم ريبونيوكلييز خالي من دي إنييز.

٥) أعد الاستخلاص العضوي المذكور في خطوة ٣، يعقبه الترسيب بالكحول الإيثيلي في وجود ٠.٥ مجم من خلات 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 محتوياً 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 بروتينيز K وحضن لمدة ساعتين عند ٦٥ °م.

٣) استخدم الحمض دي إن إيه الناتج مباشرة أو عرضه إلى المعالجة بإنزيم آر إن إييز 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 إييز RNase هو بروتين عالي الثبات قادر على مقاومة التعقييم بالأتوكلاف، ومن ثم يجب أن تؤخذ احتياطات عديدة لتجنب التلوث بإنزيم آر إن إييز. يجب أن ترتدي دائماً قفازات عند تحضير آر إن إيه لأن الجلد يمثل مصدراً لإنزيم آر إن إييز. يجب أن تعامل المحاليل المائية بمحلول ثنائي إيثيل بيروكربونات التي تعطل آر إن إييز. على الرغم من أن طرق التخلص من ريبونيوكلييز من الأوعية الزجاجية والبلاستيكية بسيطة نسبياً، إلا أن الماصات وأنابيب الاختبار التي تستخدم لمرة واحدة تكون خالية من ريبونيوكلييز ولا تحتاج إلى معالجة مسبقة.

obeikandl.com

تستعمل طرق عديدة شائعة لتحضير آر إن إيه من الأنسجة والخلايا المزروعة. اعتماداً على أملاح جوانيديوم ومعطلات البروتين القوية لإيقاف نشاط ريبونيوكلييز ولتحلل الخلايا. الطريقة الأكثر تكراراً المذكورة بواسطة Chirgwin *et al.* (3) وتعديلاتها تنتج عطاءً عالياً من آر إن إيه قليل الجودة من مصادر غنية بالريبونيوكلييز، 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 ثيوسيانات جوانيديوم وفينول وكلوروفورم عند درجة بي إتش حامضية.

١) جهز مقدماً محلول مركز من ثيوسيانات جوانيديوم ٤ مول ، ٢٥ مللي مول سترات صوديوم بي إتش = ٧ و ٠,٥٪ ساركوسيل. هذا المحلول ثابت لأكثر من ٣ شهور عند درجة الغرفة. قبل الاستخدام اضف ٢- ميركابتوإيثانول لتركيز نهائي ١,٠ 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 بروبيلين التي تستخدم مرة واحدة. أضف التالي مع التقليب بعد كل إضافة: ٠,٥ مل خلات صوديوم، ٢ ملليمول، بي إتش = ٤، ٥ مل ماء مشبع بالفينول، ١ مل كلوروفورم.

٤) اطرد 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 بالطرد المركزي عند ٣٠٠٠ إكس جي لمدة ١٠ دقائق.

٦) قلب بشدة الحبة عقب إضافة ٢ مل كلوريد ليثيوم ٤ مول لإذابة السكريات العديدة الملوثة. آر إن إيه غير الذائب يستخلص ثانية بالطرد 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) اطرد مركزياً عند ٣٠٠٠ إكس جي لمدة ١٠ دقائق. اجمع الطبقة العليا (المائية) ورسبها مع كمية مساوية من ١٠٠٪ أيزوبروبانول في وجود ٠,٢ مول خلات الصوديوم، رقم حموضة ٥.

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

obeikandi.com

الطرق غير المباشرة Indirect Methods

يمكن أن يتحدد أيضاً نوع الحمض النووي بطريقة غير مباشرة باستخدام مثبطات الأيض النوعية المختلفة التي تتداخل مع تكاثر الفيروس. هذه الطرق تفيد خاصة مع الفيروسات التي لا تتكاثر إلى مستويات عالية كافية لتركيزها وتنقيتها والتوصيف 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). مثبطات 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 الثيدميدين. يكون الفيروس محتوياً 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 لأكتينوميسين D ذات قيمة في تفريق بعض فيروسات آر إن إيه. يمنع أكتينوميسين D نسخ الحمض النووي آر إن إيه المرسول من الحمض النووي مزدوج الشريط ومن ثَم 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 المرسول من العائل كحدث مبكر في دورة التكاثر ويثبط بواسطة أكتينوميسين D. تعتبر أعضاء عائلة فيروس ريو آر إن إيه أيضاً حساسة للأكتينوميسين D لأنها مزدوجة الشريط. يمكن أن تجرى حساسية الفيروس للأكتينوميسين D كالتالي (9):

١) حضر وسط مزرعة خلية يحتوي على أكتينوميسين D بمعدل ١ ميكروجرام/مل. تحذير: تأكد أن هذا المستوى من المضاد الحيوى غير سام للخلايا المستخدمة.

٢) عالج الخلايا بالأكتينوميسين D لمدة ساعتين قبل تحضينها مع الفيروس. اجمع الفيروس بعد ٢٤ ساعة و٤٨ ساعة من التحضين وقيم الإمراضية. قارن المعيار مع الفيروس الضابط المحصود بعد ٢٤ و ٤٨ ساعة بدون أكتينوميسين D يدل على حساسية الفيروس.

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

الجدول رقم (٤٤,٢). مقارنة الطرق المباشرة وغير المباشرة لخصائص الحمض النووي الفيروسي[A].

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

[A] (+) = الهضم أو التثبيط ، (-) = عدم الهضم أو التثبيط.

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 الإمراضية للفيروس.

الحساسية للإيثير Sensitivity to Ether

أضف إيثيل الإيثير ٢٠٪ بالحجم إلى كمية معينة من الفيروس في أنبوبة بغطاء حلزوني. أغلق الأنبوبة بشريط. 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 الإمراضية في الفيروس المعالج بالإيثير للوغاريتم 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 و٠,٠٥ مل من كلوريد صوديوم ٠,٨٥٪ ويجب تجهيزه في نفس الوقت. رج كلتا الأنبوبتين لعشرة دقائق

obeikandl.com

واطرد مركزياً ٥ دقائق عند ٣٣ إكس جي. استخدم الطبقة العليا لقياس إمراضية الفيروس. فقد الإمراضية للوغاريتم١٠ 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 نانوميتراً. تؤثر عدة عوامل على نتيجة ترشيح الفيروس منها التجمع، وتعدد الشكل، وانسداد الفتحات ببقايا الخلايا، والشحنات الكهربية الساكنة على المرشح. ترشيح عينة الفيروس خلال مرشح أولي و/أو مرشح ٤٥٠ نانوميتراً يقلل النتائج الغريبة التي يسببها تجمع بقايا الخلايا ويفضل غمر أو نقع المرشح الأولي في مصل عجول او تمريرها عليه (٥ مل من مصل عجول ١٠٪ في محلول ملح) لمعادلة الشحنات على الغشاء. الطريقة هي كالتالي:

١) نقِّ 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 نانوميتراً متصل بمحقن وتُشترى المرشحات غير معقمة ويجب تعقيمها بالأوتوكلاف واحفظ العينة للتحليل.

٣) مرر ٢٠٠ نانوميتراً من الراشح خلال مرشح ١٠٠ نانوميتراً واحفظ العينة للتحليل ثم مرر الباقي خلال مرشح ٥٠ نانوميتراً. 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) لاختبار صلاحية المرشح يمكن تمرير مزرعة بكتيريا خلال المرشح مباشرة عقب تجهيز الفيروس واختبر الراشح لتعقيمه.

شائل 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 ١٠^٦/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 للإيثر	
١- يمر من مرشح ٢٠٠ نانوميتر	عائلة فيروسات هيربس
٢- يحتجز بمرشح ٢٠٠ نانوميتر	عائلة فيروسات الجدري[A]
ب- مقاوم للإيثير	
١- يحتجز بمرشح ٥٠ نانوميتر	عائلة فيروسات أدينو
٢- يمر من مرشح ٥٠ نانوميتر	عائلة فيروسات بارفو
	عائلة فيروسات بابوفا
٣- يحتجز بمرشح ٢٠٠ نانوميتر	عائلة فيروسات جدري[A]
II مقاوم لمثيلات ثيميدين	فيروسات آر إن إيه
أ- حساس للإيثر	
١- إيجابي لتلازن الدم	
أ. حساس لأكتينوميسين D	عائلة فيروسات أورثوميكسو
ب. مقاوم لأكتينوميسين D	عائلة فيروسات باراميكسو
٢- سلبي لتلازن الدم	
أ. حساس لأكتينوميسين D	عائلة للفيروسات الارتدادية
ب. مقاوم لأكتينوميسين D	عائلة للفيروسات التاجية
	عائلة فيروسات فلافي[B]
ب- مقاوم للإيثير	
١- حساس لأكتينوميسين D	عائلة فيروسات ريو[C]
	عائلة فيروسات بيآر إن إيه[C]
٢- مقاوم لأكتينوميسين D	عائلة فيروسات بيكوآر إن إيه[B]

[A] قد تدمر فيروسات الجدري أو لا بالإيثير و/أو الكلوروفورم.

[B] يمر من مرشح ٥٠ نانوميتراً.

[C] ينخفض المعيار بشدة بمرشح ٥٠ نانوميتراً.

obeikandl.com

References المراجع

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. Przybia, 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 improvment of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyantate-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.

Obeikandl.com