

الباب السابع

**إنتاج الأمصال المضادة والتشخيص  
السيرولوجي لفيروسات النبات**

**Production of Antisera and Serological  
Diagnosis of Plant Viruses**

oboeikandi.com

## إنتاج الأمصال المضادة والتشخيص

### السيروولوجى 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 الاجسام المضادة Antibodies أو أميونوجلوبولين، وهذه الاجسام المضادة تسبح فى الدورة الدموية، ولها القدرة على الاتحاد مع الفيروسات النباتية التى شجعت على تكوينها (الانتيجين)، وقد كان Dvorak سنة ١٩٢٧ أول من نبه إلى أن الفيروسات النباتية تملك خاصية الإنتيجينية .

ويعتبر تفاعل الاجسام 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 السيروولوجى Serology .

#### الإنتيجينات : Antigens

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

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

المضادة في دم الحيوان المحقون به، وتسمى هذه الخاصة بالقدرة المناعية Immunogenicity .  
أما الخاصة الثانية فهي قدرة هذه الإنتيجينات على الاتحاد مع الأجسام المضادة، وتشير هذه الخاصة إلى القدرة الإنتيجينية 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 الأرنب أو الفئران أو خنازير غينيا أو الخيول، ثم فصل سیرم الدم وخلطه مع هذه المادة بوسيلة أو بأخرى من وسائل الكشف السيرولوجى فإذا كان التفاعل إيجابياً كانت المادة أنتيجيناً .

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 مرئياً، دون أن تكون لها القدرة على تنشيط تكوين مثل هذه الأجسام . على سبيل المثال عند حقن الأرنب بمستخلص كحولى لكلية خنزير غينيا، لا تتكون أجسام مضادة، ولكنها تتفاعل مع الأجسام المضادة المستخلصة من أرنب محقون بمستخلص كلية الخنزير فى محلول ملهى .

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 مرئياً

عند خلطها بالمصل المتخصص، ولكنها تتحد مع هذه الاجسام المضادة، وتمنع تفاعلها مع الانتيجين 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 الحيوانات، بينما تكون هابتينات إذا ما حقنت فى البعض الآخر. فقد وجد أن السكريات العديدة للبكتريا تنشط تكوين الاجسام المضادة إذا ما حقنت فى الفئران أو الخيول والإنسان، بينما لا تنشط تكوين مثل هذه الاجسام إذا ما حقنت فى الارانب .

#### العوامل التى تحدد الانتيجينية:

غالباً ما يكون الوزن الجزيئىء للأنتيجين ١٠٠.٠٠٠ أو أكثر، وتعتبر بروتينات الدم أنتيجينات مثالية لأن وزنها الجزيئى 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 و٥٠٠٠ مثل Phenyliso cyanate .

غالباً ما تكون الانتيجينات ذات سطح جزيئى كبير، وقد لوحظت أهمية السطح على الانتيجينية عندما أمكن تحويل بعض المواد غير الانتيجينية ذات الوزن الجزيئى المنخفض إلى مواد أنتيجينية عند ادمصاصها على سطح مواد أخرى غير أنتيجينية مثل الفحم وأيدروكسيد الالومونيوم والكوارتز، وتجدر الإشارة إلى أن السطح لا يعتبر العامل الاساسى، 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 أنتيجيناً بالنسبة للحيوان التى تعتبر غريبة عنه، ولذلك يجب الإشارة عند التحدث عن الانتيجينية لمادة ما إلى نوع الحيوان، الذى ثبت أن هذه المادة تعتبر أنتيجينية بالنسبة له، فعلى سبيل المثال فإن البيومين سيرم دم الارانب يعتبر أنتيجيناً بالنسبة للدجاج ولكن ليس أنتيجيناً بالنسبة للارانب .

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 أجسام مضادة إذا ما حقن فى فرد آخر من النوع نفسه، وتحت ظروف خاصة فى الفرد نفسه . وعند حقن خنازير غينيا بالحيوانات 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 بالانسجة 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 الانتيجينات 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 في مصبل هذا الحيوان مثل تحول في جلوبيولين الدم ينتج عنه تكوين اجسام مضادة Antibodies، أو امينوجلوبيولين Immunoglobulin تكون لها القدرة على الاتحاد مع الانتيجين Antigen، والذي يسمى أيضاً امينوجين Immunogen مكونة راسباً مرئياً.

### الأجسام المضادة: Antibodies

يعتبر ظهور الاجسام المضادة في دم الحيوانات أحد ردود الافعال، التي تتم من جانب الحيوانات ذوات الدم الحار عند دخول جسم غريب له صفة الانتيجين إلى دماها.

والجسم المضاد عبارة عن اميونوجلوبيولين، وله القدرة على الاتحاد أو الالتحام مع الانتيجين الذي سبب ظهوره.

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

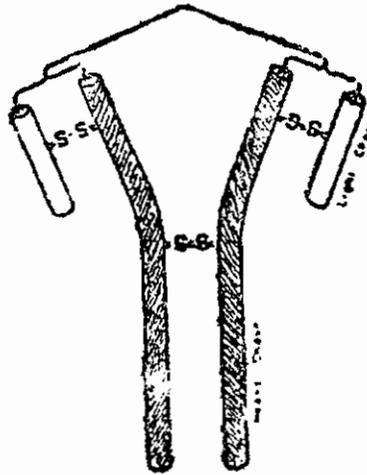
## فيروسات النبات

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

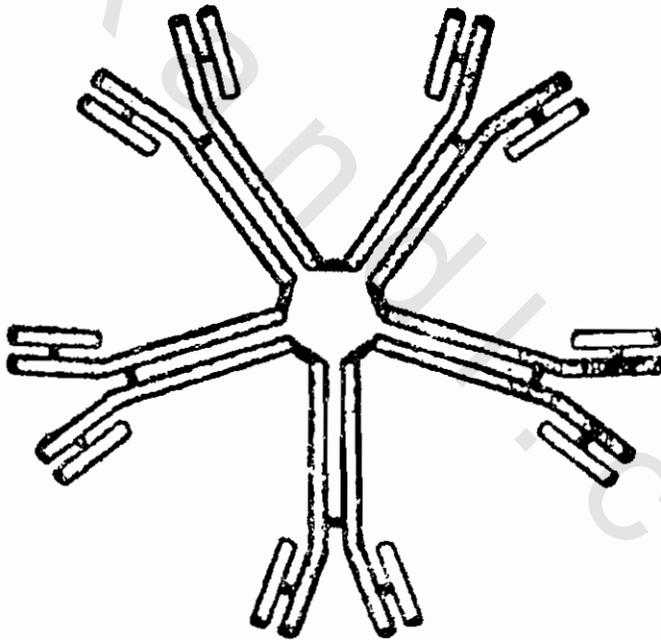
وجزئ الأنتيجين البروتينى يملك عديداً من التراكييب البنائية أو المراكز المحددة للأنتيجينة Antigenic Determinants على سطحه، وتلك يمكن تمييزها بواسطة المستقبليات الموجودة على سطح جزئ الأميونوجلوبولين (الجسم المضاد) الخاص ببعض الخلايا المناعية الليمفاوية، ولذلك فإن لكل أنتيجين يوجد عديد من الخلايا الليمفاوية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

### بعض خواص الأميونوجلوبولين

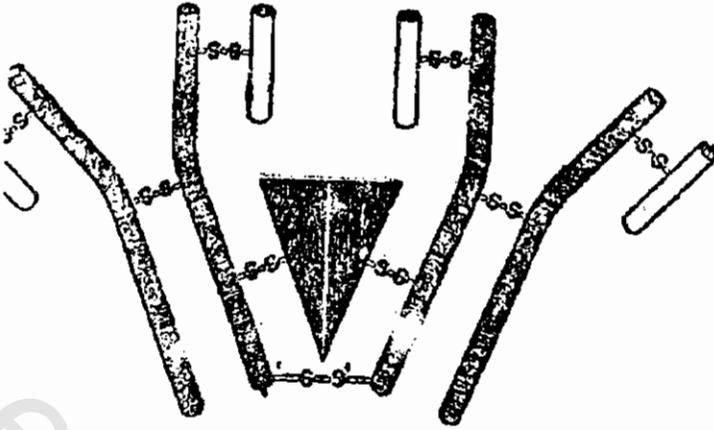
الوظيفة البيولوجية	نصف الحياة يوم	الوزن الجزيئى	mg/100ml	أميونوجلوبولين
Fix complement cross placenta Hetero cytorophic antibody	٢٢ - ١٨	١٦٠,٠٠٠	١٨٠٠-٩٠٠	IgG
Secretary Antibody (surface protection)	٦,٥ - ٥	١٧٠,٠٠٠ and polymars	٢٩٤-١٥٦	IgA
1- Fix Complement 2- Efficient agglutination	٥	٩٦٠,٠٠٠	١٤٥-٦٧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



(شكل ٧ - ١) أميونوجلوبيولين IgG



(شكل ٧ - ٢) أميونوجلوبيولين IgM



(شكل ٧ - ٣) أميونوجلوبيولين IgA

### طبيعة الأجسام المضادة : Nature of Antibodies

نظراً لأهمية الأجسام المضادة في المناعة ونظراً لكونها مواد حيوية متخصصة التفاعل، فقد لاقت طبيعتها الكيميائية كثيراً من المحاولات للكشف عنها. وعلى أية حال فحتى الآن لم يمكن معرفة الأساس التركيبي لهذه المكونات بالطرق الكيميائية؛ لوجود بعض الصعوبات، هي:

١ - من الصعب الحصول على كميات كبيرة من الأجسام 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 والالبومين في المصل مبنياً على درجة الذوبان في محاليل ملحية متعادلة، ولكن أمكن الفصل بينهما بسرعة الحركة في مجال كهربائي؛ حيث يتحرك الجلوبيولين ببطء أكثر في 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 أي الجاما جلوبيولين. والخلايا الليمفاوية لم يمكن زراعتها في بيئة صناعية In Vitro، وللتغلب على ذلك قام

## فيروسات النبات

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

وقد سبق أن ذكرنا أن الفيروسات النباتية لها صفات أنتيجينية مميزة، ولكن ذلك لا يعنى أنه أمكن تحضير أمصال مضادة لكل الفيروسات النباتية المعروفة، فما زالت 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 ضعيفاً أو إلى عدم ثبات الفيروس حيث يفقد خواصه الأنتيجينية عند استخلاصه، أو إلى احتواء عصير بعض النباتات على نسب عالية من المواد التينينية مثل الشليك، وهذه قد تؤدي 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 الأنتيجينية 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 ٢ سم فى المرة الأولى إلى ١٠ سم فى الأخيرة، ويتراوح عدد

الحقنات ما بين ٥-١٠ مرات، ويفضل أن يكون الحقن في العضل بمثل هذه التحضيرات، وعند الحقن في الوريد يفضل استخدام معلق الفيروس في محلول ملحي متعادل مع أقل كمية من الفوسفات والبورات، أما عند الحقن في 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 في صورته غير الكاملة Incomplete عبارة عن برفين معدنى ( ٨٥٪ ) Mannide Monolecetos كعامل استحلاب ( ١٥٪ ) بينما يضم في 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 أمصلاً مضادة ذات تركيز أعلى بكثير من الحقن في 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 في 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 حلقة 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 ٤م°، كما يمكن حفظها على صورة مجمدة، أو مجفدة، 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 التوضيحي التالي :

١ - حقن الفأر بالانتيجين الفيروس

٢ - خلايا المييلوما المنزرعة التى

لا تعيش فى بيئة تحتوى على

التيمدين والأمينوبترين (HAT)

خلط خلايا الطحال وخلايا المييلوما ثم

نقل لأطباق تحتوى على ٩٦ نقرة

٣ - فى بيئة HAT تحتوى

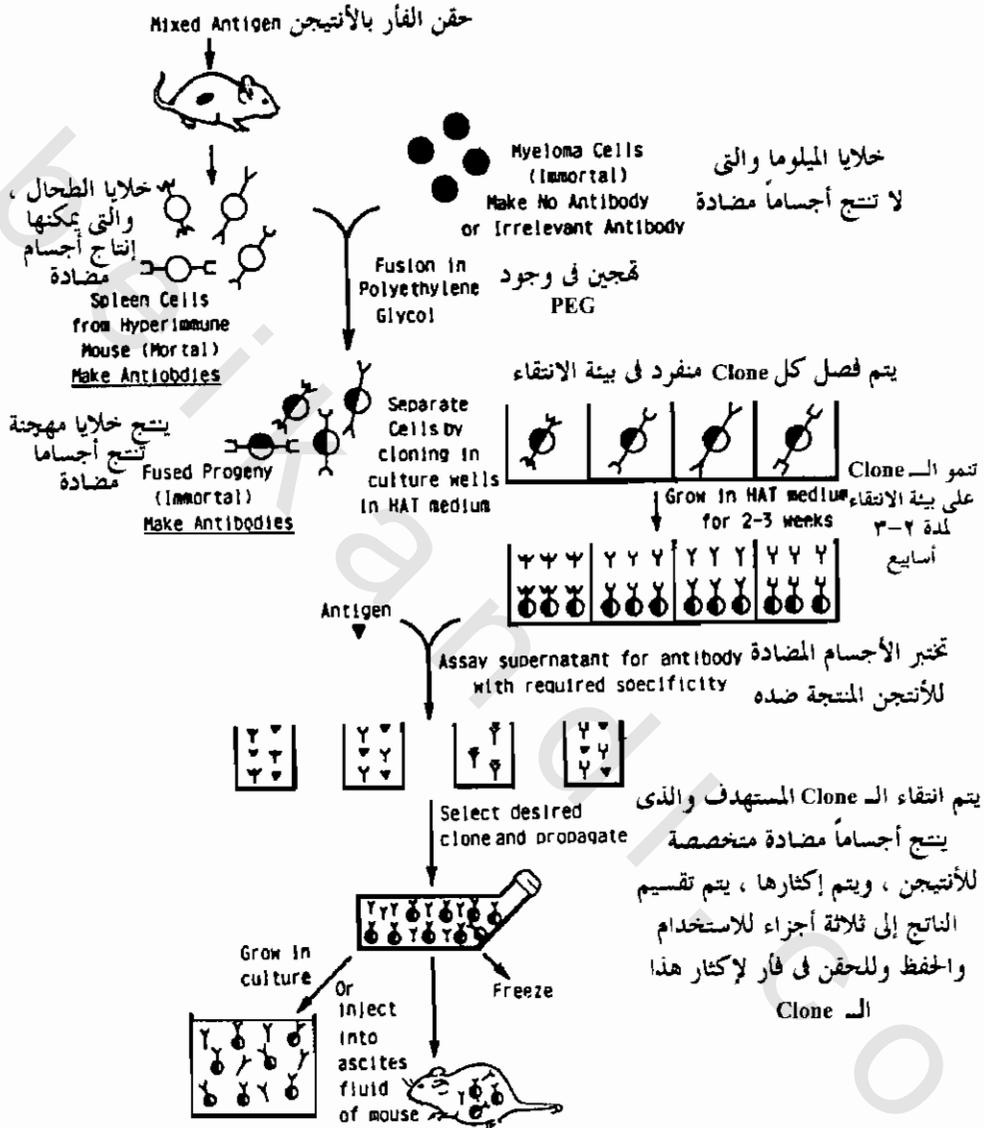
خلايا المييلوما، ثم لا يمكن

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

٤ - Hypreourma Cells لاحظ أن خلايا الهيبيوديرما تنمو، ثم تختبر المعلق لوجود

الأجسام المضادة ذوات التحصن المطلوب .

إعادة زرع الهيبيوديرما لتأكيد  
وجود الزراعات الفردية، ثم تجميد  
عينة الخلايا للتأكد من عدم فقد الخلايا.  
ثم تحفظ المزرعة، المعلقات تعتبر  
عينة للأجسام المضادة ذوات Titre منخفض.

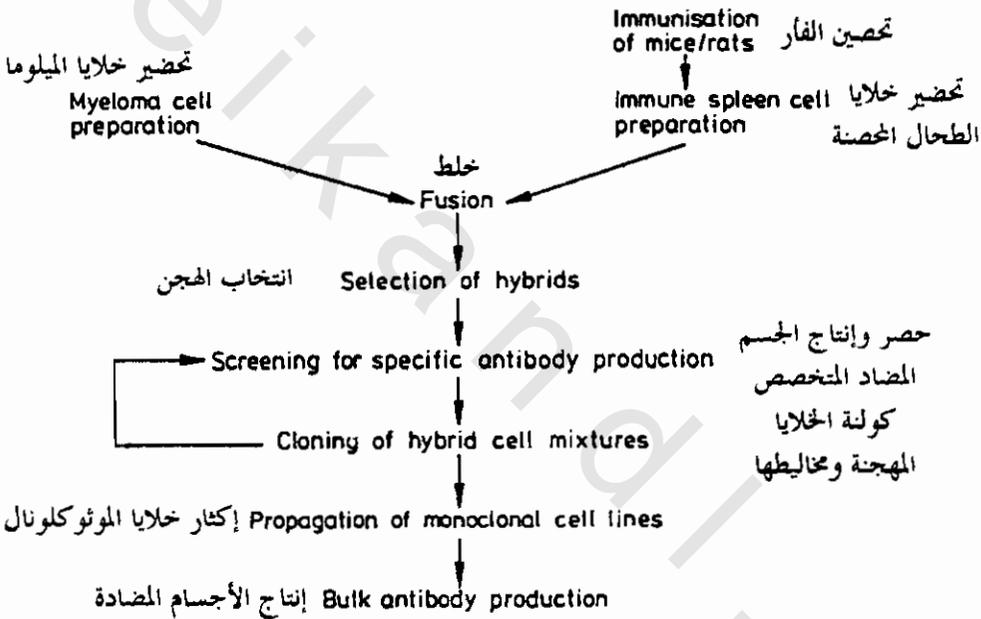


شكل (٧ - ٤) الأجسام المضادة المونوكلونال

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

الدليل العملي للأجسام المضادة المونوكلونال شكل (٧ - ٥)

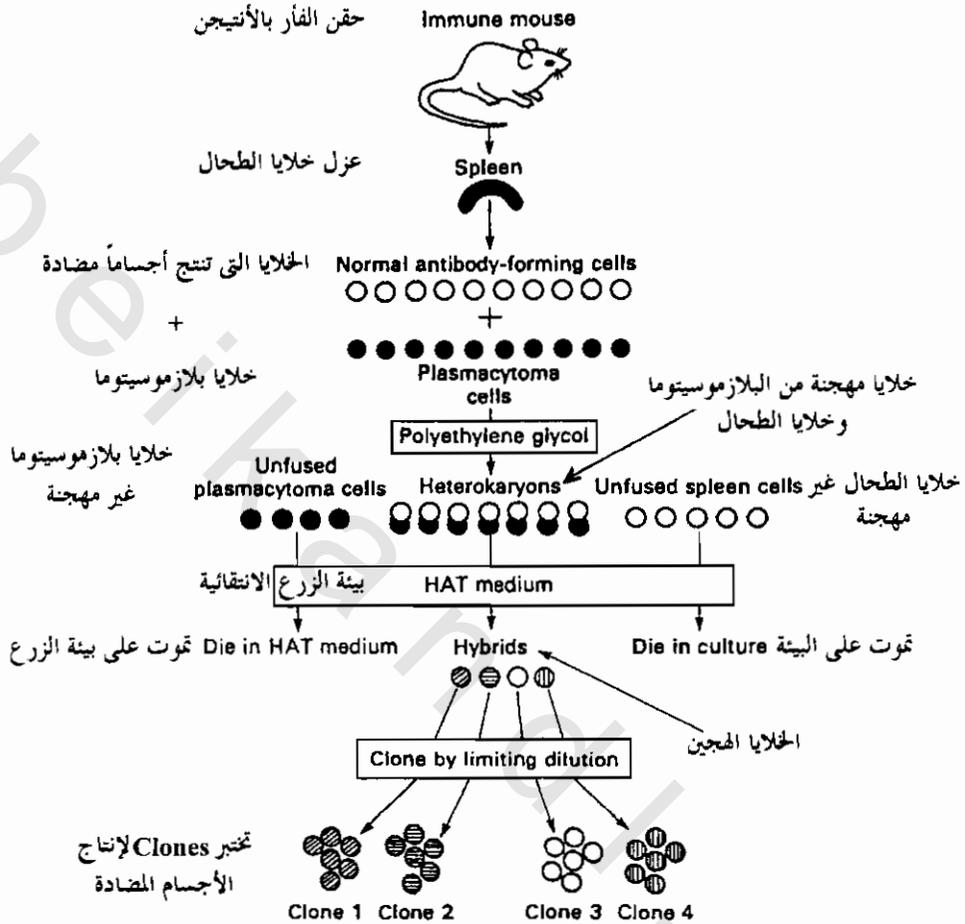
### A Practical Guide To Monoclonal Antibodies



شكل (٧ - ٥)

شكل (٧ - ٦) : الأجسام المضادة المونوكلونال : أساسيات والتطبيق

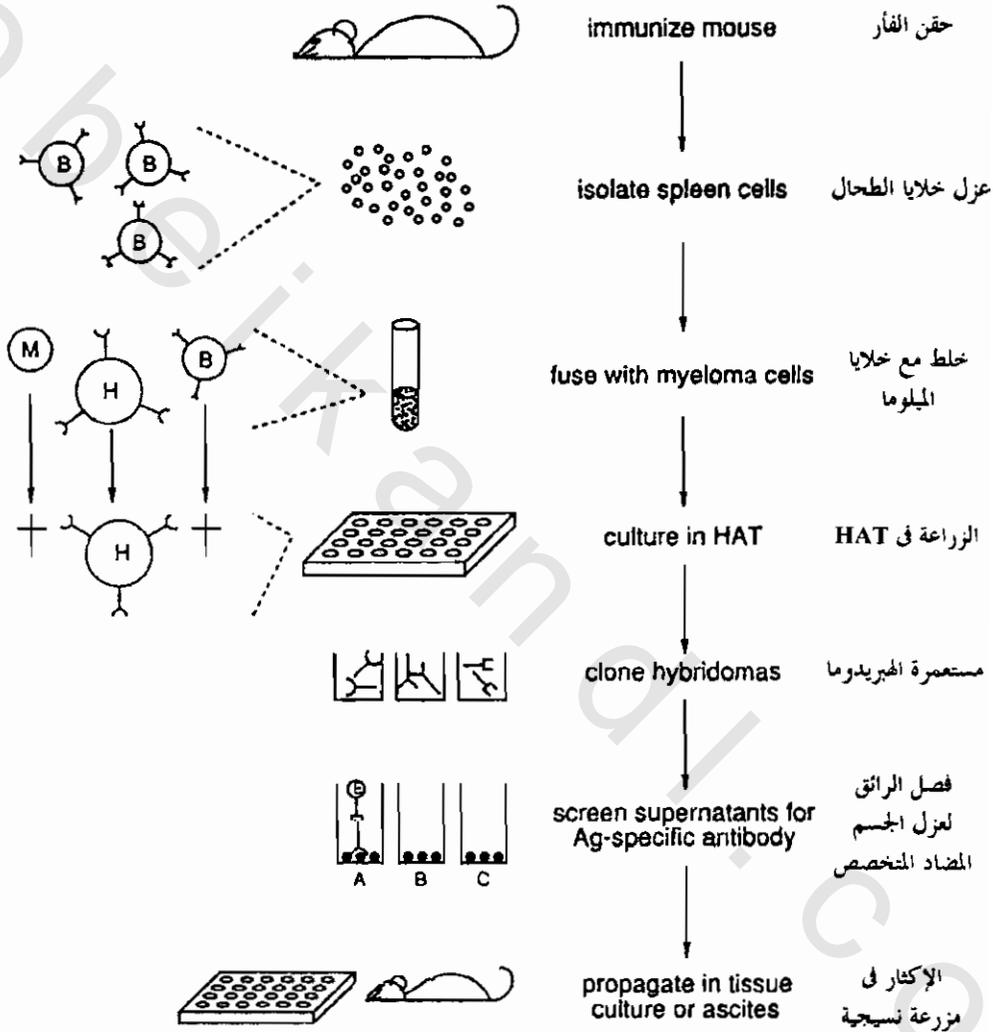
Monoclonal Antibodies: Principles and practice



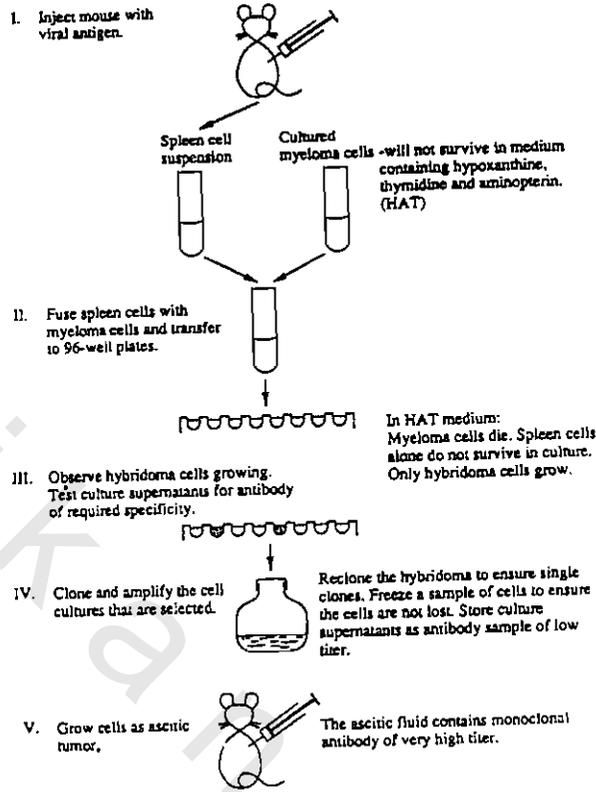
إنتاج الهيبوديرما. اندماج خلايا الطحال لفأر محصن مع HGPRT خلايا نيولوما (بلازما سيتوما) مستعملين بولي إيثيلين جليكول. اندماج منتجات البايينوكليت bi-nucleate تعرف باسم heterokaryons، وفي الانقسام التالي تنتشر النواة nuclei خلايا هجن التي تنمو في بيئة HAT. خلايا الميولوما غير المندمجة (المتداخلة unfused) الميتة في بيئة HAT وخلايا الطحال غير المندمجة يمكنها أن تعيش لمدة أيام قليلة في المزرعة. تختبر الهجن لإنتاج الأجسام المضادة ذات الميزات المرغوبة، وتكون بواسطة تخفيف محدود.

٢- إنتاج الأجسام المضادة المونوكلونال

2 Monoclonal Antibody Production



شكل (٧ - ١) الطرق العامة لإنتاج أجسام مضادة مونوكلونال في الفأر



شكل (٧ - ٧) ب

إنتاج الهيبوديرما. عندما يستحلب الأنتيجين (imulsified) في أديجفنت (adjuvant) مثل أديجفنت فروند (Freund)، والذي يستعمل بعد ذلك لتحصين فأر أو حيوان آخر. يحصن الفأر باستمرار بأنتيجين. ١ - ٢ أسبوع بعد التحصين الأساسي، وتعزل خلايا الطحال أو العقد الليمفاوية من الحيوان. ٣ - ٤ أيام بعد ذلك.

كما هو مبين في الرسم، فإن مسئولية الأنتيجين تكون بولي كلونال - خلايا ب B تتحلل؛ بحيث تربط الأنتيجين بواسطة تخصص مختلف قليلاً affinities، ونشاطات مضادة. (للتبسيط فإن تكوينات شكلها لا استعملت في هذا الرسم لتوضيح الأجسام المضادة. كل هذه الأجسام المضادة طبيعة لها سلسلتان ثقيلتان وسلسلتان خفيفتان

ومكانان لارتباط الانتيجين) 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 الهيبيوزانثين 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 الـ 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:

الفيروس والارانب يمكن حقنها بكميات قليلة من الانتيجين ( بين ١٠٠ ميكروجرام أو أقل ) ولو كان التحضير الفيروس ملوثاً ببعض مركبات العائل أو غيره من الفيروسات، فإنه يظل من الممكن اختبار ال MABs التي تتفاعل فقط مع الفيروس المطلوب.

### ٢ - أنها تعتبر طريقة قياسية: Standardization

حيث إن الاجسام المضادة MABs تعطى مركباً تفاعلياً واحداً الذي يمكن نشره في المعامل الأخرى، وبذلك يمكن التخلص من التضارب، الذي كان يحدث في الماضي عند استخدام الامصال ال Polyclonal. وبالإضافة إلى ذلك فإنه يمكن الحصول على كميات غير محدودة من الاجسام المضادة MABs عندما تتوفر الظروف المناسبة.

### ٣ - التخصص العالي: Specificity

تتحد الاجسام المضادة MABs فقط مع موقع أنتيجيني واحد فقط على سطح الانتيجين، ولذلك فإنها تتمتع بالتخصص العالي، وبذلك يمكن استخدامها كأداة فعالة في تمييز السلالات الفيروسية، كما أنه يمكن استخدام الاجسام المضادة MABs في دراسة بعض نواحي التركيب البنائي للفيروس، وكذا انتقاله بالحشرات.

### ٤ - التوافق العالي: High Affinity

إن عملية التصفية للكشف عن الاجسام المضادة MABs تؤدي إلى اختبار الاجسام المضادة التي تتمتع بخاصية ال High Affinity التوافق العالي مع الانتيجين. والاجسام المضادة التي تتمتع بهذه الخاصية يمكن استخدامها بتخفيضات عالية، كما أنه يمكن استخدامها في تنقية الفيروسات باستخدام طريقة affinity chromatography.

## عيوب الأجسام المضادة الفردية: MABs

### ١ - التحضير: Preparation

تتميز الامصال العديدة Polyclonal بسهولة تحضيرها. بينما تحتاج طريقة عزل الاجسام

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

#### ٢- التخصص : Specificity

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

## الفصل الثامن

### طرق تشخيص الفيروسات النباتية سيرولوجياً

#### Serological diagnosis of Plant Viruses

إن أساس الطرق السيرولوجية المستخدم في الكشف عن الفيروسات النباتية هو اتحاد أنتيجن الفيروس مع الأجسام المضادة له وتكوين راسباً مرئياً.

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

- ١ - اختبار التجمع Agglutination test
- ٢ - اختبارات الترسيب Precipitation test
- ٣ - اختبار الانتشار في الآجار Agar gel diffusion test
- ٤ - اختبار ربط العامل المذيب Complement fixation test
- ٥ - اختبار إبطال العدوى Neutralization of infection
- ٦ - اختبار الحساسية Anaphylaxis
- ٧ - اختبار المصل المرتبط بالإنزيم - Enzyme - linked Immuno - Sorbent assay (ELISA)
- ٨ - اختبار Dot - Blot
- ٩ - اختبار Westerm Blotting
- ١٠ - الميكروسكوب الإلكتروني للتحليل السيرولوجي SSEM

#### ١- اختبار التجمع : Agglutination test

وقد كان هذا الاختبار في الماضي شائعاً لسهولة إجرائه وإمكانية 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 بالفيروس على شريحة زجاجية، ثم تخلط مع نقطة من المصل المضاد للفيروس، ويقلب المخلوط فينتج عن ذلك راسب مرئى، يمكن ملاحظته بالعين المجردة فى خلال ثوان قليلة، ويساعد على رؤية الراسب تجمع الكلوروبلاستيدات عند اتحاد الفيروس مع الأجسام المضادة، ومن هنا اطلق على الاختبار اسم اختبار التجمع، وعموماً يطلق هذا الاسم؛ حينما يكون الأنتيجين الداخلى فى التفاعل خلية كاملة مثل البكتريا، وحيث يطلق على اتحاد الفيروس 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 الفيروس، أو الأجسام المضادة لإجراء اختبار التجمع .

#### ٢ - اختبارات الترسيب : Precipitation tests

الغالبية العظمى من الأنتيجينات عليها العديد من مناطق الالتحام، وهذا يعنى أن كل جزئى أو جسيمة فيروسية 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 الفيروس مع المصل المضاد له، يتم الالتقاء بين طرفى التفاعل ويتم الالتحام بينهما؛ أى إنه كل جسيم فيروسى تتحد مع عديد من الأجسام المضادة، وهذه بدورها تلتحم من مكان الالتحام الثانى بأنتيجين 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 والاجسام المضادة؛ حيث من الممكن أن يمتنع ظهور الراسب نتيجة لزيادة تركيز الأنتيجين عن حد معين، وكذا نتيجة لزيادة الأجسام المضادة في المصل المستخدم؛ ولذا فمن الضروري عمل المخلوط من تخفيفات مختلفة لكل منهما؛ حتى يمكن التأكد أن عدم ظهور الراسب لا يرجع الى زيادة أحد العنصرين.

وبالنسبة للفيروسات والامصال فإنه يوجد تخفيف لا يمكن للفيروس أو للمصل أن يعطى تفاعلاً عنده، ويطلق عليه بالنسبة للفيروس نقطة التخفيف النهائية *Dilution end point* ، وبالنسبة للمصل *Titre* ، كما أن وجود الأملاح ورقم الأس الأيدروجيني من العوامل التي تؤثر على دقة اختبار الترسيب؛ حيث ظهر من بعض التجارب، التي أجريت على فيروسات عصوية أن التغير في رقم الأس الأيدروجيني pH يؤثر أو يغير من درجة تجمع الجزيئات الفيروسية، الأمر الذي يؤثر بالتالي على سرعة الترسيب، وكذا على التخفيف المناسب لإجراء التفاعل؛ فعلى سبيل المثال وجد أن فيروس *TMV* عند تخفيف ١/١٢٨ يعطى راسباً مرئياً عند خلطه بالمصل المضاد، إذا كان رقم الـ pH ٧.

كما أن وجود الأملاح مهم للغاية لاختبار الترسيب؛ حيث وجد أن وجود الأملاح ضروري لظهور الراسب، ولذا يجرى تخفيف المواد الداخلة في التفاعل بمحلول ملحي فسيولوجي، كما أن الحرارة عامل من العوامل المهمة التي تؤثر على اختبار الترسيب؛ ولذا فإن الأنابيب التي تحتوي على الأنتيجين والمصل المضاد بعد خلطها جيداً توضع رأسياً في حمام مائي ذي درجة حرارة، يمكن التحكم فيها بواسطة ثرموستات، وتتوقف درجة الحرارة المستخدمة على مدى ثبات الفيروس. بالنسبة للفيروسات النباتية يمكن استخدام درجة حرارة ٥٠م، أما بالنسبة للفيروسات الأقل ثباتاً فتستخدم درجة حرارة أقل من ذلك ٣٧م، كما يراعى عند وضع الأنابيب في الحمام المائي أن يكون نصف محتواها مغموراً في الماء، إذ إن ذلك يسرع من الترسيب، كما أنه يسهل من مشاهدة الراسب في المراحل الأولى لتكونه.

وقد ذكر باودن وبيري *Bawden & Pirie* أن الفيروسات كروية الشكل، تعطى راسباً متماسكاً وحبیبياً بينما الفيروسات ذات الشكل العصوي تعطى راسباً هشاً ومتجمعاً،

ويمكن للفيروسات العسوية أن تعطي النتيجة نفسها (راسب حبيبي متماسك) إذا ما تم تقصير أو تكسير تلك العسويات، ويجرى ذلك بإجراء عملية تجמיד وإسالة لعدة مرات متتالية؛ مما يرفع من كفاءة التفاعل ونجاحه في حالة الفيروسات العسوية أو الحيطية.

ويستخدم اختبار الترسيب في الأنابيب، بالإضافة إلى تشخيص الفيروسات النباتية في معايرة كل من الفيروس والمصل المضاد، فعند معايرة الفيروس يوضع  $\frac{1}{2}$  نصف مم من الفيروس في سلسلة تخفيفات متضاعفة، ويخلط كل تخفيف من الفيروس مع  $\frac{1}{4}$  نصف مم من المصل المضاد ذي تركيز ثابت، والعكس يتم عند معايرة المصل المضاد؛ حيث يتم تخفيف المصل، بينما يظل تخفيف الفيروس ثابتاً. وللحصول على أفضل صورة لاختبار الترسيب، تعمل مخاليط لكل من الأنتيجين مع كل تخفيف من المصل المضاد، ثم يسجل الوقت اللازم لظهور الراسب في كل مخلوط، ويمكن التعبير عن هذه النتائج بخطوط كونتور بيانياً، يتضح منها المخاليط التي تظهر رواسبها في الوقت نفسه، كما يتضح منها أيضاً أن نسبة الخلط المثلى لكل تركيز مصل مضاد تكون مختلفة عن تلك الخاصة بالفيروس.

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

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

وفي سنة ١٩٦٥ قام فان سلوجترن van slogtem 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 خصيصاً 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 الانتيجين إلى المصل المضاد، ثم يختبر الراسب باستعمال الميكروسكوب، وتعتبر هذه الطريقة أكثر حساسية من اختبار الترسيب فى أنابيب، كما أنها تستخدم كميات صغيرة جداً من المواد المتفاعلة.

### ومن اختبارات الترسيب أيضاً اختبار الحلقة : Ring interface test

وهو اختبار بسيط حيث يتلاقى الانتيجين مع الجسم المضاد بواسطة الانتشار، ولإجراء هذا الاختبار يوضع قليل من المصل المضاد فى أنبوبة زجاجية ضيقة أو أنبوبة شعرية، وتوضع طبقة من تحضير الفيروس بعناية على القمة. تنتشر جزئيات الفيروس 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 الانتيجين، 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 الانتيجين والأجسام المضادة . وحدث تعديل لهذا الاختبار، وذلك بوضع المصل المضاد فى ثقب من الآجار فى طبق بترى، ثم تعمل ثقوب فى الآجار حوله، وملاها بتحضيرات الانتيجين، وفى هذه الحالة تتكون هالة من الراسب حول الثقب الأوسط، ويطلق على هذا الاختبار اسم الانتشار الإشعاعى Redial diffusion test ، وأكثر اختبارات الجليل شيوعاً فى الاستعمال هو اختبار (أوخترلونى)، والذى يطلق عليه two dimensional double diffusion test ، ويجرى هذا الاختبار

بصب الآجار الساخن أو محللول أجاروز على شريحة زجاجية أو طبق بترى ويترك ليبرد؛ ليكون طبقة من الجليل، ثم تعمل ثقب بعد ذلك فى الجليل وتملاً بالمواد المتفاعلة (الانتيجن والأجسام المضادة) وفى هذه الحالة عندما توضع الأمصال المضادة المختلفة المناسبة، وتحضير الفيرس فى ثقب 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 الانتيجينات بواسطة الأجسام المضادة لكل منها، وذلك بناء على معدل انتشار كل منها فى الآجار، أو على أساس معدل هجرة كل منها فى وسط كهربي Immuno electrophoresis ، أو بناء على هاتين الخاصتين مجتمعتين.

٢ - إجراء مقارنة مباشرة بين نوعين مختلفين من الانتيجينات، وذلك بوضعهما فى ثقبين متجاورين على الطبق نفسه، ومن المعتاد ان يوضع المصل فى الثقب الاول بينما توضع الانتيجينات فى ثقب تحيط بثقب الوسط، وتنتشر الانتيجينات والأجسام المضادة باتجاه بعضهما خلال الآجار جل، وبعد مضي بعض الوقت تتكون منطقة يلتقى بها شقاً التفاعل بنسب مناسبة لتكوين راسب، وينضم إلى المنطقة المزيد من الانتيجين والأجسام المضادة مما ينتج عنه بناء خط ترسيب واضح يمكن رؤيته، إلا أن 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 حالياً 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 الانتيجين مع الأجسام المضادة، فلو حدث هذا التفاعل بين الانتيجين 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 ال 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 دليلاً على وجود ال Complement حراً أو مرتبطاً ومن الممكن إزالة هذا ال Complement من المصل عن طريق تسخينه عند درجة حرارة ٥٦ م لمدة نصف ساعة. ولذا فإن إجراء اختبار ربط العامل المذيب لكرات الدم الحمراء يتم على مرحلتين: ففي المرحلة الأولى يخلط الانتيجين مع المصل المضاد له بدرجات تخفيف مختلفة، فى وجود العامل المذيب Complement لكرات الدم الحمراء، وتحتفظ هذه المخالط لمدة ساعة عند درجة حرارة ٣٧ م حتى يتم ربط العامل المذيب تماماً.

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

فإذا كان العامل المذيب Complement ارتبط تماماً فلا يحدث إذابة لكريات الدم الحمراء، وهذا معناه أنه قد حدث تفاعل بين الانتيجين 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 حراً، وبالتالي يدل على عدم حدوث تفاعل بين الانتيجين 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 أيضاً استخدامها فى التقدير الكمي، وترجع هذه الطريقة إلى الجهود التى قام بها Clark & Adams سنة ١٩٧٧

للكشف الدقيق والتقدير الكمي للفيروسات النباتية سيولوجيا .

وتعتمد هذه الطريقة على القياس اللوني الناتج من تفاعل الإنزيم المرتبط بالمصل المضاد المتخصص للفيروس، وعند تفاعله مع الفيروس الخاص به يعطى اللون الأصفر، وهذا اللون يرى بالعين المجردة، وكذا يمكن قياسه بجهاز القياس الضوئي على موجة طولها ٤٥ نانوميتر .

وفى هذه الطريقة يجهز المصل المضاد للفيروس فى صورة جاما جلوبيولين نقى، وكذا يرتبط جزء من المصل النقى بإنزيم Alkaline Phos phatase ، الذى يتفاعل بعد ذلك مع مادته المتخصصة p - Nitrophenyl phosphate ، ويجرى هذا التفاعل فى ال- 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 مناسباً لأغراض معينة، وهذه الطريقة مفيدة جداً، حينما يكون مطلوباً 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 للسلاطة، وهذا يعتبر مفيداً للتمييز بين سلالات الفيروس 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 فيروس يراد اختباره .

والطريقة غير المباشرة أى طريقة سانديتش الأجسام المضادة المزدوج فإن الإنزيم المستخدم فى الخطوة الأخيرة للكشف يكون مرتبطاً بأجسام مضادة، لانتجلوبيولين الدجاج المضاد للارانب يمكن استخدامه لربط الإنزيم، وعلى هذا الأساس فإن تحضيراً واحداً

للأنتجولوبيولين 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 مصبل 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 أطباق الاليزا، ثم الغسيل حوالى عشر مرات بالماء المقطر، ثم بال TTBS، وإعادة وضع التخفيفات نفسها من المصل المضاد للفيروس أو السيرم العادى ثم تكرار مراحل الإزالة السابقة نفسها .

### ٦ - طريقة : Immno Dot Blot

وفى هذه الطريقة تستخدم أغشية النيتروسيلولوز كبيئة صلبة لإجراء الاختبار . فى بعض الحالات فإن الفيروس 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 الفيروسي . والمراحل الأساسية للطريقة تنحصر فى فصل البروتين الفيروسي باستخدام دوديسيل الصوديوم سلفات وبولى اكريلاميد جيل اليكتروفوريس SDS - PAGE، ثم النقل الكهربى للبروتين من الجيل إلى

أغشية النيتروسيلولوز، ثم قص أغشية النيتروسيلولوز 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 الإلكتروني 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 الإلكتروني 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 الإلكتروني بطريقة الصبغ السالب.

وفى تعديل للطريقة السابقة، فإنه بعد التصاق الجسيمات الفيرسية على شبكة العينة تتم تغطيتها بالمصل المضاد المتخصص للفيرس، وهذا يؤدي الى إحاطة جسيمات الفيرس بهالة من جزئيات الاميونوجلوبولين، والتي يمكن رؤيتها باستخدام طريقة الصبغ السالب بالميكروسكوب الإلكتروني للاندماج المتخصص بين فيروس ما والأمينوجلوبولين.

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 الإلكتروني العادى.

كما أن تغطية الأغشية المبطنة للشبكة بالأجسام المضادة تقلل جداً من الجسيمات التي تنتمي للعائل النباتي من أن تعلق بها. كما أن هذه الطريقة تسمح باستخدام الأمصال كما هي وحتى الأمصال ذات التركيز المنخفض، كما أنها لا تستهلك كمية كبيرة من هذه الأمصال أو الأنثجين.

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

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