جامعة الدول العربية

المنظمة العربية للتنمية الزراعية

League of Arab States

Arab Organization For Agricultural Development

الدورة التدريبية القومية لتشخيص أمراض الحيوان الفيروسية والبكتيرية

جمهورية مصر العربية

القاهرة :19- 2000/11/24

الخرطوم

يناير (كانون ثان) 2001

جمهورية السودان ـ الخرطوم ـ العمارات شارع (7) St. No. (7) ـ Al ـ Amarat ـ Khartoum ـ الرمز البريدي Postal Code:11111 ـ تلكس : Telex:22554 AOAD SD ـ بريد إلكتروني : E.Mail: aoad@sudanmail.net

برقياً : أواد الخرطوم ـ Cable: AOAD Khartoum ـ فاكس : 471402 (249ـ11ـ) : Fax ـ تلفونات: 472183 ـ 472176 (249ـ11ـ) Telephones: ـ ص ب : P.O. Box: 174

الرقم الكودي AOAD/2001/RG-P/16-00975

جامعة الدول العربية

المنظمة العربية للتنمية الزراعية

League of Arab States

Arab Organization For Agricultural Development

الدورة التدريبية القومية لتشخيص أمراض الحيوان الفيروسية والبكتيرية

جمهورية مصر العربية

القاهرة: 19- 2000/11/24

الخرطوم

يناير (كانون ثان) 2001

جمهورية السودان - الخرطوم - العمارات شارع (7) Khartoum - Al - Amarat - St. No. (7) - الرمز البريدي Postal Code: 11111 - تلكس: Telex: 22554 AOAD SD - بريد إلكتروني: E.Mail: aoad @ sudanmail.net

برقيا: أواد الخرطوم - Cable: AOAD Khartoum - فاكس: Fax: (249-11) 471402 - تلفونات: Telephones: (249-11) 472176 - 472183 - ص.ب: P.O. Box: 474

التقديم

تقديـــم

يحتل قطاع الثروة الحيوانية أهمِّية خاصة ويُحظى بإهتمام كبير لدى الأقطار العربية إنطلاقاً من أهمِّيته الإقتصادية وإعتماد مُعظم السكان الزراعيين في المنطقة بشكلٍ أساسي على تربية الحيوان، كمصدر للدخل والعمل وأسلوب للحياة.

وعلى الرغم من هذه الأهمِّية التي ينطوي عليها قطاع الثروة الحيوانية والكم الهائل لأعدادها في الوطن العربي، إلا أنَّ ضعف الإنتاجية بسبب إعتماد هذا القطاع بصفة أساسية على النظام الرعوي التقليدي، حيث نُظُم تربية الحيوان مازالت دون المُستوى المطلوب وبحاجة إلى الإرتقاء بقدراتها والإرتفاع بمُعدَّلاتها، نتيجة لمجموعة من العوامل كالنقص الكمِّي والنوعي للموارد العلفية وضعف التراكيب الوراثية لسلالات الثروة الحيوانية المحلِّية. هذا إلى جانب أمراض الحيوان – الوافدة والمُستوطنة – وبخاصة الأمراض الفيروسية والبكتيرية، التي أثَّرت وقد يزيد تأثيرها مُستقبلاً – على نحوٍ مُباشرٍ – في النفوق ومُعدَّل الولادات والإستبدال والنمو والنضج الجنسي وضعف الإخصاب وغيرها من المُؤثِّرات والإنعكاسات السلبية الأُخرى على صحة الحيوان، والتي قد تنعكس في أحيان كثيرة على صحة الإنسان والبيئة العامة المُحيطة به.

ومن الأهمِّية بمكان أنَّ تحتل رعاية الثروة الحيوانية والحفاظ عليها من الأمراض الوافدة والمُستوطنة، مساحة كبيرة في خطط وإستراتيجيات تنمية هذه الثروة في الوطن العربي. ولقد قامت المُنظَّمة العربية للتنمية الزراعية بإجراء العديد من الدراسات حول أمراض وصحة الحيوان، حيث أشارت نتائج دراساتها التي أجرتها في هذا المجال – كالدراسة القومية لأمراض الحيوان في الوطن العربي، ودراسة وضع المُختبرات البيطرية، ودراسة حصر قوانين ولوائح الحجر البيطري في الدول العربية، ودراسة إنتاج اللقاحات البيطرية وغيرها من الدراسات – إلى ضرورة العمل على مُكافحة الأمراض ومُراعاة شروط الحجر البيطري والسلامة العالمية للإنسان والحيوان، وتلافي دخول الأمراض الوافدة غير المعروفة في المنطقة العربية.

وإستمراراً لجهودها المبذولة في هذا المجال، أدرجت المُنظَّمة العربية للتنمية الزراعية في خطة عملها لعام 2000، مشروعاً قومياً لنشر التقانات الحديثة في مجال تشخيص

أمراض الحيوان الفيروسية والبكتيرية، ويتم تنفيذ هذا المشروع على مرحلتين – تتمثل المرحلة الأولى في إعداد دراسة قومية شاملة حول التقانات الحديثة المُستخدمة على المُستوى العالمي في مجال تشخيص الأمراض الحيوانية البكتيرية والفيروسية والتحقُّق من مُلاءمتها للظروف المحلِّية ودراسة إمكانية إستخدامها في المنطقة العربية، فيما تتمثل المرحلة الثانية من مراحل تنفيذ ذلك المشروع القومي الهام في عقد هذه الدورة التدريبية القومية.

والمنظمة إذ تقدم مادة هذه الدورة للباحثين والدارسين العرب ، تأمل أن يجدوا فيها مايحتاجونه من المعارف التطبيقية في هذا المجال الحيوي الهام .

والله نسأل التوفيق ،،

المدير العام

الدكتور يحيي بكور

المحتويات

المحتويات

صفحة

التقديم	أ
المحتويات	ج
1- التشخيص المجهري الفيروسي (الميكروسكوب الفلورسنتي - الميكروسكوب الالكتروني - دكتورة سامية عبدالله عطية عياد	1
2- عزل الميكروبات بواسطة حيوانات المعمل - أ. د. محمد حسن خضير احمد	10
3- الزراعة في الانسجة الحية للفيروسات - أ. د. محمد احمد معاذ	21
4- التشخيص المجهري الفيروسي - دكتورة سامية عبدالله عطية	24
5- إستخدام الصبغات المختلفة في التعرف على التأثير المرضي للفيروسات في المزارع النسيجية - دكتور احمد حسين مصطفى	26
6- التشخيص المجهري البكتيري - أ. د. ساهر مكين جرجس	32
9- إستخدام المجهر في بعض الإختبارات الفيروسية - أ. د. عادل محمد حسن عزب	44
10- إختبارات التعادل Neutralization test - أ.. د. عزيز ميخائيل إسحق	53
11- إختبار سلسلة التفاعل على البلمرة - دكتور حسام جمال الدين إسماعيل	56
12- إختبار التعادل المصلي - دكتورة سميرة سعيد طه	58
13- إنتاج مسابر (كواشف) للاحماض النووية - دكتور علاء الخولي	61
14- تحميل الجينات على حوامل لاستخدامها في إنتاج مستحضرات تشخيصية في الاختبارات المعملية - د. سهام عبدالرشيد الزيدي	65
15- إنتاج الاجسام المناعية وحيدة النوع والصفة - أ. د. رقية محمد عثمان	74
16- إختبار المكمل المثبت - أ. د. سميرة عبدالسلام الكيلاني	90
17- الطرق المختلفة لعزل الفيروسات على البيض المخصب - أ. د. فكرية البرديني	96
18- إستخدام تقانة الاليزا - أ. د. سعاد محمد سليمان	105
19- الإختبارات المصلية المستخدمة في تشخيص الامراض البكتيرية والفيروسية - إختبار التراص Agglutination test - أ. د. مجدي محفوظ عوض	108
20- إختباري التلازن الدموي ومنع التلازن الدموي - أ. د. سلوى الاصيلي	117
21- إختبارات الحساسية لتشخيص بعض الامراض الجرثومية - أ. د. دانيال جندي ميخائيل	121
22- إختبار الجونين - أ. د. رأفت عزمي ديمتري	129
- كلمات الافتتاح	130
- أسماء المشاركين	131

التشخيص المجهري الفيروسي
(الميكروسكوب الفلورسنتي
الميكروسكوب الإلكتروني

التشخيص المجهري الفيروسي
(الميكروسكوب الفلورسنتي - الميكروسكوب الإلكتروني)

إعداد
د. سامية عبدالله عطية عياد
باحث أول
قسم بحوث الطاعون البقري – مركز البحوث الزراعية
جمهورية مصر العربية

أ- الميكروسكوب الإلكتروني :

مقدمة :

- استخدام الميكروسكوب الالكتروني في الدراسات الفيروسية ليس بحديث العهد. فقد كان ذلك منذ حوالى 50 عاماً.
- لجأ العلماء لهذا الميكروسكوب من أجل تحديد وجود فيروس معين في عينة تحت الفحص من عدمه. وذلك مهما كان تركيز هذا الفيروس حتي لو كان فيروس واحد فقط. ويعتبر تحديد وجود هذا الفيروس بمثابة تشخيص لاجدال فيه، وتحديد نهائي لاصابة كائن معين بحرص معين. خاصة مع موجود أصابة فيروسية يصعب عزل المسبب المرضي لها على المزارع النسيجية التقليدية.
- لجأ العلماء كذلك لهذا الميكروسكوب في إجراء دراسات مستفيضة عن تركيب الفيروسات المختلفة مهما كانت متناهية في الصغر (10 ميكرون مثلا) وذلك للقوة البكتيرية الهائلة له، مما كان له أكبر الاثر في التفاعل مع هذه الفيروسات بصورة أكثر دقة مكنت العالم من انتاج لقاحات عديدة كان لها أكبر الاثر في التغلب على كثير من الامراض الفيروسية.
- أضافة أجسام مضادة معينة للعينة تحت الفحص ساعد كثيرا في تركيز عدد الفيروسات في العينة كما أنها تحديد لهوية هذا الفيروس أي أنها وسيلة للتعرف

عليه، كما هو الحال في تحديد فيروس الروتا – والانتجين السطحي لفيروس التهاب الكبد الوبائي (B) من عينة سيرم لمريض تحت الفحص.

تطوير العمل :

– في البداية كان الفحص الإكلينيكي للعينات يستغرق الكثير من الوقت كما كان شاقا جدا ومكلف . ولكن حاليا أدخلت عليه بعض التعديلات جعلت منه أقل تكلفة ومجهوداً وجعلت منه اختياراً ضرورياً في بعض حالات التشخيص التي يصعب فيها عملية زراعة وتنمية الفيروسات على أنواع المزارع النسيجية كما ذكرنا من قبل.

لماذا سمي بالميكروسكوب الإلكتروني ؟

لأننا نستخدم فيه شعاع مكثف من الإلكترونات لها خاصية المرور من الكثافة الإلكترونية المنخفضة للفيروسات ولا يمر من الكثافة الإلكترونية العالية للوسط المحيط والذي غالبا ما يستخدم فيها أيونات لمعادن ثقيلة سنتحدث عنها فيما بعد.

تركيب مبسط للميكروسكوب الإلكتروني :

(أنظر الشكل 1).

طريقة التشغيل :

* هناك طريقتان أساسيتان :

– Negative Staining أو الصبغة السلبية.

– The thin Sectioning of Virus infected cells أو المقاطع الرقيقة للخلايا المصابة بالفيروسات.

والأن بشيء من التفصيل :

1– طريقة الصبغة السلبية Negative stain :

– هي أسرع وأبسط طريقة لتحديد والتعرف على الفيروسات .

– تستخدم فيها أملاح لمعادن ثقيلة وذلك لإحداث Contrast أو تضاد بين الفيروس والوسط المحيط.

الخطوات :

1- أخلط حجمان متساويات من العينة المفروض أنها تحتوى على الفيروس ومحلول ملحي لأحد المعادن الثقيلة مثل 2٪-4٪ Potassium phospho-tungstate acid (PTA) أو 1/2٪ Uranylacetate .

2- أغمس ماسبق في جار يحتوى على 2٪ PTA (ما سيحدث هو أن الفيروس المغطى بالغشاء المكون من Formvar سوف يطفو فوق سطح PTA مما يسهل عملية تخلل الصبغة الي داخل العينة.

3- ضع grid الخاص بالميكروسكوب الالكتروني فوق الغشاء.

4- التقط الـ grid بواسطة الأنبوبة المعدنية. الان العينة جاهزة للفحص الميكروسكوبي.

(أنظر شكل 2).

(ب) Agar Diffusion - Fithatun method :

الخطوات :

1- ضع مكعب من الآجار 1-2٪ على شريحة ميكروسكوب عادية ثم أضف نقطة صغيرة من المحلول المحتوى على الفيروس.

2- ضع 1-2 Electron Microscop (شبكة معدنية مغطاة بالكربون والـ Grids فوق العينة تحت الفحص والتي حقنت قبلها فوق مكعب الآجار، أقلب رأسا على عقب ثم أترك حتي يتخلل السائل داخل الآجار ثم يجف.

3- المحلول المركز حاليا يحتوى على الفيروس وأصبح ملتصق بالـ E.M.grid التقط هذا الـ grid وما يلتصق بها ثم ضعها للصبغة في 2٪ PTA لمدة 1-2 دقيقة، ثم بإزالة الزيادة في الصبغة ثم أفحص الميكروسكوب الإلكتروني. (أنظر شكل 3).

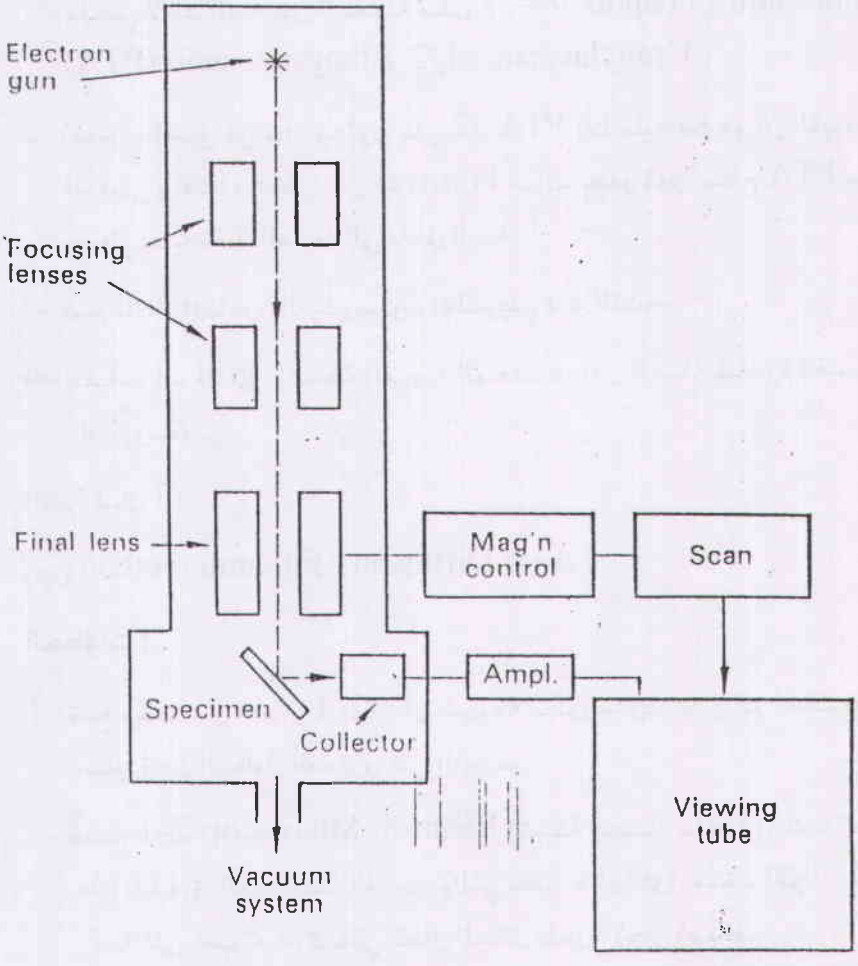

Electron gun
Focusing lenses
Final lens
Mag'n control
Scan
Ampl.
Specimen
Collector
Viewing tube
Vacuum system

Fig. (1)

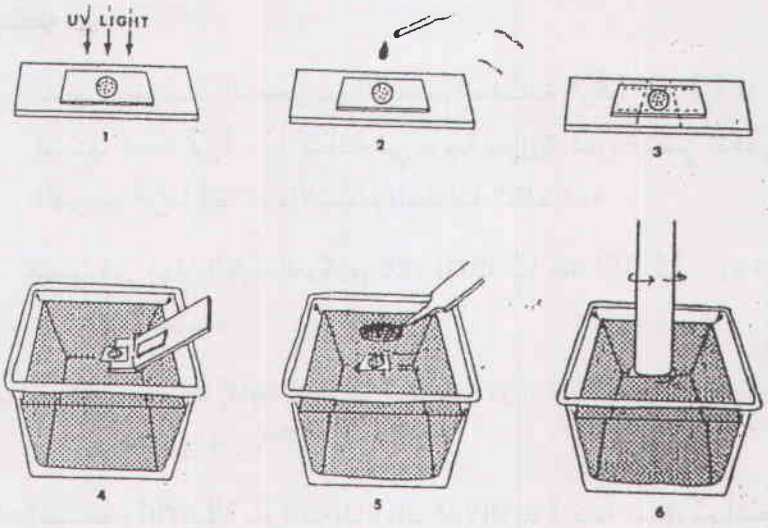


Figure 2. Scheme for pseudoreplica method for preparing specimen for EM examination.

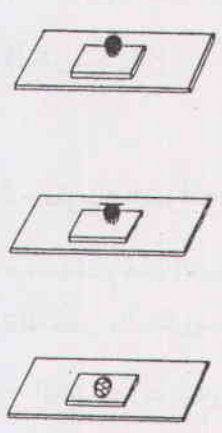


Figure 3. Scheme for agar-diffusion-filtration method for preparing specimen for EM examination.

(ج) Immunoelectron microscopy (IEM) :

هذه الطريقة بالاضافة الى أنهاتركز الفيروسات في العينة المراد فحصها فهي أيضا تستخدم للتشخيص السريع للفيروس الموجود وذلك باستخدام.

الخطوات :

1- أخلط العينة تحت الفحص مع الاجسام المضادة بتركيز 1 : 10 أو 1 : 100 أتركها لمدة 1/2 - 1 ساعة في درجة حرارة الغرفة حتي تتكون اتحادية الفيروس - إذا وجد - والاجسام المضادة الخاصة به.

2- ضعها في جهاز الطرد المركزي Centrifuge عند 15000 دورة في الدقيقة لمدة 1/2 ساعة.

3- خذ الراسب وأعد إذابته في كمية قليلة جدا من الماء المقطر ثم خذ نقطة منه مع نقطة مماثلة من 4٪ PTA .

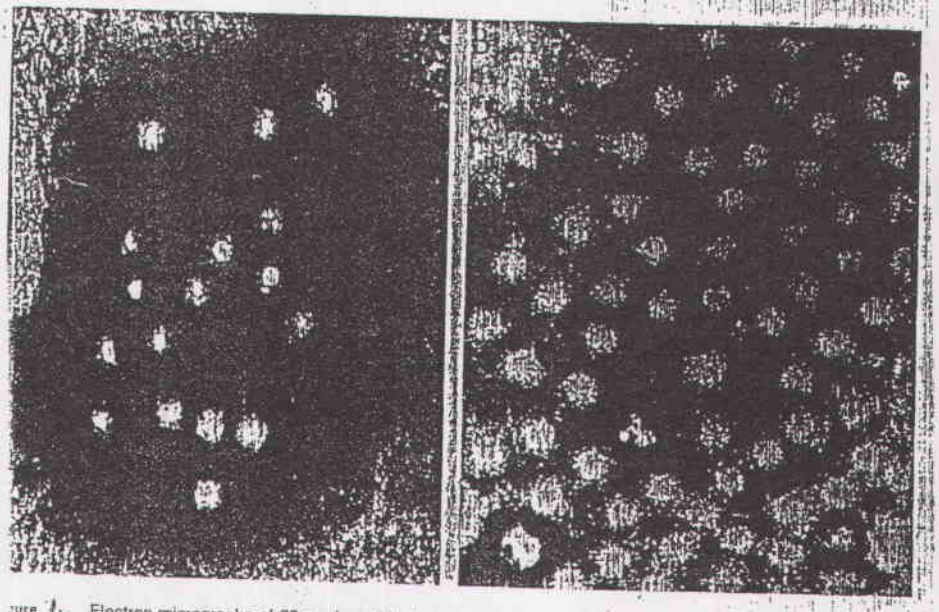
4- إستخدم E.M.grid المغطاة بالـ Farmvar كما سبق ثم أفحص تحت الميكروسكوب.

(أنظر شكل 4) .

2- طريقة الشرائح الرقيقة The-sectioning method :

* تستخدم هذه الطريقة لتحضير شرائح ثابتة من الخلايا أو الانسجة المصابة تكون جاهزة للفحص بالميكروسكوب الإلكتروني وذلك بغرض :

- اكتشاف وجود فيروس معين.
- التفاعل أو العلاقة أو التداخل الفيروسي والخلية.
- تحديد أماكن تكاثر الفيروسات.
- تحديد أي طفرة قد تحدث في الخلايا المصابة.



ure 4 Electron micrographs of 27-nm hepatitis A virus (HAV). *A:* HAV particles not treated with antibody, demonsting the presence of corelike structures (222,000 ×). *B:* HAV particles aggregated with antibody (222,000 ×). Note the sence of an antibody "halo" around each particle. (Bradley, Hornbeck, & Maynard.)

الخطوات :

1- تثبت الانسجة المصابة بواسطة glutaraldehyde ٪2 وذلك لمدة ساعة عند درجة 4م ثم تكحت الانسجة ويتم ترسيبها بواسطة جهاز الطرد المركزي . يتم تجميع هذه الانسجة في مكعبات حيث يتم تقطيعها الى قطع صغيرة جدا 1مم3 ثم تغسل بواسطة Coco dylate buffer .

2- التثبيت يتم بوضع الانسجة في Osmium collidion ٪1.33 لمدة 4 ساعات عند 4م.

3- أصبغ بواسطة uranyl acetate ٪1/2 لمدة 4 ساعات عند 4م.

4- أسحب الماء بواسطة الكحول الاثيلي بالتركيزات الآتية :

50٪، 70٪، 80٪، 90٪، 100٪ 3 مرات لكل تركيز.

5- أضف محلول Epon حديث التحضير ثم أتركها ساعة واحدة في درجة حرارة الغرفة ثم ضعها في Epon-filled Beam capsule وذلك لحدوث عملية البلمرة Polymerization لمدة 48 ساعة عند 60م.

6- أزل الزيادات من Epon وذلك لسرعة الوصول للعينة.

7- قم بتقطيع العينة الى شرائح رقيقة جدا وذلك بواسطة الماظة Diamond Knives .

8- توضع الشرائح على Em. grid ثم أصبغها كما سبق وأفحص تحت الميكروسكوب. (أنظر شكل 5) .

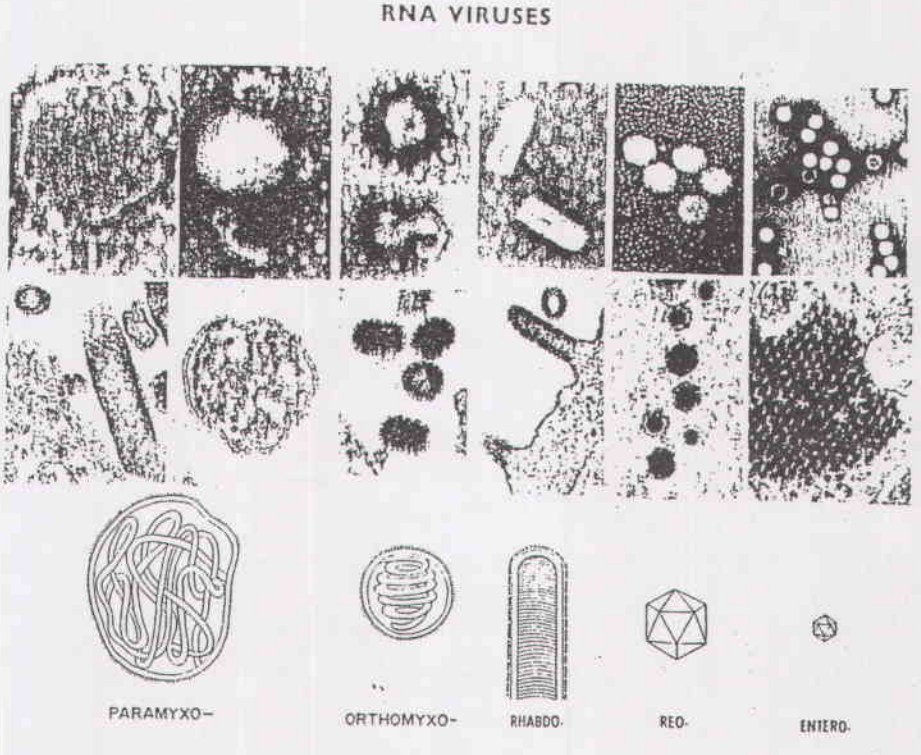


Figure 5 Relative size and shape of RNA viruses as revealed in negatively stained preparations (top row), in thin-sectioned cells (middle row), and as compared with schematic diagrams (bottom row) (G. D. Hsiung et al., *Prog. Med. Virology* 25: 155, 1979).

عزل الميكروبات
بواسطة
حيوانات المعمل

عزل الميكروبات بواسطة حيوانات المعمل

إعداد
أ. د. / محمد حسن خضير أحمد
رئيس بحوث بمعهد بحوث الأمصال واللقاحات البيطرية
العباسية – القاهرة

مقدمة :

إن الغالبية العظمى من البحوث الطبية تعتمد على الحيوانات مشتملة الصغير منها والكبير. ولقد كانت حيوانات التجارب مهملة في الماضي ولكنها تعتبر الآن من الفصائل ذات الأهمية الكبرى.

وللحصول علي حيوانات تجارب نقية الفصيلة وخالية من الامراض يجب الإهتمام بطرق إختيار السلالات الجيدة وطرق التربية والعناية بها. هذا ويمكن تقسيم حيوانات التجارب من حيث الحجم إلى :

1- حيوانات صغيرة وتشمل : الفأر الابيض الصغير والفأر الابيض الكبير والأرنب الهندي والارنب المستأنس واليربوع والدجاج والحمام والأوز.

2- حيوانات كبيرة وتشمل : الخيل والأبقار والاغنام والقرود والكلاب والقطط.

أما عن إستخدامات حيوانات التجارب فنجد أنها تشمل :

1- التطبيقات الطبية للتشخيص وإثبات أو نفي الحمل ومعايرة اللقاحات والامصال.

2- البحوث الفسيولوجية والدوائيه والميكروبيه.

3- بحوث الفضاء.

عزل الميكروبات بواسطة حيوانات المعمل :

هناك الكثير من الامور الهامة التي يجب التحدث عنها قبل الحديث عن عزل الميكروبات.

أولا : الحالة الصحية للعاملين في هذا المجال :

1- يجب العمل والحرص على عدم إنتقال العدوي من الحيوان الي المتعامل معه والعكس وذلك بمراعاة إتباع النواحي الصحية العامة والخاصة.

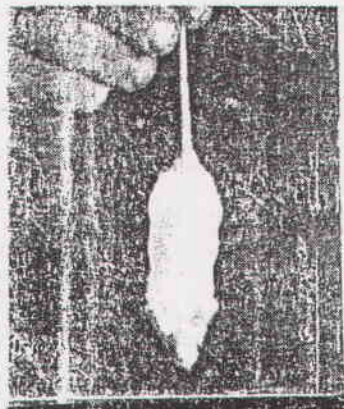
2- يجب أن يكون المتعامل مع حيوانات المعمل قوى الملاحظة حتي يرقب المريض أو المصاب منها وإستبعاده.

3- يجب الكشف الدوري على العاملين (خاصة الصدر والجلد والعيون).

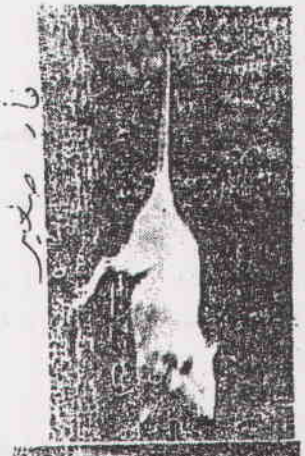
4- يجب تحصين العاملين باللقاحات المناسبة حسب الامراض التي يتعرضون لها مثل الكلب والسل والجدري والتيتانوس وحمى الوادي المتصدع.

ثانيا : طرق التعامل والإمساك ببعض حيوانات المعمل :

يجب أن تعامل حيوانات المعمل بالرحمة والشفقة في مسكنها أو عند نقلها من مكان لآخر حتي عند التخلص منها يجب أن يكون قتلها بطريقة رحيمة تتفق مع نوع وحجم وعدد الحيوانات ثم التخلص من جثثها بطريقة صحية وأمنة، ولكل حيوان طريقة الإمساك به بحيث لاتضر به ولا تعرض الممسك به للعقر أو الخدش بالأظافر كما هو موضح في الصور التالية.



طريقة مسك بعض الحيوانات المعملية



ثالثا : بعض النصائح الخاصة بمختبرات الميكروبات :

1- يمنع دخول كل من ليس له علاقة بالمختبر.

2- يمنع منعاً باتاً الأكل والشرب والتدخين.

3- إرتداء معاطف بيضاء نظيفة تعقم بإستمرار.

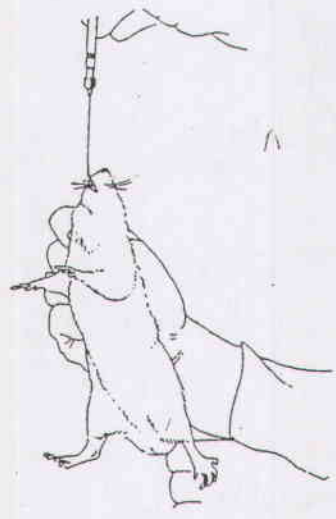
4- عدم فتح أي مزرعة ميكروبية منعا للتلوث إلا بمعرفة المختص.

5- في حالة وجود جروح بالأيدى أو الوجه يمنع التعامل مع الميكروبات حتي تمام الإلتئام.

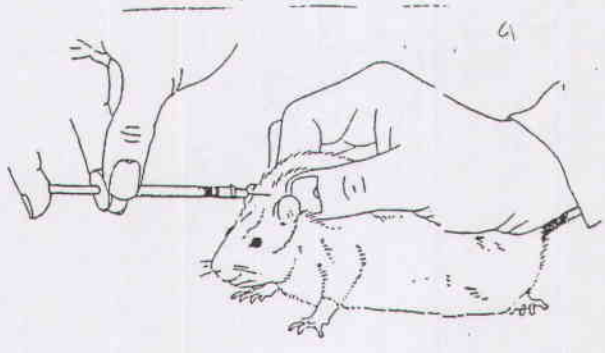
6- يجب تنظيم وتنظيف المختبر وتعقيمه بصفة دورية وخاصة بعد كل تعامل مع الميكروبات.

رابعا : بعض طرق الحقن في حيوانات المعمل لعزل بعض الميكروبات :

هناك طرق مختلفة للحقن في حيوانات التجارب تتناسب الى حد كبير مع نوع الميكروب المختبر والمراد التعرف عليه والتأكد من هويته كما أن نوع وحجم الإبرة المستخدمة في الحقن يختلف طبقا لطريقة الحقن وحجم الحيوان الذي يراد حقنه كما هو موضح بالصور .

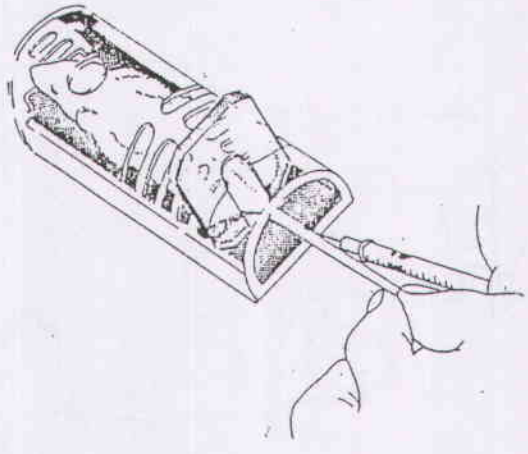


الحقن عن طريق الفم فى الفأر

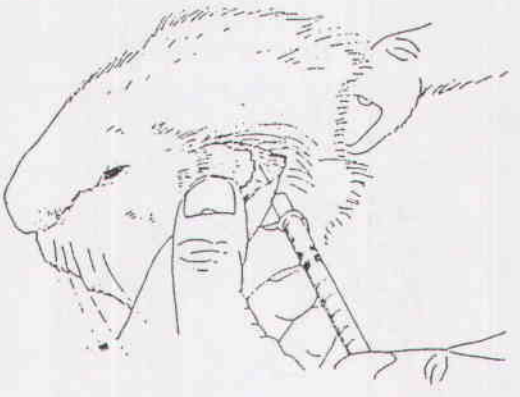


الحقن تحت الجلد فى الفأر

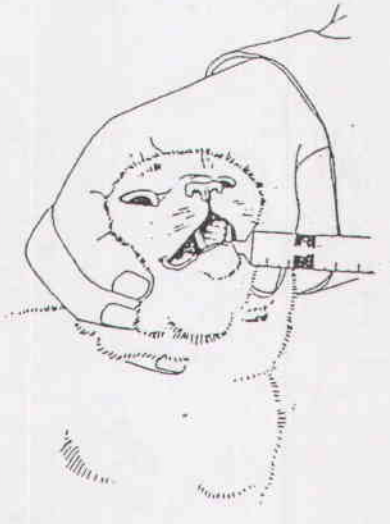
الحقن فى العضل فى الفأر



الحقن فى الوريد فى الفأر

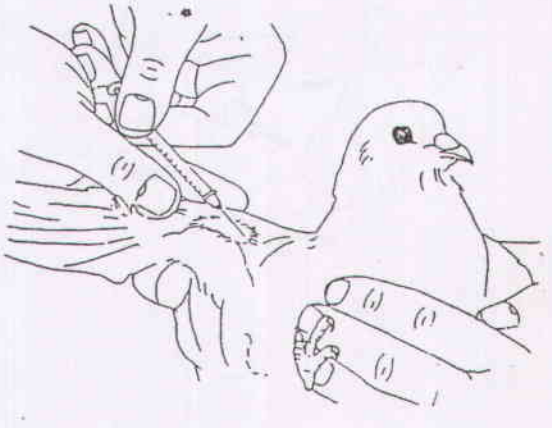


الحقن فى الوريد فى الأرنب الهندى



الحقن عن طريق الفم فى القط

الحقن بتجويف البطن بالقط



الحقن بالوريد فى الحمام

حقن بعض الفيروسات في حيوانات المعمل وطرق حقنها

الحيوان	الفيروس	طريقة الحقن	ملاحظات
فأر أبيض صغير	داء الكلب – طاعون الخيل – حمي الوادي المتصدع – حمي الثلاثة أيام	في المخ	أغراض عصبية شلل – نفوق
	الانفلونزا وفيروسات الالتهاب الرئوية	عن طريق الأنف	أعراض تنفسية
	أية مادة فيروسية	وريد – عضل – تحت الجلد	تكون أجسام مناعية
الأرنب الهندي (خنزير غينيا)	الحمى القلاعية	الجلد	تكون بثرة في مكان الحقن بعد 24 ساعة
الأرنب المستأنس	فاريولا والفاكسينيا وفيروسات الجدري	بالجلد	أعراض الجدري
	الهربس – الكلب – الكلب الكاذب	بالمخ أو تحت الجلد	أعراض عصبية
العرسة	الفيروسات التنفسية وديستمبر الكلاب (حصبة الكلاب)	بالانف أو بالمخ	أعراض تنفسية وعصبية
اليربوع	داء الكلب وحمى الوادي المتصدع	بالمخ	أعراض عصبية
	جدري الجمال	بالجلد	بثرات ودمامل صديدية
الدجاج	إلتهاب المخ في الخيل	بالمخ في كتاكيت سن يوم	أعراض عصبية
	النيوكاسل وإلتهاب الحنجرة والقصبة الهوائية	بالانف	أعراض تنفسية
	الجدري	بالجلد	بثرات

إستخدام حيوانات المعمل في تشخيص بعض الامراض البكتيرية

إسم الميكروب	الحيوان	طريقة الحقن	ملاحظات
الدرن البشري والبقري	أرنب هندي وأرنب مستأنس	تحت الجلد	نفوق بعد 4–6 أسابيع
الدرن الدجاجي	الدجاج	تحت الجلد	نفوق بعد 4–6 أسابيع
البروسيلا أبورتس	الأرنب الهندي	تحت الجلد أو في تجويف البطن	إلتهاب الخصيتين بعد 4 أسابيع
كوريني أوفيس	الارنب الهندي	تجويف البطن	التهاب الغشاء البريتوني والتهاب الخصيتين مع صديد متجبن
سودوموناس مالي (جلاندرز)	الارنب الهندي	تجويف البطن	التهاب الخصيتين (تفاعل ستراوس)
سودوموناس أورجينوزا	الارنب الهندي	تجويف البطن	التهاب الخصيتين
الميكروب العنقودي الذهبي	فأر أبيض صغير – أرانب	تجويف البطن أو بالجلد	بعد 2–24 ساعة وتتكرز بمكان الحقن
نيمو كوكاي	فأر أبيض صغير	تجويف البطن	نفوق بعد 18–24 ساعة
لبتوسبيرا إكتيروهيموراجيكا	اليربوع والارنب الهندي	تجويف البطن	نفوق بعد 4–10 ساعات مع صفراء
كامبيلوباكتر فيتس (فيبروفيتس)	عجلة صغيرة	في المهبل	تتكاثر مع ظهور الميكروب في مسحات مهبلية
باستريلا ملتوسيدا	الأرنب – فأر أبيض صغير	تجويف البطن	نفوق بعد 18–24 ساعة
باسيلس أنسرس (الحمى الفحمية)	الارنب الهندي – فأر أبيض صغير	تجويف البطن	نفوق بعد 24–48 ساعة
ليستريا مونوسيتوزين	الارانب والارانب الهندي	بالفم أو تجويف البطن	نفوق مع تنكرز الكبد وإجهاض
كلوستريديم تيتاناي (التيتانوس)	فأر أبيض صغير	تجويف البطن	نفوق بعد 18–24 ساعة بعد ظهور أعراض عصبية وتشنجات وتصلب الذيل

المراجع :

1- تربية ورعاية حيوانات التجارب – الطبعة الرابعة سنة 1978 – تأليف السيد عبدالوهاب سيد احمد.

2- التشخيص الفيروسي (كتاب معملي) سنة 1991 – تأليف أ.د. محمد عبدالحميد شلبي (أستاذ الفيروسات والمناعة) – أ.د. احمد السنوسي (أستاذ مساعد الفيروسات) – كلية الطب البيطري – جامعة القاهرة.

3- ملاحظات عملية في الميكروبيولوجيا – قسم الميكروبيولوجيا – كلية الطب البيطري – جامعة القاهرة .

بحث عن
الزراعة في الانسجة الحية للفيروسات

الزراعة في الأنسجة الحية للفيروسات

إعداد
أ. د. / محمد أحمد معاذ
(رئيس بحوث متفرغ)

نبذة تاريخية :

- بدأ إستخدام التزريع الخلوي على نطاق واسع في الدراسات الفيرولوجيه إعتبارا من أواخر الاربعينات - وقد إستهل «إندرز» Enders ومعاونوه هذه الحقبة عام 1949 عندما لاحظوا أنه يمكن لفيروس شلل الاطفال أن ينمو في تزريع خلوي من أنسجة خلوية ليس بالضرورة أن يكون من أنسجة عصبية - وبذلك انتفى الاعتقاد الذي كان سائدا من أنه لابد وأن يكون التزريع الخلوي اللازم لنمو هذا الفيروس محضرا من أنسجة عصبية نظرا لطبيعة هذا الفيروس شديدة الخصوصية المتعلقة بالانسجة العصبية عند نموه طبيعيا (In-vivo) وقد أصبح من المعلوم حاليا أنه يمكن لفيروسات عديدة تصيب الانسان - أن تنمو في مزارع خلوية محضرة من أنسجة متباينة من أصل آدمي أو قردي - إلا أن فيروس شلل الاطفال بالذات هو أحد أمثلة الفيروسات التي يمكن لها أن تنمو في نطاق ضيق نسبيا من أنواع المزارع الخلوية. وذلك بعكس بعض الفيروسات التي يمكن تنميتها في مزارع خلوية محضرة من مصادر شديدة التباين - مثل فيروس الفاكسينيا الذي يمكن له أن ينمو في مزارع خلوية من أنسجة أجنة بيض الدجاج. وقد كانت هذه المزارع الخلوية المحضرة من أنسجة أجنة بيض الدجاج من أول المزارع التي إستخدمت في إجراء الدراسات الفيرولوجية في بدايات حقبة إستخدام الزرع النسيجي في هذه الدراسات - غير أن الانواع السائد استخدامها حاليا تحضر غالبا من كلي القرد وكلي حيوانات أخرى مثل الابقار والاغنام.

- ويستخدم حاليا وعلى نطاق واسع التزريع الخلوي المتميز باستمرارية النمو cell lines وذلك في إجراء الدراسات الفيرولوجية المختلفة من أعمال تشخيص الامراض بفصل الفيروسات السببية ، وفي إنتاج اللقاحات الفيروسية للحيوان وكذلك للانسان - وقد

اختبرت غالبية أنواع هذه المزارع النسيجية المتميزة باستمرارية النمو – لمدى قابلية كل نوع منها لنمو فيروسات معينة. وقد ثبت صلاحية غالبية هذه الخطوط من الخلايا لهذه الاغراض.

*** إستخدام التزريع الخلوي في الدراسات الفيرولوجية :**

– يستخدم التزريع الخلوي حاليا في جميع مناحي الدراسات الفيرولوجية للحيوان ويمكن أن يقارن هذا الاستخدام واسع النطاق بما يجري استخدامه في مجال البكتريولوجيا من حيث أطباق الأجار وأنابيب الاوساط الغذائية إذ يمثل التزريع الخلوي وسيلة فعالة واقتصادية بدرجة كبيرة فاقت إستخدام حيوانات التجارب وبذلك صار التزريع الخلوي هو أساس التقدم العلمي الكبير الذي حدث في مجال فصل الفيروسات المسببة لأمراض الحيوان، وبالتالي التعرف على هذه الفيروسات وتصنيفها وتوثيق تشخيص الامراض المتسببة عنها وعلى التوازي من ذلك إنتاج المستحضرات البيولوجية واللقاحات التي أدت دورا رئيسيا في مجال حماية الحيوان من الامراض. وإذا أردنا – بصفة عامة – عمل حصر لمختلف أوجه التطبيقات البحثية والعلمية لما أمكن الاحاطة بجميع هذه الجوانب الهامة المترتبة أساسا على تقنيات التزريع الخلوي ولكن نورد بعض الامثلة لهذه الجوانب مثل :

1– فصل الفيروسات والتعرف عليها : Isolation and Identification

2– تصنيف وتقسيم الفيروسات : Classification

3– التحديد الكمي والنوعي للعدوي الفيروسية

Quantitative determination of infectivity :

4– التحديد الكمي والنوعي لمختلف أنواع الاستجابة المناعية للعدوي الظاهرة والخفية في التشخيص :

Identifiction and quantitative determination of viral neutralizing complement fixing, and antihaemagglutinating antibodies in the diagnosis of apparent and inapparent infections.

5– إنتاج اللقاحات واختبار جودتها وفاعليتها وسلامة وأمان استخدامها.

6- الدراسات الوبائية والبيئية :

Epidemiological and ecological studies.

7- الدراسات الخاصة بالمضادات الفيروسية : Antiviral activity

8- دراسة الخواص الفيزيائية والكيميائية للفيروسات.

9- دراسة طرق عدوي الخلايا بالفيروسات وآلياتها في النمو من خلالها .

10- دراسات التأثير الممرض للفيروسات في الخلايا . Cytopathology .

11- دراسات التباين والطفرات والتخلط في فيروسات الثدييات.

12- دراسات آليات التفاعل بين الانتيجينات وأجسام الضد.

Antigen - Antibody Reactions

*** عزل وتصنيف الفيروسات :**

- يتم فصل (عزل) الفيروسات بعمل عدوي لخلايا زرع نسيجي مناسب بمستحضر ملائم من العينة المراد فصل الفيروس منها وذلك بعد معالجتها من أي ملوثات بكتيرية أو فطرية بما هو مفترض من خطوات عمل معروفة لذلك. ثم متابعة هذا الاختبار للوصول الى تشخيص مبدئي للفيروس قيد البحث وذلك ترتيبا على :

1- مصدر العينة المختبرة.

2- مدى حدوث التغير الباثولوجي في الخلايا وتوقيتات ظهوره وسرعة انتشاره.

3- معيار الفيروس الناتج من تكاثره في الخلايا.

- ويتأكد التشخيص باجراء الاختبارات النوعية باستخدام الامصال المضادة. يؤخذ في الاعتبار أن بعض الفيروسات لاتتسبب في إحداث تأثير باثولوجي في الخلايا وفي هذه الحالات يتأكد التشخيص باجراء اختبارات اضافية مثل اختبار Haemadsorption والاختبارات الاخرى كاستخدام الميكروسكوب الفلورسنت Immunofluorescence واختبار التداخل الفيروسي Viral interference . وقد استحدث خلال العقد الاخير بعض التداخل الاختبارات الاخرى المبنية على أساس البيولوجيا الجزيئية : Molecular biology مثل اختبار تفاعل البلمرة التسلسلي : PCR .

بحث عن
التشخيص المجهري الفيروسي

التشخيص المجهري الفيروسي

إعداد
د. سامية عبدالله عطية
(باحث أول)
قسم بحوث الطاعون البقري

تقن أجسام الضد الوميضي :

Fluorescent antibody technique (FAT)

- هو إختبار سيرولوجي لدراسة تفاعل الانتيجين مع الجسم المضاد Ag-Ab.react. ويفيد هذا الاختبار في التعرف تحديدا على الانتيجين أو أجسام الضد كما ونوعا - ويمكن تعريف الانتيجين بأنه المستحضر البيولوجي الذي له القدرة على الالتحام بالجسم المضاد النوعي من خلال المستقبلات شديدة الخصوصية - كما يمكن تعريف اجسام الضد بأنها المستحضر البيولوجي القادر على الالتحام بالانتيجين النوعي له.

- يعتبر هذا الاختبار من أهم الاختبارات التي تستخدم في تشخيص عدوي الاصابة الفيروسية وقد تم وصف كيفية اجراء هذا الاختبار بواسطة (كونز) عام 1941 في دراسات عن البكتيريا السبحية المسببة للالتهاب الرئوي وفي عام 1954 وصف جولدمان أول تطبيق لهذا التقن لدراسة التفريق بين طفيل الانتاميبا وبكتريا اشريشيا القولون.

- ويستخدم الاختبار الآن على نطاق واسع في المختبرات الإكلينيكية ليس فقط للتعرف على نوعية المسبب المرضي ولكن أيضا لتحديد الفصيلة أو العترة بدرجة متناهية من دقة التشخيص باستخدام أجسام الضد الاحادية Monoclonal Antibodies .

- ويتطلب إتمام اجراء هذا الاختبار توافر المتطلبات الاتية :

* أولا : تفاعل أنتيجين مع أجسام الضد النوعية.

* ثانيا : مستحضر فلوريسين أيسوثيوسيانات Fluorescein isothiocyanate

– وهذا المستحضر الأخير يتميز بخاصية القدرة على الامتصاص لموجه طولية واحدة من موجات الضوء وإنعكاس الموجات الطولية الأخرى – وتتميز فاعلية هذه المادة بأنها تجعل الضوء الازرق أو الاشعة فوق البنفسجية ذات الطاقة الكبيرة والموجات القصيرة – تجعلها تع مادة الفلوروكروم وبالتالي يحدث تحول الالكترونات داخل ذرة الفلوروكروم الى درجة من النشاط المؤدى الى طاقة كبيرة عالية وذلك داخل الذرة – ويستتبع ذلك عودة الالكترونات الى مدارها الاصلى الاول مخلفة طاقة كهرومغناطيسية ومن خلال ميكروسكوب خاص بهذا الاختبار يمكن للانسان مشاهدة الطاقة الصادرة الناتجة عن استحثاث الالكترونات الخاصة بالفلوروكروم.

* يوجد نوعين من الميكروسكوب الفلورسينتي :

– النوع الاول : Transmitted light microscope

– النوع الثاني : Incident light microscope

* كما يجرى هذا الاختبار بطريقتين :

1– الطريقة المباشرة Direct FAT

2– الطريقة غير المباشرة Indirect FAT

وعند إنتهاء إجراء الاختبار يتم تقييم النتائج من حيث دقة ودرجة حساسية الاختبار كالاتي :

$$\text{درجة حساسية الاختبار} = \text{Sensitivity} = \frac{\text{عدد العينات الموجبة بالعملية أ}}{\text{عدد العينات الموجبة بالعملية ب}}$$

$$\text{درجـــة دقـــة الاختبار} = \text{Specificity} = \frac{\text{عدد العينات السالبة بالعملية أ}}{\text{عدد العينات السالبة بالعملية ب}}$$

$$\text{التوافق بين أ، ب} = \text{Agreement} = \frac{\text{إجمالي الموجب/إجمالي السالب في أ}}{\text{إجمالي العينات}}$$

حيث أ = الاختبار قيد التقييم ، ب = الاختبار المثالي

– وعند مقارنة نتائج هذا الاختبار بنتائج الاليزا واختبار المصل المتعادل وجد أن هناك تماثلا بنسبة 95٪ على الأقل.

استخدام الصبغات المختلفة في التعرف على التأثير المرضي للفيروسات في المزارع النسيجية

إستخدام الصبغات المختلفة
في التعرف على التأثير المرضي للفيروسات في المزارع النسيجية

إعداد
د. أحمد حسين مصطفى
(باحث أول)
قسم الطاعون البقري

يجدر بنا التعرف على الخلايا النسيجية وكذا القاء الضوء على الفيروسات وكيفية تكاثرها داخل الخلية الحية وذلك قبل دراسة الصبغات ودورها في التعرف على تأثير فيروسات المرض في الخلايا النسيجية.

أولا : الخلايا النسيجية :

هي خلايا حية غالبا مايكون مصدرها عضو مثل الكلى وتنمو بشكل سريع على أسطح الزجاجيات والبلاستيك (أنواع معينة وذلك بواسطة إستخدام أوساط ومحاليل فسيولوجية معقمة وتكون هذه الخلايا رقيقة سمكها خلية واحدة ولها القدرة على إعادة الزرع مرارا). وتستخدم هذه الخلايا في تنمية الفيروسات بغرض إنتاج اللقاحات ومعايرتها. كما تنقسم هذه الخلايا الي نوعان أولى وثانوي.

ثانيا : الفيروسي :

هو جسم دقيق الحجم لايرى إلا بالمجهر الالكتروني ويعتمد في نموه على الخلية الحية وذلك لافتقاره لوجود الريبوسوم (عضو تصنيع البروتينات) ويتكون الفيروس من لب يكون محتواه المادة الوراثية وهي أحد نوعين إما RNA أو DNA وتتكون المادة الوراثية من وحدات بنائية هي النيوكليوتيدات. والمادة الوراثية بها عدد معين من الجينات تختلف باختلاف الفيروس . ويغلف المادة الوراثية مجموعة من البروتينات التي تكون ممزوجة عادة إما بكربوهيدرات أو دهون.

ثالثا : تكاثر الفيروس داخل الخلية :

تمر دورة حياة الفيروس داخل الخلية الحية بعدة خطوات هي :

1- الالتصاق :

يتم التصاق الفيروس بمستقبلات الخلية وذلك عن طريق بروتين معين عادة مايكون بالغلاف الخارجي للفيروس ويكون على شكل أهداب تلتصق بمستقبلات خلية معينة في جسم الكائن الحي تكون مماثلة في التركيبة الأمينية لهذا البروتين تستغرق هذه العملية بضع ساعات.

2- الإندماج والنفاذ من جدار الخلية :

يقوم بهذه العملية بروتين أخر تكون مهمته الإندماج ببروتين الخلايا البلازمى وتزويبه حتي يتسنى للفيروس اختراق الخلية والدخول الى سيتوبلازمها . وتستغرق هذه العملية أيضا عدة ساعات أخرى.

3- التخلص من الأغلفة البروتنية وتحرر المادة الوراثية :

في هذه المرحلة يتخلص الفيروس من المواد البروتينية المحيطة بمادته الوراثية (ويكون التخلص إما كاملا أو جزئي) وتخرج المادة الوراثية بعد ذلك وتتجه الى النواه وذلك بغرض بدء عملية الاستنساخ .

4- الإستنساخ :

يستخدم الفيروس مادته الوراثية لعمل نسخ طبق الاصل عليها وذلك بغرضين :

أولهما : إكثار مادته الوراثية

ثانيهما : ارسال هذه النسخ الى الريبوسوم في السيتوبلازم لترجمتها وتكوين بروتينات لكل جين وراثي .

5- مرحلة التجميع :

يتم خلال هذه المرحلة تجميع البروتينات والمادة الوراثية الجديدة في مكان السيتوبلازم وتستخدم هذه المواد في تصنيع فيروسات جديدة وأي تغيير يحدث عن

التركيبة الاصلية يؤدى الى ظهور فيروس له صفات مغايرة عن الفيروسي الاصلي وتعرف هذه الظاهرة بالطفرة.

6- خروج الفيروسي من الخلية :

تخرج الاف الفيروسات الجديدة من جدار الخلية بطريقة البروز أو بانفجار الخلية نفسها وفي بعض الفيروسات تأخذ جزء من جدار الخلية ليكون الغلاف الخارجي لها.

التعرف على التاثير المرضي للفيروسي على الخلايا وذلك باستخدام الصفات المختلفة :

أولا : الصبغات التقليدية :

1- صبغة الهيماتوكسلين والايوسين : (H & E)

أ- تركيبة صبغة الهيماتوكسلين :

- صبغة الهيماتوكسلين 5.0 جم
- كحول نقي 50 سم3
- شبة الامونيا أو البوتاسيوم 175 جم
- ماء مقطر 1000 سم3
- أكسيد الزئبق 2.5 جم

(طريقة التحضير) :

يذاب الهيماتوكسلين في الكحول النقى كما يذاب البوتاسيوم في الماء ومع التسخين قليلا ثم يضاف المحلولين لبعضهما مع التسخين لدرجة الغليان ثم يضاف بعد ذلك اكسيد الزئبق ببطء ثم يسخن مرة أخرى حتي يظهر اللون البنفسجي وبعدها توضع القاروره في الماء البارد تصير بعدها الصبغة صالحة للاستعمال . ويحبذ اضافة قليل من حامضي الخليك على الصبغة وفلترتها قبل الاستعمال.

ب- تحضير صبغة الايوسين :

- بودرة الايوسين 1 جم
- ماء مقطر 20 سم3
- كحول نقى 80 سم3

يذاب الايوسين في الماء ثم يضاف الكحول.

كيفية أستخدام الصبغة :

أولا : التثبيت يتم تثبيت الخلايا بواسطة غمرها بكحول ايثليني نقي وذلك بعد التخلص من الوسط الغذائي وذلك لمدة نصف ساعة.

ثانيا : نتخلص من الكحول وتترك الخلايا تجف في الهواء الجوى.

ثالثا : نضيف صبغة الهيماتوكسلين على الخلايا لمدة عشرة دقائق.

رابعا : تغسل بعدها الخلايا بماء الصنبور لمدة عشرون دقيقة.

خامسا : يضاف صبغة الايوسين لمدة عشر دقائق.

سادسا : بعد التخلص من الصبغة تغسل الخلايا بالكحول لمدة لحظات.

سابعا : تفحص الخلايا مجهريا.

المشاهدات : تجد أن الخلايا المصابة بالفيروس قد إستدارت وكبرت عن الحجم وبدأت الخلايا تتجمع لتعطي خلية عملاقة أو بدأت تضمحل وتسقط من على الزجاج وتترك فراغات.

أولا : صبغة الكريستال فيوليت (Crystal Violet)

(تحضير الصبغة) :

* يستخدم لتحضير هذه الصبغة محلول الفوسفات الملحي المتوازن وتركيبه هو :

كلوريد الصوديوم 8.0 جم

كلوريد البوتاسيوم 8.0 جم

فوسفات ثنائي الصوديوم (منزوع الماء) 2.16 جم

فوسفات البوتاسيوم (ثنائي الهيدروجين) 0.2 جم

تذاب هذه الاملاح في ماء مقطر وترشح وتحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام.

(تحضير الصبغة) :

صبغة الكريستال فيوليت 0.2 جم

محلول الفوسفات الملحي (المتوازن) 96 سم3

فورمالين 4 سم3

تذاب الصبغة وترشح ثم تحفظ في مكان بارد ومظلم.

(طريقة الصبغة) :

تثبت الخلايا بالكحول الايثيلي ثم توضع الصبغة على الخلايا لمدة عشر دقائق يتم بعدها التخلص من الصبغة وتغسل الخلايا بالماء المقطر.

المشاهدات :

الخلايا المصابة بالفيروس تبدو أقل كثافة من الخلايا غير المصابة وتحت الميكروسكوب تظهر الخلايا المصابة وقد تأثر الستيوبلازم وأصبح محببا والنواه تبدو داكنه جدا وجدار الخلية متهتك ومحتويات بعض الخلايا متناثرة.

ثانيا : الصبغات الخاصة :

1- صبغة الجيمسا (Giemsa Stqin) :

تستخدم هذه الصبغة للتعرف على تجمعات الفيروسات داخل الخلايا النسيجية المصابة.

(تحضير الصبغة)

تضاف بودرة الجيسما الى الجلسرين ثم توضع الزجاجة في فرن التسخين حتي درجة 60م لمدة من نصف ساعة الى ساعتين وبعد ذوبان الصبغة في الجلسرين تترك الزجاجة لتبرد ثم يضاف بعد ذلك الكحول الميثيلي وعند العمل تخفف الصبغة على النحو التالي :

صبغة الجيسما المركزة 1.25 سم3

كحول ميثيلي 1.50 سم3

ماء مقطر 50.0 سم3

المشاهدات :

نجد أن بسيتوبلازم الخلايا المصابة بالفيروس جسيمات داكنة اللون تختلف في حجمها باختلاف الفيروس وهي عبارة عن تجمعات لاجزاء الفيروس التي سوف تستخدم لتجميع الفيروس الكامل وهي ماتعرف بـ Inclusion

2- **صبغة النيوترال** (Neutral Red) :

(طريقة التحضير) :

صبغة النيوترال رد 1.5 جم

ماء مقطر 100 سم3

تستخدم هذه الصبغة في اجراء تجربة معينة لبعض الفيروسات التي لها القدرة على إحداث تدمير بالخلايا النسيجية وإعطاء شكل معين لهذا التدمير الذي يبدو على شكل بقع ذات احجام وأشكال مختلفة وتتم هذه التجربة بعمل زرع نسيجي في طبق مستدير ويوضع عليه وسط غذائي ذا تركيبة معينة يضاف لها 1٪ أوكسيد آجار وبعد 48-72 ساعة توضع الصبغة فيظهر التأثير المرضي للفيروس وتبدو البقع بالزرع النسيجي وعلى ضوء الشكل والحجم لهذه البقع يتم تحديد نوع الفيروس كما يمكن أن تستخدم هذه الطريقة في عملية عزل وتنقية الفيروسات.

التشخيص المجهري البكتيري

التشخيص المجهري البكتيري

إعداد
أ. د. ساهر مكين جرجس

أهمية التشخيص المجهري البكتيري :

يعد الفحص المجهري المباشر للعينات أحد أهم وأسرع الوسائل للتشخيص المبكر للامراض البكتيرية التي تصيب الماشية والاغنام والدواجن. ويعتمد نجاح الفحص المجهري على عدة عوامل أهمها اختيار العينة المناسبة للمرض المشكوك الاصابة به، والاسلوب المتبع في فحص هذه العينة مجهريا. وفي جميع الاحوال يجب أن تكون العينة محل الفحص مصحوبة بالتاريخ المرضي للقطيع المصاب، والمرض المحتمل أن يكون هذا القطيع قد أصيب به بناء على الاعراض الإكلينيكية، ونسبة النفوق في هذا القطيع. كما ينبغى أن تكون هذه العينات بأعداد مناسبة لتمثل كافة أفراد القطيع المصاب. كما يجب أن تكون مأخوذة من حيوانات حيه مصابة أو نافقه حديثا، وان يكون جمعها قد تم بطريقة سليمة تمنع تلوثها بميكروبات غير مرضية، وأن يكون قد تم نقلها الى المعمل بسرعة وبطريقة سليمة في أوعية معقمة أو شرائح نظيفة ويختلف نوع العينة طبقا للمرض المحتمل الاصابة به. وعلى سبيل المثال في حالات الاجهاض يتم جمع عينات من المشيمة للامهات المجهضة وكذلك من افرازات الرحم والاجنة كاملة ومحتويات المعدة للجنين. أما في حالات النفوق المفاجىء فيتم جمع عينات من الدم على شرائح زجاجية وكذا مسحات معقمة من دم الحيوان النافق. أما في حالات الاصابات الصديدية والخراريج فيتم جمع عينات من الصديد في محقن معقم كما يتم عمل مسحات من الخراج بعد تعقيمه بالكحول وفتحه مشرط معقم واحد المسحة من الجدار الخارجي للخراج. وفي بعض الحالات المرضية للاغنام فيتم عمل مسحات من السائل النخاعي الشوكي. وفي حالات التهاب الضرع يتم أخذ عينات معقمة من المربع المصاب في أوعية معقمة بعد التخلص من الجزء الاول من اللبن. ويتم أيضا فحص عينات من البول مجهريا في الكلاب للتعرف على بعض المسببات البكتيرية للامراض مثل اللبتوسبيرا. وفي حالات الشك في الاصابة بميكروب الفيبرويو في الماشية أو مرض جونز في الماشية والاغنام فيتم فحص عينات من البراز.

طرق تحضير المسحات :

1- في حالة العينات السائلة أو شبه الصلبة، يتم وضع نقطة أو نقطتان من العينة على شريحة زجاجية ويتم فردها على الشريحة في طبقة رقيقة ويتم تجفيفها في الهواء.

2- في حالة عينات البراز يتم تخفيف جزء ضئيل بالماء ويتم نشر المسحه في طبقة رقيقة على كل من الشريحة مما يعطي مسحات رفيعة وسميكة تسمح بالتعرف على بعض الميكروب مثل ميكروب السل.

3- أما في عينات الانسجة يتم أخذ مسحات عن طريق الضغط الخفيف لهذه الانسجة على الشريحة وتجفيفها بعد ذلك في الهواء.

4- وفي عينات الصديد أو الافرازات فيتم التدوير الرقيق للمسحة على الشريحة وتجفيفها بعد ذلك في الهواء.

5- في جميع الاحوال بعد الجفاف التام للشريحة فيتم تثبيتها بالحرارة تمهيدا لصبغها.

طرق الفحص المجهري :

يتم فحص العينات التي تم عمل شرائح منها أما قبل أو بعد صبغها بالمجهر الضوئي العادي أو المجهر المشع أو المجهر ذو الحقل المظلم. وذلك باستخدام العدسة الزيتية. وينبغى في جميع الاحوال الاستخدام الأمثل لنوع المجهر المستخدم للحصول على أفضل النتائج التشخيصية ولتجنب التشخيص الخاطيء أو المضلل.

إستخدام الصبغات التشخيصية المختلفة

بعد فحص عينات المسحات المصبوغة أحد أهم وأرخص وأسرع الوسائل التشخيصية للعديد من الامراض البكتيرية. ويتم استعمال هذه الطريقة وحدها أو مصحوبة بالمزارع البكتيرية في التشخيص المعملي. وإذا كان المعمل سوف يعتمد على هذه الطريقة في التشخيص فعلية أن يرسل عينات للعزل البكتيري وعمل اختبار حساسية الميكروب للمضادات الحيوية خصوصا اذا كان الميكروب من النوع المقاوم للمضادات الحيوية.

ويتم تحضير بعض الصبغات المستخدمة في صبغ العينات في المعمل مثل صبغة الجرام وصبغة الزيل نيلسون . أما بعض الصبغات الاخرى فقد يتم شراؤها مجهزة في مجموعات . وفي حالة استخدام الصبغات سابقة التجهيز فيتم أتباع الطريقة الموجودة في نشرة استعمال هذه الصبغة وأتباع النصائح والارشادات الخاصة بالشركة المنتجة للحصول علي أفضل النتائج. ويمكن تقسيم الصبغات المستخدمة الى الانواع التالية :

أ- الصبغات البسيطة :

أولا : صبغة الجرام :

- طريقة الاستخدام :

1- يتم غمر الشريحة بعد تثبيتها على اللهب برفق - بمادة الجنشيان البنفسجي لمدة دقيقة ثم تغسل برفق بالماء.

2- يتم غمر الشريحة بيود الجرام لمدة دقيقة واحدة ثم تغسل بالماء برفق.

3- يتم إزالة اللون بالكحول الاثيلي (95٪) لمدة عشرة ثوان ويغسل بالماء.

4- يتم الصبغ الاضافي بالغمر في محلول السفرانين لمدة نصف دقيقة ثم تغسل الشريحة بالماء وتجفف بالتنشيف أو في الهواء.

5- يتم الفحص بالمجهر الضوئي العادي باستخدام العدسة الزيتية.

وتنقسم الميكروبات بواسطة هذه الصبغة الى ميكروبات موجبة الجرام (تصبغ باللون الازرق) وميكروب سالبة الجرام (تصبغ باللون الاحمر).

ثانيا : صبغة الجمسا :

- طريقة الاستخدام :

1- يتم عمل شريحة رقيقة من المادة المراد فحصها (في حالة فحص البول يتم فحص الراسب بعد الطرد المركزي).

2- يتم تثبيت الشريحة باستخدام الكحول المثيلي لعدة دقائق.

3- يتم غمر الشريحة في محلول صبغة الجمسا المخفف (جزء من الصبغة الى 19 جزء من محلول رايت المتوازن) لمدة 15 دقيقة.

4- تغسل الشريحة بالماء وتجفف في الهواء.

5- يتم الفحص بالمجهر الضوئي العادي باستخدام العدسة الزيتية.

وتستخدم هذه الصبغة للتعرف على ميكروب الزهري الذي يظهر باللون الازرق في شكل لولب.

ثالثا : صبغة المثيلين الازرق الجديدة :

- طريقة الاستخدام :

1- ضع نقطة من صبغة المثيلين الازرق الجديدة على شريحة نظيفة.

2-ضع كمية ضئيلة من المادة المراد فحصها (على سبيل المثال نقطة من الدم أو راسب البول).

3- غطي بغطاء شريحة وأفحص بالمجهر الضوئي العادي باستخدام قوة التكبير الصغري والكبرى.

رابعا : صبغة الزيل نيلسون :

- طريقة الاستخدام :

1- حضر مسحة من الصبغة المراد فحصها على شريحة زجاجية وجففها بالتسخين الخفيف على اللهب عدة مرات.

2- أغمر الشريحة بمحلول الكاربول فيوكسين وسخن برفق مع تجنب غليان الصبغة. واضف المزيد من الصبغة منعا من جفافها على الشريحة. ثم أغسل بالماء.

3- أزل اللون باستخدام الكحول الحامضي حتي زول اللون تماما وأغسل بالماء.

4- اصبغ بالمثيلين الازرق لمدة 30 ثانية ثم أغسل بالماء وجفف الشريحة في الهواء.

5- افحص الشريحة بالمجهر الضوئي العادى باستخدام العدسة الزيتية ويظهر ميكروب السل أو الميكروبات الصائمة للحامض باللون الاحمر، بينما تظهر الميكروبات غير الصائمة للحامض باللون الازرق.

خامسا : صبغة المثيلين الازرق المتعدد الكروم :

تستخدم هذه الصبغة لصبغ ميكروب الحمى الفحمية في شرائح دم وأنسجة الاغنام النافقة قبل البدء في الفحص البكتريولوجي لهذه الصبغات.

وتحضر هذه الصبغة بطريقتين ، الاولى نترك المثيلين الازرق لينضج ببطء في مكان مظلم لمدة سنة حيث تؤدى أكسدة المثيلين الازرق الى تكون صبغة الكروم المتعدد. والطريقة الثانية باضافة مواد تساعد على نضج الصبغة بطريقة سريعة مثل بيكربونات الصوديوم.

*** طريقة الاستخدام :**

1- تعمل شرائح الدم أو الانسجة وتجفف في الهواء وتثبت بالحرارة.

2- تغطى الشريحة بصبغة المثيلين الازرق المتعدد الكروم وتترك لمدة 2-3 دقائق

وتغسل الشريحة بالماء وتنشف بورق الترشيح وتفحص بالعدسة الزيتية للمجهر الضوئي العادي. وتأخذ عصويات ميكروب الحمى الفحمية اللون الازرق بينما تصبغ المحفظة الخاصة بالميكروب باللون البنفسجي ويعرف هذا بتفاعل ماكفيدين.

سادسا : صبغة الليشمان :

تستخدم هذه الصبغة لصبغ طفيليات الدم وبعض الميكروبات التي تسبب التسمم الدموي مثل ميكروب الباستريلا - وذلك في شرائح الدم الخاصة بالحيوانات النافقة أو المصابة. ولا يلزم لهذه الطريقة تثبيت شرائح الدم حيث أن الصبغة نفسها تقوم بهذا.

- طريقة الاستخدام :

1- تخفف الشرائح في الهواء وتصب الصبغة غير مخففة على الشرائح ثم تترك لمدة دقيقة ثم يضاف ضعف كمية الصبغة ماء مقطر وتخلط مع الصبغة على الشريحة عن طريق الشفط وإعادة السائل لتجنب ترسيب الصبغة وتترك بعد ذلك لمدة 7 دقائق.

2- تغسل الصبغة بالماء من على الشريحة ويترك الماء المقطر عدة دقائق.

3- يتم تنشيف الشريحة بورق الترشيح وتفحص بالعدسة الزيتية بالمجهر العادي.

(ب) الصبغات المفرقة :

تستخدم هذه الانواع من الصبغات للتعرف على الانواع المختلفة من الميكروبات بعد عزلها على الاوساط الغذائية الخاصة بها. وتشمل هذه الصبغات الانواع الآتية :

1- صبغة الجرام وقد سبق شرحها.

2- صبغة الزيل نيلسون وقد سبق شرحها.

3- صبغة الزيل نيلسون المعدلة. وتستخدم هذه الصبغة للتعرف على الجرثومات الخاصة ببعض الميكروبات المجرثمة . وطريقة استخدام هذه الصبغة هي نفس طريقة استخدام صبغة الزيل نيلسون فيما عدا انه بعد الصبغ بصبغة الكربول فيوكسين تغسل الشريحة بالماء ويضاف 5٪ سلفيت الصوديوم وتصبغ الجراثيم باللون البنفسجي الغامق، بينما تصبغ العصويات باللون الازرق.

وتستخدم هذه الصبغة ايضا لصبغ ميكروب البروسيلا ويستخدم 0.5٪ حامض الخليك كمزيل للون.

كما تستخدم هذه الصبغة لصبغ ميكروب الجزام ويستخدم 5٪ حامض الكبرتيك كمزيل للون.

4- صبغة الليثمان وقد سبق شرحها.

5- صبغة الجمسا وقد سبق شرحها.

6- صبغة الفونتانا وتستخدم هذه الصبغة لصبغ ميكروب الزهري.

(ج) الصبغات المتخصصة :

1- صبغة المحفظة : ويستخدم لهذا الغرض الحبر الشيني أما بالطريقة السائلة باضافة الحبر الي الميكروب في الوسط السائل ويغطى بغطاء شريحة ويفحص تحت الميكروسكوب أو بالطريقة الجافة وتستخدم المثيلين الازرق كصبغة اضافية.

2- صبغة الجراثيم وتستخدم لهذا الغرض أما صبغة الزيل نيلسون المعدلة أو صبغة الملاكيت الاخضر.

2- وسط الآجار المدمم ويستخدم للتفرقة بين الميكروبات العنقودية.

3- وسط ديسكوكسي كولات سترات آجار ويستخدم في عزل ميكروبات السالمونيلا والشيجلا عن الميكروبات الاخرى.

د- أوساط غذائية مختارة :

وهي تحضر باضافة بعض المواد التي تناسب فقط نمو بعض انواع الميكروبات مثل اضافة كلوريد الصوديوم او الصوديوم ازيد أو التتراثيونات الى الشوربة المغذية لانماء الميكروب العنقودي او ميكروبات السالمونيلا دون غيرها.

هـ- أوساط غذائية متخصصة :

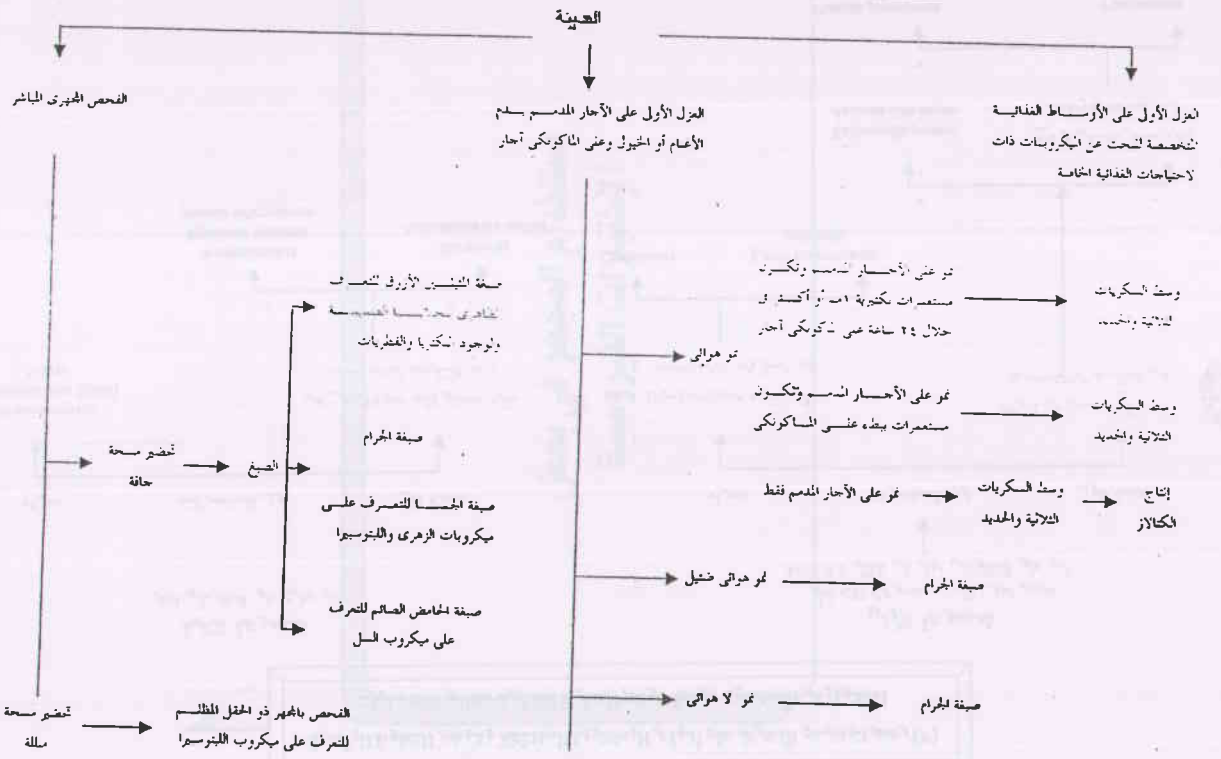
وتستخدم هذه الاوساط الغذائية لزراعة أنواع خاصة من الميكروبات وتشتمل على الانواع التالية :

1- وسط لونشتين جنشن الغذائي : لانماء ميكروب السل.

2- وسط اللحم المطبوخ : لانماء الميكروبات اللاهوائية.

3- وسط سبارود : لانماء الفطريات.

(١) رسم توضيحى للعزل المعملى لمعظم أنواع البكتيريا المرضية الشائعة



إستخدام المجهر في بعض الإختبارات الفيروسية

إعداد

أ. د. عادل محمد حسن عزب

رئيس بحوث ورئيس قسم بحوث لقاحات الحيوانات المنزلية الأليفة

بمعهد بحوث الامصال واللقاحات البيطرية

العباسية – القاهرة

مما لاشك فيه أن إكتشاف المجهر في القرن الثامن عشر كان له اكبر الاثر في نهضة العلوم البيولوجية بشكل عام فما كان غير مرئي قبل اكتشاف المجهر أصبح متاح بعده. ولقد تطور المجهر من صورته البدائية التي كانت تكبر عشرات المرات حتي وصلنا الى المجاهر الالكترونية الحديثة التي تكبر الى حوالى 300000 مرة (ثلاثمائة الف مرة) مما مكن العلماء من رؤية أدق تفاصيل الخلية الحية (النباتية والحيوانية) ليس ذلك فحسب بل تمكنوا ايضا من رؤية الفيروسات بتفاصيلها الدقيقة وسوف نركز هنا على ثلاث أنواع من المجاهر وبصورة مختصرة حيث ان اهم المجاهر شيوعا في علم الفيروسات هي :

1- المجهر الضوئي Light microscopy

2- المجهر المشع (الفلورسنتي) Flourescent microscopy

3- المجهر الالكتروني Electron microscopy

1- المجهر الضوئي :

أمثلة على إستخداماته في مجال علم الفيروسات :

أ- فحص خلايا الزرع النسيجي :

تعتبر اليوم خلايا الزرع النسيجي واحدة من أهم المواد البيولوجية التي تتواجد في مختبر الفيروسات حيث انه يمكن اعتبارها المادة الخام التي يتم عليها التشخيص وايضا

إنتاج العديد من اللقاحات. هذه الخلايا لايمكن فحصها والتأكد من سلامة نموها دون الاستعانة بالمجهر الضوئي ويستخدم هنا نوع خاص يسمى مجهر الزرع النسيجي او المجهر المقلوب وهذا النوع من المجاهر يسمح بفحص الخلايا داخل قناني وأطباق الزرع النسيجي ويجب ان تكون عين اخصائي الفيروسات مدربة بشكل كامل على الشكل الطبيعي لخلايا الزرع النسيجي حتي يستطيع المقارنة بين الخلايا الطبيعية والخلايا المعدية بالفيروس.

ب- معايرة الفيروسات التي تنمو مزارع الزرع النسيجي (مثال فيروس السعار) :

1- تزرع خلايا كلية العرسة السوري الرضيعة BHK في أطباق بلاستيكية من نوعية خاصة ذات 96 حفرة على أن تكون الحفر من النوع المسطح القاع.
2- تحضن الخلايا داخل حاضنة ذات درجة حرارة 37م.
3- تفحص الاطباق يوميا حتي اكتمال نمو الخلايا.
4- يتم عمل تخفيف عشاري للفيروس (1:10 - 1:100 - 1:1000 ... الخ).
5- توضع كمية محدودة (25 ملليميكرون) من محلول الفيروس المخفف في حفر الطبق (6 حفر لكل تخفيف).
6- يترك الفيروس مع الخلايا في الحاضنة عند 37م.
7- تفحص الخلايا يوميا للتعرف على التأثير الممرض للفيروس (CPE).
8- يتم عمل 6 حفر سيطرة سالبة (خلايا بدون فيروس).
9- يتم عمل 6 حفر سيطرة موجبة (خلايا مع فيروس معلوم التأثير).
10- عند ظهور التأثير الممرض للفيروس يتم قراءة بقية الطبق وحساب المعيار إما بطريقة كاربر أو طريقة ريد ومنش حيث أنها جداول حسابية خاصة.

ج- إختبار المصل المتعادل SNT :

في هذا الاختبار يستخدم المجهر الضوئي وايضا خلايا الزرع النسيجي لاستبيان وجود الاجسام المناعية في أمصال الحيوانات المصابة بالمرض أو المحصنة باللقاح المرضي.

ويتم الاختبار بالخطوات التالية :

1- يتم زرع الخلايا في أطباق الزرع النسيجي كما سبق.

2- بعد تمام نمو الخلايا يتم تخفيف المصل الى تخفايف إما بطريقة التخفيف الثنائي (2:1 - 4:1 - 8:1 ...) أو طريقة التخفيف الرباعي (4:1 - 16:1 - 64:1 ...).

3- يتم مزج كل تخفيف من تخفايف المصل مع كمية مساوية من محلول فيروس خاص بالاجسام المناعية المراد الكشف عنها في أمصال الحيوانات والتي يتم تخفيفها في الخطوة رقم 2. يتم المزج بين التخفيف وكمية مساوية من محلول الفيروس بتركيز فيروس قدرة 210 نصف جرعة مميتة لخلايا الزرع النسيجي لكل سم 3.

4- يترك المزيج في درجة 37م لمدة 1/2 ساعة حتي تتم عملية التعادل وتكوين معقد الضد والمستضد.

5- يتم وضع كميات محدودة من المزيج في حفر الاطباق بواقع 6 حفر لكل تخفيف.

6- تعمل مسطرات سالبة (خلايا فقط) وأخرى سالبة (مصل فقط) وموجبة (فيروس مع الخلايا).

7- عند ظهور التاثير الممرض في السيطرة الموجبة يتم حساب مستوى الاجسام المناعية باحدى طرق الحساب (كاربر أو ريد ومنش).

هذا الاختبار مهم جدا في الفيروسات نظرا لانه إختبار تقليدي ودقيق وحساس ويساعد على التعرف على المستوى المناعي في جسم الحيوان المأخوذ منه المصل.

د- إستخدام المجهر الضوئي في التعرف على التغيرات المرضية النسيجية نتيجة للوجود الفيروسي :

حيث أن هناك بعض الامراض الفيروسية لها المقدرة على إحداث تغيرات خاصة جدا بها تساعد على تشخيصها وإذا أخذنا السعار كمثال هنا أيضا نجد أن أهم تغير نسيجي هو وجود أجسام (نجرى) في الخلايا العصبية للمادة الرمادية في مخ الحيوان المسعور. واجسام (نجرى) هي عبارة عن أجسام إستحالية (Inclusion bodies) من النوع المحب للصبغة القاعدية (أزرق اللون) داخل هيولي الخلايا من نوع Cow dry (A) . علاوة على ذلك فان خلايا المادة الرمادية من المخ تعاني من تنكس عصبي والتهابات غير متخصصة.

ولكن كيف يمكن عمل شريحة نسيجية للفحص المجهري تحت المجهر الضوئي ؟

لعمل شريحة نسيجية يلزم إتباع الخطوات التالية :

عينة من مخ الحيوان

↓

تثبت العينة بواسطة محلول الفورمالين 20٪ مع منظم الفوسفات
وتترك العينة لمدة 14 يوم في هذا المحلول

↓

غسيل (24 ساعة)

↓

تهذيب للنسيج

↓

نزع لجزيئات الماء بواسطة محاليل متدرجة من الكحول الايثيلي 80٪ و 95٪ ومطلق

↓

تنظيف النسيج بوضعة في الزيلين

↓

غمس النسيج في البرافين السائل (بارافين I) عند درجة 37م لمدة 4 ساعات ويكون البارافين ممزوج
مع الزيلين بنسبة 50٪

↓

ينقل النسيج الى البارافين II عند درجة 56م لمدة ساعتين

↓

تنقل العينة الى البارافين عند درجة 60م لمدة ساعتين

↓

ينقل النسيج الى قوالب بها بارافين نقي وتترك لتبرد

↓

يقطع النسيج الى شرائح رقيقة بسمك 5–10 ميكرون بواسطة الميكروتوم

↓

توضع الشرائح على سطح حمام مائي درجته 40م

↓

تفرش الشرائح على شرائح زجاجية مدهونة بالبومين البيض

↓

تجفف بواسطة فرن (40–50م)

↓

تصبغ بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين

↓

تغطى بشرائح زجاجية بواسطة الكندا بلسم

↓

تفحص تحت المجهر الضوئي حيث تلاحظ التغيرات السابقة الذكر

2- المجهر المشع (الفلورسنتي) :

هو مجهر ذو حقل مظلم تسقط عليه الاشعة فوق البنفسجية وعند وجود مادة مشعة عند سقوط هذه الاشعة عليها فانها تظهر بشكل مضيء أخذه لون التفاح الاخضر. وأهم مادة تستخدم هي مادة الفلورسين أيزوسيوسينات وهي كما قلنا مادة تشع عند سقوط الاشعة فوق البنفسجية عليها.

لاجراء هذا الاختبار نقوم بها الاتي :

1- عمل شريحة مجمدة من النسيج الحيواني بواسطة جهاز التقطيع تحت التجميد او عمل مسحات مباشرة.

2- توضع الشرائح أو المسحات على شرائح زجاجية.

3- تثبت الشرائح أو المسحات بواسطة الاسيتون لمدة 4 ساعات على درجة 20م

4- تغسل الشرائح بمحلول الفوسفات المنظم للتخلص من الاسيتون ثم تصبغ الشرائح بعد ذلك بالطريقة غير المباشرة حيث يضاف قطرتين من المصل المضاد للفيروس المراد الكشف عنه بدون أي صبغة.

5- تحضن الشرائح لمدة 1/2 ساعة على درجة 37م وتكون الحضانة رطبة.

6- يتخلص من المصل الزائد بالغسيل في محلول الفوسفات المنظم 3 مرات كل مرة 10 دقائق.

7- تضاف قطرتين من مصل مضاد لنوع الحيوان (Anti-species) ومصبوغ بصبغة الفلورسين ايزوسيوسينات.

8- إعادة فترة التحضين الرطب.

9- تعاد خطوة الغسيل الثلاثية بالمحلول المنظم.

10- تغطى الشريحة بمحلول الجلسرول 90٪ مع فوسفات منظم بدرجة أس هيدروجيني 7.5 .

11- تفحص الشرائح بالمجهر وعند ظهور الاشعاع الفلورسيني تعتبر الشرائح موجبة عقب تواجد الفيروس في النسيج أو المسحه.

3- المجهر الالكتروني :

في منتصف القرن العشرين حدثت ثورة علمية بحق نتيجة لاكتشاف المجهر الالكتروني الذي مكن علماء الفيروسات من رؤية الفيروس نفسه وبكامل تفاصيله بعد أن كانوا يروا تأثيره فقط على المزارع النسيجية أو في البيض المخصب أو في حيوانات التجارب ولاشك أن الحديث عن المجهر الالكتروني حديث طويل جدا وسوف نحاول تبسيط الامر هنا. فالهدف الرئيسي من استخدام المجهر الالكتروني هو التعرف على التركيب الدقيق للعينة المفحوصة Ultrastructural Examination والعينة التي تفحص بواسطة المجهر الالكتروني يجب أن يحافظ عليها قدر المستطاع بحالتها الطبيعية حيث أن أي تغير يمكن أن يؤدى الى نتائج غير دقيقة نظرا لحساسية المجهر وقوة تكبيرة الشديدة والنظرية القائم عليها عمل المجهر الالكتروني هي أن المجهر يطلق الكترونات ترتد من الصبغة الخاصة به مظهرة للشكل وتفاصيل العينة المراد فحصها سواء كانت حيوانية أو نباتية. وللحفاظ على العينات بحالة قريبة جدا من الطبيعي يجب استخدام مثبتات خاصة مثل الالدهيدات (الجلوتر الدهيد والبارافور مالدهيد). كما يجب أن تكون كافة المواد المستخدمة في عمليات التثبيت والصبغة من كيماويات شديدة النقاوة يطلق عليها (درجة المجهر الالكتروني) EM grade .

خطوات العمل :

أخذ العينة المراد فحصها

↓

تثبيت العينة بواسطة الالدهيدات (تثبيت أول)

↓

تثبيت العينة بواسطة أوزميم تتراوكسيد (تثبيت ثاني)

↓

نزع الماء من العينة بواسطة محلول متصاعد من مادة مذيبة (أسيتون)

↓

غمس العينة في مادة الايبوكسي ريزين

↓

تقطيع فائق الدقة Ultra-microtome

↓

وضع الشرائح في الجرد (من نحاس غالبا)

↓

صبغ الشرائح بواسطة أحد الصبغات الخاصة

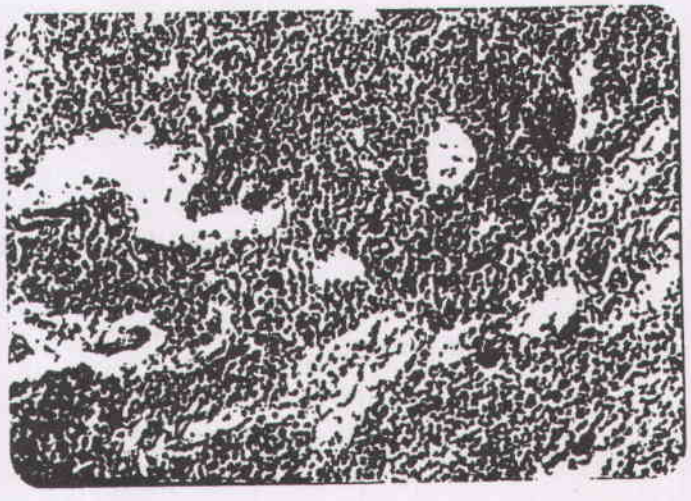
أهم صبغات المجهر الالكتروني هي صبغة اسيتات اليورانيل

وهي صبغة إما مائية (تحضر في ماء) أو كحولية (تحضر في الايثانول)

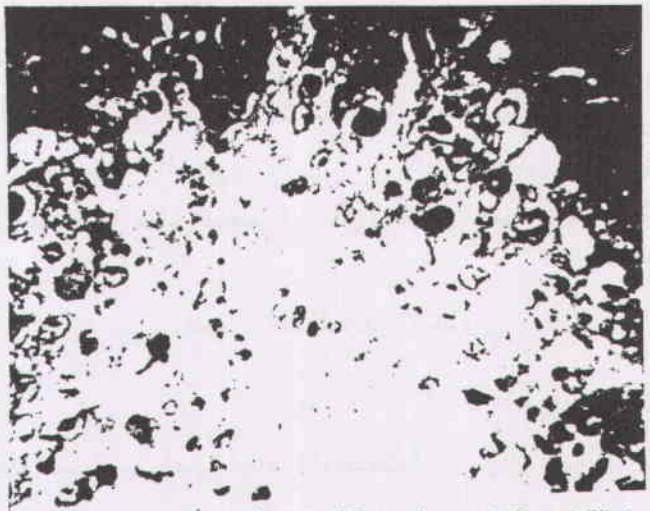
↓

تفحص تحت المجهر الالكتروني

هذه فكرة مبسطة عن أهم المجاهر المستخدمة في مجال علم الفيروسات وبعض من إستخداماتها وفيمايلي بعض الصور التوضيحية لما سبق التحدث عنه

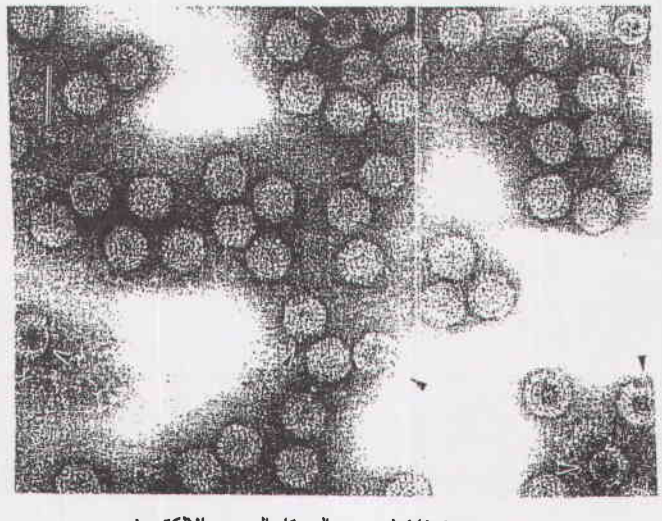


صورة (١) توضح التغير المرضى لخلايا الزرع النسيجى بعد حقنها بالفيروس



صورة (٢) نسيج (كبد) مصبوغ بصبغة الهيماتوكسيلين والأيوسين توضح وجود الأجسام الإشتمالية (Inclusion bodies) داخل الهيولى (Intra-cytoplasmic).

صورة (٣) توضح وجود الفلورسين المشع فى خلايا مصابة بالفيروس



صورة (٤) فيروس الروتا بالمجهر الإلكترونى

إختبارات التعادل
Neutralization tests

إختبارات التعادل
Neutralization tests

إعداد
أ. د. عزيز ميخائيل أسحق

تقوم اختبارات التعادل على حقيقة أن الفيروس الحي حينما تتم معاملته بالاجسام المناعية المضادة (المتخصصة له) تتم معادلته ويصبح غير قادر على العدوى للخلايا أو أغشية البيض المخصب. وعند إجراء هذه الاختبارات في حيوانات التجارب الحية يطلق عليها أسم اختبارات الحماية Protection tests .

وتتم اختبارات التعادل في مرحلتين كما هو موضح بالرسم (الشكل) حيث يتفاعل (يعمل) الفيروس الحي في المرحلة الاولى مع الاجسام المناعية. وفي المرحلة الثانية يتم حقن الفيروس المتحد مع الاجسام المناعية (حقنهما معا) على الخلايا النسيجية أو أغشية البيض المخصب القابلة للعدوى بالفيروس وبعد فترة حضانة مناسبة من 5-7 أيام يتم فحص الخلايا أو الاغشية العائلة لوجود الآثار المرضية.

النتيجة :

1- في حالة ارتباط الاجسام المناعية بالفيروس (من المرحلة الاولى) يكون الفيروس متعادل ولا يسبب عدوى الخلايا أو الاغشية وبالتالي لاينتج عنه آثار مرضية.

2- أن لم تكن الاجسام المناعية مرتبطة بالفيروس في المرحلة الاولى يظل الفيروس نشط ويسبب عدوى الخلايا أو الاغشية وينتج عنها آثار مرضية (عدوى).

إستخدامات إختبار التعادل :

1- في التعرف على الفيروسات المجهولة.

2- في التعرف على الاجسام المناعية المجهولة.

أولا : للاستدلال على الفيروسات المجهولة يتم تحضير مستخلص للفيروس المجهول ويخلط مع الاجسام المناعية المعلومة كما في المرحلة الاولى.

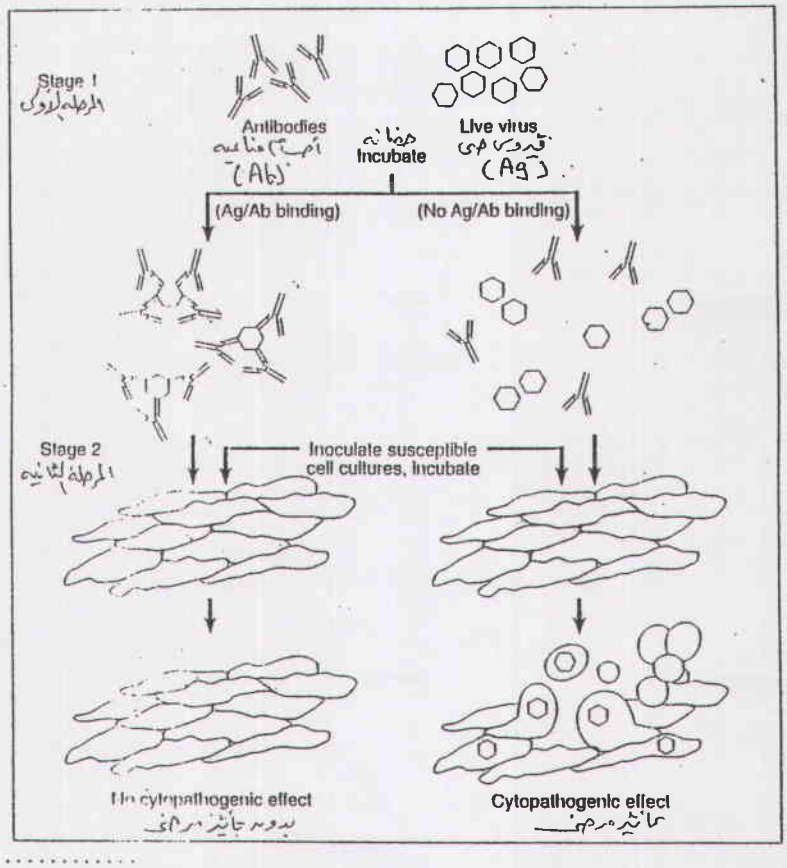
ثانيا : إن كانت الاجسام المناعية هي المجهولة يتم تحضير مستخلص من الفيروس المعلوم ويخلط مع سيرم دم الحيوان أو الطائر المريض والمحتوى على الاجسام المناعية المجهولة.

وفي هذه الحالة يتم بعناية تقييم الفيروس قبل اجراء اختبار التعادل (أي تتم معايرته).

والمرحلة الثانية في كلا الحالتين واحدة وهي حقن الخليط السابق تحضيره (فيروس + أجسام مناعية) في الخلايا القابلة للعدوي أو على أغشية البيض المخصب وتركها في الحضانة لمدة من 5-7 أيام حتى قراءة وحساب النتيجة.

فوائد اختبارات التعادل :

يعطى أدق نتائج ويعتبر المرجع للتجارب السيرولوجية الاخرى المستخدمة للاستدلال على الفيروسات المجهولة - كذلك فان عترات الفيروس الواحد (مثل الانتيروفيروس) يمكن الاستدلال عليها والتفرقة فيما بينها باختبار التعادل الفيروسي.


Stage 1
Antibodies
(Ab)
Live virus
(Ag)
Incubate
(Ag/Ab binding)
(No Ag/Ab binding)
Stage 2
Inoculate susceptible cell cultures, incubate
No cytopathogenic effect
Cytopathogenic effect

إختبار سلسلة التفاعل على البلمرة

إختبار سلسلة التفاعل على البلمرة

إعداد
د. حسام جمال الدين إسماعيل
باحث أول بقسم بحوث الحمى القلاعية
بمعهد بحوث الأمصال واللقاحات البيطرية

تعريف PCR

هو اختبار يعتمد أساسا على الكشف عن جزء خاص من الحامض النووي للفيروسات أو البكتريات أو الفطريات وهي اختبار يتم خارج الخلية الحية ويتم استخدام الانزيمات (المحضرات) سلسلة متكررة من ثلاث درجات حرارة مختلفة مما يعطى عدد متضاعف من الجزء الذي يتم اكثاره بعدد 2ع (ع = عدد سلسلة درجات حرارة).

خصوصية اختبار PCR

يعتمد على تهجين باديء التفاعل مع الحامض النووى المراد الكشف عنه وأن باديء التفاعل يتكون من 18-24 وحدة قاعدية من الحامض النووى ويتم انتاج باديء التفاعل في المعمل باستخدام جهاز تحضير الحامض النووى.

اختبار PCR

أ- درجة حرارة تغيير طبيعة الحامض النووى درجة حرارة 95م لمدة 3-5 دقائق لفصل طرفى الحامض النووى DNA

ب- درجة حرارة تثبيت باديء التفاعل على إحدى خيوط الحامض النووى وتعتمد هذه الدرجة على عدد الوحدات البنائية المختلفة فانه يتم حساب 2م لكل من الوحدة س،ج، 1م لكل من الوحدة أ، ب من الحامض النووى.

ج- عمل انزيم البلمرة : يقوم انزيم البلمرة بعمل خيط أخر مقابل للخيط الاصلى بدءا من باديء التفاعل الذي لصقه على الخط الاصلى ويعمل هذ الانزيم في درجة حرارة 72م ويتم تكرار الثلاث خطوات الاخيرة لعدد 30-40 مرة للحصول على عدد متضاعف من الحامض النووى لسهولة الكشف عنه وبالتالي يتم الكشف عن الميكروب.

يتم الكشف عن الحامض النووى بطريقة التحليل الكهربي باستخدام مادة تصبح الحامض النووي وهي بروميد ايثيديوم وباستخدام أشعة فوق البنفسجية.

إختبار التعادل المصلي

إختبار التعادل المصلي

إعداد
د. سميرة سعيد طه

حتى يتم هذا الاختبار :

يتم باستخدام أي فيروس وخاصة الفيروسات التي ليس لها خاصية التلازن أو المتمم المثبت ويستخدم لقياس الاجسام المناعية المضادة أو لقياس العدوى الحديثة.

ماهو هذا الاختبار ؟

وهو عبارة عن تفاعل بين الفيروس والاجسام المناعية المضادة في المصل ثم يتم حقن الخليط السابق في العائل المناسب (النسيج الزرعي – البيض المخصب أو فئران التجارب) الذي يظهر الاعراض المرضية الخاصة بالمرض المراد قياس الاجسام المناعية المضادة له.

المواد المستخدمة في الاختبار :

1- الفيروس : يستخدم لقياس الاجسام المناعية المضادة أو العدوى الحديثة التي تقاس بارتفاع نسبة الاجسام المناعية المضادة أربعة أضعاف في اختبار السيرم الزوجي في الحيوانات المعدية.

2- المصل : يتم تسخينه لدرجة 56م لمدة نصف ساعة لتدمير أي مواد غير متخصصة في التفاعل (Non-specific neutralizing)

يتم هذا التفاعل بطريقتين هما :

الطريقة الاولى : فيروس ثابت مع تخفيفات مختلفة من السيرم

الطريقة الثانية : سيرم ثابت مع تخفيفات مختلفة من الفيروس.

الطريقة الاولى :

- يتم عمل تخفيفات مختلفة من السيرم (1/2، 1/4، 1/8، 1/16).
- تقاس القوة العيارية للفيروس قبل إستخدامه في اجراء الاختبار واستخدام كميات متساوية من الفيروس المحتوى على 100 جزء من جزيئات الفيروس الذي يحدث تأثير مرضي في 50٪ من خلايا الزرع النسيجي تضاف لكل تخفيف من التخفيفات السابقة ويترك لفترة مناسبة في درجة حرارة مناسبة (37م) لمدة نصف ساعة ليتم حدوث التفاعل الكامل.
- يتم قياس معدل الاجسام المناعية بأخر تخفيفات من السيرم لا يظهر التأثير المرضي للفيروس المستخدم.

الطريقة الثانية :

- يعمل تخفيفات مختلفة من الفيروس (10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}) يضاف اليها تخفيف واحد من المصل.
- تعاير قوة الفيروس في وجود سيرم غير محتوى على اجسام مناعية مضادة للفيروس وكذلك في وجود سيرم عالى المناعة (سيرم معلوم قوته المناعية).
- الفرق بين القوتين يسمى Neutralizing Index (Log_{10} NI)

التفاعل :

خلط كميات متساوية من الفيروس والسيرم لفترة مناسبة ودرجة حرارة مناسبة.

طريقة الحقن :

يتم حقن الخليط مباشرة بعد تمام التفاعل في العائل المناسب على النحو التالي :

1- 0.2 من المليليتر لكل أنبوبة من خلايا الزرع النسيجي.

2- 0.03 من المليليتر داخل الغشاء البريتوني (I/P) أي في المخ (Intracerebral) لكل فأر عمر يوم.

3- 0.1 من المليليتر في بيض مخصب عمر 12 يوم (Chorioallantoic membrane) .

الضوابط :

1- يستخدم ضابط للفيروس (Virus control) للدلالة على فاعلية الفيروس المستخدم.

2- يستخدم ضابط لسمية السيرم.

3- يستخدم ضابط للتفاعل أو لخلايا الزرع النسيجي بدون حقن.

مراقبة جودة الاختبار :

عن طريق وضع البيض المحقون وحيوانات التجارب وخلايا الزرع النسيجي في ظروف مناسبة حتي يظهر التأثير المرضي ويتم تقييم الاختبار بقياس القوة العيارية للفيروس وكذلك ضابط الفيروس المصاحب للتجربة . بالنسبة لخلايا الزرع النسيجي يتم وضعها في حضانة 37م لمدة أسبوعين . يتم الفحص ميكروسكوبيا يوميا لملاحظة التأثير المرضي للفيروس.

طريقة الحكم على الاختبار (Interpretation) :

نلاحظ الحيوانات المحقونة والبيض المخصب من حيث الاعراض التي تظهر عليها وكذلك نسبة النفوق كما تلاحظ خلايا الزرع النسيجي لظهور أي أثار مرضية للفيروس (CPE) .

القوة المناعية (Titre) يقاس باستخدام Karber Method أو Reed and Muench

وجود الاجسام المناعية أحسن قياس لمناعة الفيروس، أي تغير من نسبة الاجسام المناعية في اختبار السيرم الزوجي للحيوانات المعدية في نفس الاختبار دلالة على وجود العدوي الحديثة.

بحث عن
إنتاج مسابر (كواشف) للأحماض النووية

إنتاج مسابر (كواشف) للأحماض النووية
DNA Probes

إعداد
د. علاء الخولي
قسم بحوث الهندسة الوراثية

1- نبذة عن بعض مشاكل تشخيص الأمراض المعدية :

مقاييس السيطرة على العديد من الامراض المعدية تعتمد أساسا على الحفاظ على قطعان الحيوانات في صورة نظيفة ومغلقة والكشف الدوري للحيوانات داخل القطيع وقبل إدخالها في قطيع جديد وكذلك التشخيص المعملي الدقيق للحيوانات المصابة وانتظام برامج التحصين.

إن الطرق المتداولة للتعرف على الميكروبات الباثولوجية في العينات الإكلينيكية والباثولوجية لها الكثير من العيوب للأسباب الأتية :

1- لانها تحتاج الى توافر سريع للعينات المناسبة تحتوى على المسبب المرضى في صورة حية حتى يمكن زرعه وعزله على البيئة المناسبة وعلى ذلك يحتاج الى ميديا خاصة واختبارات بيوكيميائية وكذلك أمصال خاصة عالية المناعة .

2- تحتاج الى وقت كبير ومصاريف كثيرة ويصعب تطبيقها في القطعان ذات الأعداد الكبيرة من الحيوانات.

3- هناك العديد من المسببات المرضية التي يصعب عزلها دوريا بالطرق الروتينية ومثال ذلك بكتريا التريبونيما، وفيروس البابيللوما، وفيروس السعار الكاذب الدائم وهناك ميكروبات يصعب تنميتها مثل الميكوبلازما والريكتسيا وكذلك ميكروبات بطيئة في النمو من أسابيع الى شهور مثل السل.

وكان لتفجر الثورة المعلوماتية الوراثية تأثير مباشر في استنباط العديد من الادوات

التشخيصية التي تعتمد على تقنيات الاحماض النووية والبيولوجيا الجزئية التي بدورها وفرت بدائل أفضل من طرق التشخيص العادية للامراض المعدية من حيث سرعة النتائج وزيادة الحساسية والتخصص.

2- مسابر الأحماض النووية للتشخيص الوراثي :

إن مجسات الاحماض النووية هي عبارة عن تتابع من القواعد النيكلوتيدية في صورة شريط مفرد قصير منشأه إما حامض نووي ريبوزي أو ديوكسي ريبوزي RNA أو DNA والتي تتحد مع تتابع نيوكلوتيدي خاص ومكمل لهذا الشريط منتجة هجين دائم (hybrid) وتصمم المسابر أساسا للتشخيص الوراثي للميكروبات عن طريق التعرف على تتابع نيكلوتيدي خاص بهذا الميكروب وتعمل هذه المسابر على جميع أنواع الاحماض النووية إما احماض نووية مجينية (Genomic) كما في حالة الفيروسات او الاحماض النووية الخارج كروموزومية (plasmid DNA) والحامض النووي الريبوزومي كما في حالة البكتريا . وقد تكون المسابر خاصة بالكشف الوراثي عن العائلات أو الفصائل أو الاجناس أو العترات الميكروبية أو الكشف عن التتابعات النيكلوتيدية المسئولة عن المنتجات الميكروبية الخاصة مثل التوكسينات والهيموليسينات.

وهناك كثير من مسابر التشخيص الوراثي قد تم استنباطها للكشف عن العديد من البكتريا والفيروسات والفطريات والطفيليات.

3- تحضير مسابر التشخيص الوراثي :

يتم تحضير المسابر الوراثية بعزل الجزء الخاص من التتابع النيوكلوتيدي المراد بكلونته او زيادته إما بطرق التركيب الوراثي أو باستخدام تفاعل البلمرة التسلسلي (RCR) ثم يتم إعادة قطع هذا التتابع النيوكلوتيدي الخاص وتعليمه بكاشف مشع (^{32}P) (^{35}S) ، أو غير مشع (بيوتين، ديكسوجنين، فلورسين).. ومن الجائز أن يستخدم الحامض النووي الديوكسي ديبوزي المكمل (cDNA) أو الحامض النووي الريبوزي (RNA) او سلاسل نيوكلوتيدية قصيرة صناعية كمسابر بعد تعليمها. ورغم أن استنباط مسابر الاحماض النووية يستهلك وقت طويل وتكلفة عالية في البداية إلا أنه بمجرد عزل التتابع النيوكلوتيدي وكلونته يصبح لدينا مصدر دائم ورخيص للتشخيص الوراثي للميكروبات.

4- تقنية التهجين (DNA hybridization) :

إن أساس تهجين الاحماض النووية هو أن الاحماض النووية في شكل سلاسل مفردة على غشاء من النيتروسليلوز أن النايلون أو الموجودة داخل النسيج تحت الفحص يتم تهجينها بمسابر معلمة تحمل القواعد المكملة للتتابع المطلوب سبره ويتم التكامل الجزئي بين القواعد المؤلفة بالاحماض النووية أ مع ث و ج مع س . ويشمل تهجين الاحماض النووية أربع خطوات رئيسية :

أ- تجهيز الاحماض النووية في العينات المختبرة بالتفكيك .

ب- إضافة المسابر المعلمة باجراء تفاعل التهجين مع الاحماض النووية.

ج- التخلص من مسابر الاحماض النووية الغير مهجنة.

د- الكشف عن مسابر الاحماض النووية المهجنة بتعرضها الى أفلام الاشعة السينية في حالة المسابر المشعة أو بالكشف عن التفاعل اللوني في حالة المسابر المعلمة أنزيميا وفلورسينتيا كما هو المتبع في اختبارات الصبغ المناعي والاليزا.

5- تقنيات تهجين الاحماض النووية :

- تقنية التهجين باللطع النقطي يستخدم في حالة لطع العينات المختبرة مباشرة على غشاء من النايلون أو النيتروسليلوز.
- تقنية سوثيرن (Southern) للتهجين النقطي وتشير الى فصل الحامض النووي الديؤكسي ريبوزي (DNA) كهربائيا على جل الاجاروز ثم نقله على الغشاء الملائم لتهجينها بالمسابر الخاصة به.
- تقنية نورثورن (Nortern) للتهجين النقطي وتشير الى فصل الحامض النووي الريبوزي (RNA) كهربائيا على جل الاجاروز ثم نقله ولطعه على الغشاء الملائم لتهجينه بالمسابر الخاصة به.
- تقنية التهجين في الموقع (insitu) وتشير الى إحداث عملية التهجين بين الاحماض النووية داخل النسيج او الخلية والمسابر الخاصة بها.

- وهناك محاولات مستمرة لتطوير تقنيات تهجين الاحماض النووية تهدف الى تقليل التهجين غير المتخصص الزائف ومثال ذلك إستنباط طرق التهجين الشطيري (Sandwich assay) وعصا الغمز (Dipstick assay) والتي يتزايد استخدامها في ميكروبيولوجيا الغذاء.

6- تطبيقات تهجين الاحماض النووية في مجال الامراض المعدية البيطرية:

1- الكشف عن الكثير من الفيروسات البيطرية الهامة مثل الجمبورو، والاسهال الفيروسي للماشية، وفيروسات الادينو واللسان الازرق والحمى القلاعية والسعار الكاذب، الطاعون البقري والروتا والفيروسات المعوية.

2- الكشف عن الكثير من البكتريا مثل الكامبيلوباكتر، والسل والليبتوسبيرا، والإية كولاي والميكوبلازما.

3- الكشف عن الملوثات الميكروبية في خلايا الزرع النسيجي والمستحضرات الحيوية مثل اللقاحات.

4- تصنيف الميكروبات وتحديد طرازها العرقي الوراثي.

5- الرقابة الميكروبيولوجية على الاغذية.

6- الدراسات الوبائية للميكروبات وطفراتها.

تحميل الجينات على حوامل لاستخدامها في إنتاج مستحضرات تشخيصية في الاختبارت المعملية

تحميل الجينات على حوامل لاستخدامها في إنتاج مستحضرات تشخيصية في الاختبارات المعملية

إعداد
د. سهام عبدالرشيد الزيدي
رئيس قسم بحوث الهندسة الوراثية

مقدمة في أساسيات البيولوجي الجزيئية :

- المادة الوراثية للكائنات الحية من البكتيريا حتي الإنسان مادة واحدة هي الحمض النووي الديوكسي ريبوزي أو الدنا (DNA) (Deoxyribonucleic Acid) ماعدا بعض الفيروسات التي تتكون من الحمض النووي الريبوزي وهو (رنا) Ribonueleic acid (RNA) .
- تم اكتشاف تركيب الحمض النووي بواسطة واطسون وكريك (Watson and Crick) عام 1953 . وقد كان هذا الاكتشاف هو بداية عصر جديد لعلم البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية التي يعلق الاطباء أملا كبيرا عليها في حل مايواجه الطب من مشكلات خلال القرن الحادي والعشرين.
- من المعروف ان كل صفة وراثية من صفات أي كائن حي تكون محمولة على جين أو اكثر والجين عبارة عن منطقة محددة على شريط المادة الوراثية DNA تحمل داخلها المعلومات الوراثية اللازمة لانتاج صفة معينة.
- يتكون الشريط الوراثي من شريط حلزوني مزدوج ملفوف ملتو له جانبان من السكر والفوسفات ويكون السكر الديوكسي ريبوزي في حالة الـ DNA والريبوز في حالة الـ RNA والفوسفات وهو عبارة عن سلم حلزوني تتألف كل سلمة من زوج من القواعد النيتروجينية.
- تسمى القاعدة النيتروجينية ومعها حلقة السكر الديوكس ريبوزي ومجموعة الفوسفات المرتبطة باسم (نيوكليوتيده).

- القواعد النيتروجينية اثنتان منهما تنتميان الى مجموعة البيورين وتسميان أدنين A وجونين G واثنتان تنميان الى مجموعة بايريميدين وتسميان ثايمين T وسيتوزين C وفي حالة الـ RNA توجد القاعدة يوراسيل (U) بدلا من الثايمين
- ولكي تكتمل درجات السلم لابد أن يتقابل القاعدتين أدنين A مع الثايمين وتربطهما رابطة هيدروجينية مزدوجة بينما يتقابل السيتوزين C مع الجوانين G برابطة هيدروجينية ثلاثية.

- ينقسم تتابع القواعد الذي يكون الجين المشفر لاي بروتين الى كودونات Codons ، والكودون هو ثلاث قواعد متتابعة على طول الجين ويشفر كل كودون لحمض أميني واحد.
- ويتكون الجين من تتابع القواعد النيتروجينية يتسلسل معين وهذا التسلسل هو الذي يعطي الامر للجين لتكوين بروتينات معينة.

تكنولوجيا تحميل الجينات (Recombinant DNA Technology) :

تعتمد تكنولوجيا تحميل الجينات على نقاط أساسية أهمها :

1- الحصول على جزء من الشريط الوراثي الـ DNA (الجين) الذي يعبر عن البروتين المطلوب.

2- إستخدام الانزيمات المختلفة.

3- وجود الوسيط المناسب الذي يحمل عليه الجين (Vector) خلال عملية الكلونة او الاستنساخ (Cloning) .

4- وجود الفيروس أو البكتيريا التي ستنتج البروتين المطلوب.

1) الحصول على الجين :

يعكس ترتيب الكودونات في الجين ترتيب الاحماض الأمينية في البروتين الذي يشفر له هذا الجين، وتتم عملية ترجمة الشفرة في الجين على الشريط المزوج لـ DNA الى الاحماض الأمينية التي تشكل البروتين ولكل جين بداية ونهاية ويلزم أن يبدأ الجين بكودون الميثايونين.

ويتم الحصول على الجين المطلوب بطريقتين :

أ- استخدام إنزيمات التحديد والبتر لفصل الجين المطلوب من الشريط الوراثي.

ب- إستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لاستنساخ الجينات وتكبيرها.

2) إستخدام الأنزيمات المختلفة :

- تقوم خلايا البكتيريا بانتاج إنزيمات يطلق عليها إنزيمات البتر أو التحديد (Restriction Endonuclease Enzyme) تقوم هذه الانزيمات بقطع شريط الدنا عندما تتعرف على تتابع معين من النيوكلوتيدات (Recognition Sequence) ويكون مابين 4 و 8 نيوكلوتيدات فيقطعه بين قاعدتين بذاتهما. وكل إنزيم من هذه الانزيمات لايستطيع ان يقطع إلا عند موضع محدد على جزئي الحامض النووي.

- يوجد إنزيم أخر لا يقل أهمية عن أنزيمات القطع وهو مايسمى بالصمغ أو اللصق (Ligase Enzyme) ولابد أن يأتي بعد عملية القص حيث يجمع جزيئات الحامض النووي الذي تم قص اجزاء منه ليصلها ببعض وبذلك نستطيع أن نقطع جينا معينا من موضع معين على الحامض النووي ولصقه بالوسيط لنحصل على الجين المحمل (Recombinant DNA) .

3) الوسيط (Vector) :

يوجد نوعين من الوسيط يستخدم في تقنيات الهندسة الوراثية :

أ- البلازميدات :

وهي توجد داخل البكتيريا ولكن لاتعتمد في تكاثرها على الشريط الوراثي الـ DNA الخاص بالبكتيريا وتحتوى على شريط دائري مزدوج من الـ DNA وتحتوى على جزء خاص يجعلها تتكاثر مستقلة داخل البكتيريا (Origin of replication) ، كما أنها تحتوى على جين خاص بصفة معينة كالمقاومة للمضادات الحيوية حتي يمكن عزل البلازميد من داخل البكتيريا بواسطة تنميتها على الوسط الغذائي الذي يوجد به المضاد الحيوي المناسب ويتم اختيار البلازميد حسب نوعية العمل المطلوب هل هو لاكثار الـ DNA فقط أو لانتاج بروتين معين.

ب- الفاج (Phage) :

وهو فيروس يصيب البكتيريا حيث انه يتكاثر داخل البكتيريا ويمكن استخدامه كوسيط لنقل الجينات.

4- وجود الفيروس أو البكتيريا التي ستنتج البروتين المطلوب :

من أهم الفيروسات المستخدمة لانتاج مواد مشخصة هو فيروس يصيب الحشرات ويسمى الباكيولو وتعتبر بكتيريا الايشيربشيا كولاي من أهم البكتيريا التي تستخدم حيث انه يوجد بلازميد وسيط لكل نوع من الفيروسات او البكتيريا المستخدمة به محفز (Promotor) وهو جزء من التتابع النيوكلوتيدي من الشريط الوراثي الخاص بالفيروس او البكتيريا للتعرف عليه عند إدخاله بها فيندمج بالشريط الوراثي ويتم التكاثر داخل البكتيريا او الفيروس وإنتاج البروتين المطلوب.

إستراتيجية إنتاج مستحضرات تشخيصية باستخدام فيروس الباكيولو :

1- إعداد الجين المطلوب باستخدام إنزيمات القطع.

2- إعداد البلازميد الخاص بنقل الجين (Transfer Vector) بقطعه بنفس الانزيم المستخدم لقطع الجين حيث يتم فتح دائرة البلازميد ومن البلازميدات المستخدمة PVL 1993 أو PVL 1992 .

3- باستخدام إنزيم اللصق (Ligase) نستطيع لحام أطراف الجين (وهو جزء من الشريط الوراثي) في الفراغ بحلقة البلازميد فيتحول البلازميد الى دائرة مرة أخرى تحتوى على الجين المطلوب (Cloned gene) .

4- يتم عدوي خلايا الزرع النسيجي للحشرات مثل (SF9) وهي خلايا حشرة (Spodoptera Frugiperda) بالفيروس المضاد للباكيولو ويتم في نفس الوقت إدخال البلازميد المحتوى على الجين باستخدام الكيتس المختلفة المنتجة من الشركات المتخصصة.

5- يندمج البلازميد المحتوى على الجين مع المادة الوراثية لفيروس الباكيولو ويتكاثر الفيروس منتجا البروتين المطلوب.

6- تنما الفيروسات على خلايا حشرات باستخدام تقنية (Plaquing) وذلك لاختيار الفيروس المحمل بالجين.

7- يتم اكثار الفيروس (Recombinant Virus) في خلايا الحشرات.

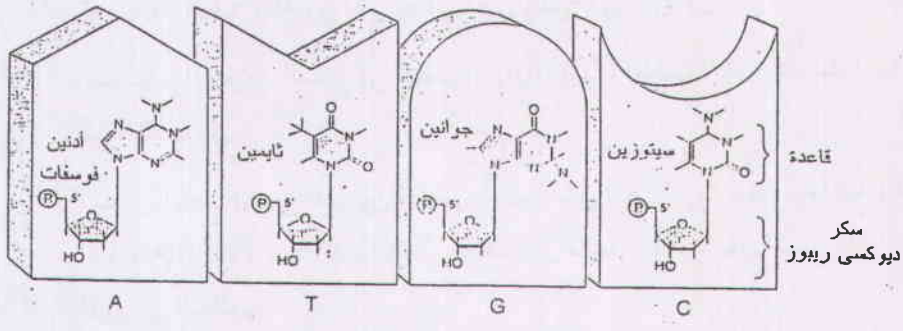
8- يتم تحليل البروتين الناتج للكشف عن البروتين المطلوب باستخدام تقنيات الويسترن بلوت (Western Blot) والـ (SDS-PAGE) .

9- يتم تحديد الوقت والعدوي التي تعطي أعلى إنتاج من البروتين.

10- يستخدم البروتين المنتج في تبطين (Coating) أطباق الاليزا لاستخدامها في التشخيص.

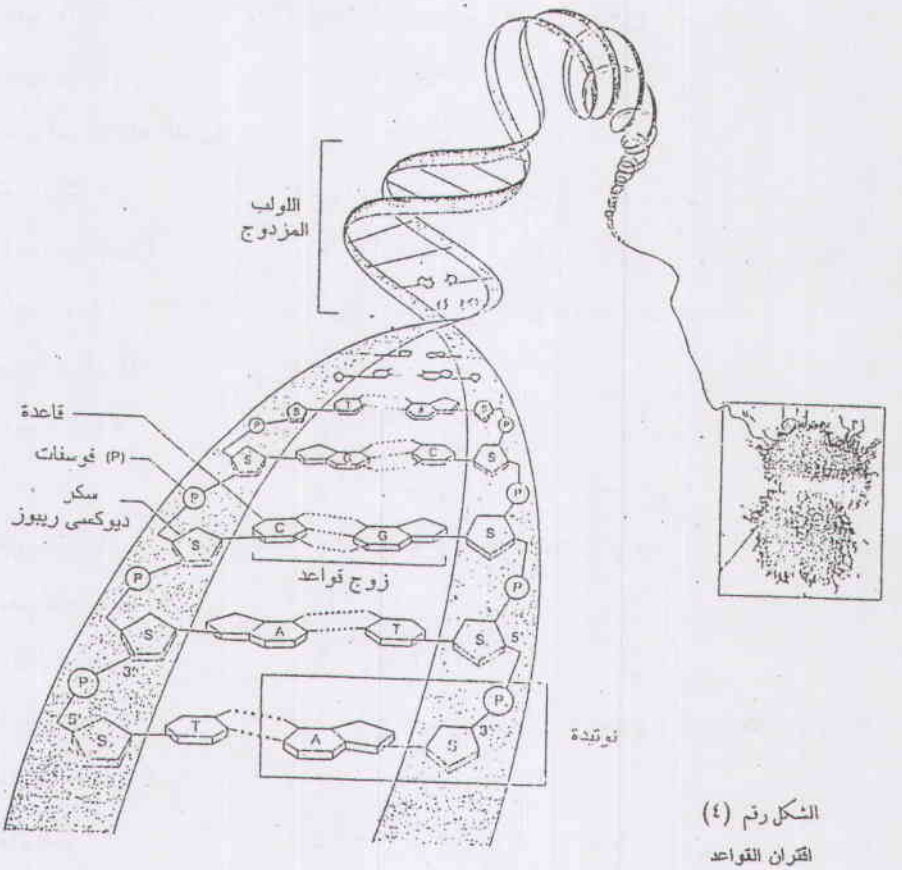
11- يمكن الحصول على البروتين المطلوب بكمية كبيرة عن طريق حقن يرقة حشرة (Spodoptera Frugiperda) بالفيروس فيحدث تعبير عن الجين بانتاج البروتين المطلوب .

12- نجحت هذه الطريقة لتحضير مواد مشخصة آمنة وسهلة واقتصادية.



صورة تخطيطية لقواعد الدنا الأربعة

لاحظ أن هناك ذرة كربون (لم توضح بالرسم) فى كل نقطة تتقاطع فيها رابطتان كيماويتان أو أكثر (الروابط مبنية فى صورة خطوط) . المواقع التى لا تظهر بها ذرة فى نهاية الرابطة تعنى وجود ذرة أيدروجين



الشكل رقم (٤)
اقتران القواعد
فى جديلتى اللوب المزدوج

ويمكن وضع الجدول في صورة تبين الكودونات المشفرة لكل من الاحماض الامينية العشرين :

الحمض الأميني	الكودونات المشفرة
أرجنين (أرج)	أ ج أ – أ ج ج – س ج أ – س ج ج – س ج ث
أسبارجين (أسب)	أ أ ث – أ أ س
حمض أسباراتيك (أسن)	ج أ ث – ج أ س
الانين (الا)	ج س أ – ج س ج – ج س ث – ج س س
أيزوليوسين (أيزو)	أ ث أ – أ ث ث – أ ث س
برولين (برو)	س س أ – س س ج – س س ث – س س س
تريبتوفان (ترب)	ث ج ج
تيروسين (تير)	ث أ ث – ث أ س
ثريونين (ثر)	أ س أ – أ س ج – أ س ث – أ س س
جلايسين (جلا)	ج ج أ – ج ج ج – ج ج ث – ج ج س
حمض جلوتاميك (جلو)	ج أ أ – ج أ ج
جلوتامين (جلن)	س أ أ – س أ ج
سيرين (سير)	أج أ – أ ج س – ث س أ – ث س ج – ث س ث – ث س س
سيستيين (سيس)	ث ج ث – ث ج س
فالين (فا)	ج ث أ – ج ث ج – ج ث ث – ج ث س
فينايل الانين (فينا)	ث ث ث – ث ث س
لايسين (لاي)	أ أ أ – أ أ ج
ليوسين (ليو)	ث ث أ – ث ث ج – س ث أ – س ث ج – س ث ث – س ث س
ميثايونين (ميثا)	أ ث ج (ويعمل أيضا كاشارة بدء)
هستدين (هس)	س أ ث – س أ س

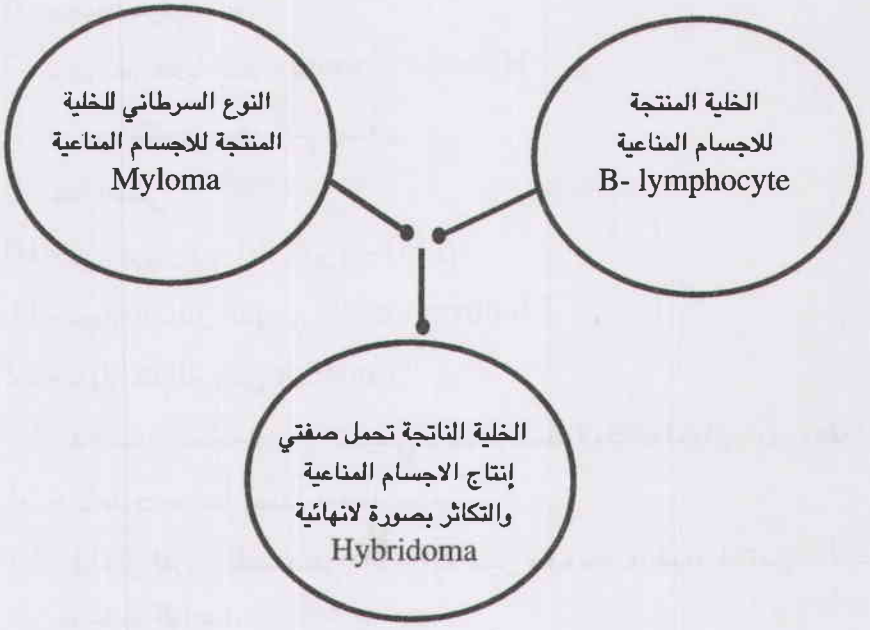
الانزيم	البكتريا المنتجة	التتابع على الجديلتين وموقع البتر	الاطراف بعد البتر
Alu I	Arthrobacter luteus	هَ – أ ج . س ث س ث . ج أ – هَ	جافة
EcoRI	Escherichia coli	هَ – ج . أ أ ث ث س س ث ث أ أ . ج – هَ	لزجة
HaeIII	Haemophilus aegytius	هَ – ج ج . س س س س . ج ج – هَ	جافة
HhaI	Haemophilus haemolyticus	هَ – ج س ج . س س . ج س ج – هَ	لزجة
Hind III	Haemopilus influenzae	هَ – أ. أ ج س ث ث ث ث س ج أ . أ	لزجة
Hpa I	Haemophilus parainfluenzae	هَ – ج ث ث . أ أ س س أ أ . ث ث ج هَ	جافة
Mbo I	Moraxeila bovis	هَ – . ج أ ث س س ث أ ج . – هَ	لزجة
Not I	Nocardia otitidis-conarium	هَ – ج س . ج ج س س ج س س ج س س ج ج . س ج – هَ	لزجة
Pst I	Providencia stuarni	هَ – س ث ج س أ . ج ج . أ س ج ث س – هَ	لزجة
Taq I	Thermus aquaticus	هَ – ث . س ج أ أ ج س . ث – هَ	لزجة

إنتاج الأجسام المناعية وحيدة النوع والصفة

إنتاج الأجسام المناعية وحيدة النوع والصفة
Monoclonal Antibody Production

إعداد
أ. د. رقية محمد عثمان
رئيس بحوث ورئيس قسم بحوث اللاهوائيات
بمعهد بحوث الأمصال واللقاحات البيطرية
العباسية – القاهرة

الأجسام المناعية وحيدة النوع والصفة هي اجسام يتم إنتاجها عن طريق إندماج خلية طبيعية منتجة للاجسام المناعية مع نواة مثيلتها السرطانية، والخلية الناتجة من تلك العملية تحمل صفة إنتاج الاجسام المناعية وصفة التكاثر بصورة لانهائية ويكون الناتج أن كل خلية في المركب تتماثل تماثلا تاما مع الأخرى.



نظرية إنتاج الاجسام المناعية وحيدة النوع والصفة :

إعتمد العالمان كوهلر وملستين على النظرية الاختيارية لمجاميع الخلايا Clone theory selecting وهذه النظرية توضح أنه عند حقن أي أنتيجين في داخل جسم الكائن الحي يتحد كل جزيء من ذلك الانتيجين مع خلية واحدة فقط من خلايا إنتاج الاجسام المناعية Lymphocyte . هذه الخلية لو تم فصلها وتكاثرها بطريقة مافينتج عن ذلك أجسام مناعية ذات نوع وصفة واحدة.

الأجهزة والمواد المستخدمة في إنتاج الاجسام المناعية وحيدة النوع والصفة :

1- حضانة غاز ثاني أكسيد الكربون (نسبة الغاز داخل الحضانة 5٪)

2- خزان سائل نيتروجين.

3- كابينة معقمة.

4- أجهزة طرد مركزي مبرد وعادي.

5- مجهر مقلوب لفحص خلاي الزرع النسيجي Inverted microscope

6- مجهر ضوئي عادي.

7- جهاز عد خلايا الدم Haemocytometer

8- مرشح بكتيري معقم كبير وصغير.

9- حمام مائي.

10- ديب فريزر (- 20 م) و (- 80 م).

11- جهاز التحليل الكهربي Electrophoresis .

12- جهاز نقل البروتين Transblot

13- فلاسكات معقمة للزرع النسيجي باحجام مختلفة وكذلك أطباق بتري معقمة.

14- ماصات مدرجة معقمة مقاسات مختلفة.

15- أطباق للزرع النسيجي 96 و 24 عين معقمة. وأطباق للاليزا 96 عين مسطحة القاعدة.

16- ميكروبيبت قناة واحدة باحجام مختلفة.

17- ميكروبيبت 8 أو 12 قناة

18- أنابيب سنترفيوج مقاسات 15 سم و 50 سم.

19- أنابيب إبندورف مقاسات مختلفة.

20- أقماع بلاستيك صفراء وزرقاء.

21- أنابيب بغطاء تتحمل التبريد لدرجات عالية.

22- وسط غذائي لخلايا (RPMI-1640)

23- مصل اجنة عجول Foetal calf serum

24- زلال مصل العجول Bovine serum albumin

25- بولي إثيلين جليكول نو وزن جزيئي 1000-1500 .

26- توين 20.

27- جلوتامين - صوديوم بير وفات.

28- بنسلين وستربتوميسين.

29- الكيماويات الخاصة بالاليزا.

30- الكيماويات الخاصة بالتحليل الكهربائي.

31- الكيماويات الخاصة بالتحليل الكهربي اللطعي Western blot

32- هيبوزانثين - ثيمدين - أمينوبترين.

33- فئران سويسرية نوع بالب سي BAL B/C

34- خلايا سرطانية نوع SP2/O

35- داي ميثيل سلفوكسيد (DMSO)

36- بيرستان (Pristan)

37- مساعد الماصات الكهربائي.

38- أجسام مناعية ضد الفأر Conjugate

الاوساط الغذائية والمحاليل المستخدمة :

1- الوسط الغذائي RPMI-1640 الكامل ويتكون من :

الوسط الغذائي RPMI-1640 المعقم مضاف اليه

10٪ مصل اجنة العجول

1٪ 2 جزئي ل - جلوتامين معقم.

1٪ بيروفات الصوديوم المعقم.

5 وحدة دولية / مللي بنسلين وستربتوميسين.

2- الوسط الغذائي RPMI-1640 الغير كامل :

نفس مكونات الكامل ولكن بدون مصل اجنة العجول.

3- مركب الثيميدين (HT) + الهيبوزانثين (100 قوة).

38.75 ملليجرام ثيميدين

136.10 ملليجرام هيبوزانثين.

100 مللي ماء مقطر

يعقم بالترشيح ويحفظ درجة تبريد (- 20 م).

4- مركب الامينوبترين (A) (100 قوة) :

1.76 ملليجرام / 100 مللي ماء مقطر

يعقم بالترشيح ويحفظ عند درجة تبريد (- 20م).

5- وسط غذائي ثيمدين + هيبوزانثين + أمينوبترين (HAT) ويتكون من :

الوسط الغذائي الكامل RPMI-1640

يضاف اليه كل من مركب الثيمدين هيبوزانثين ومركب الامينوبترين ليصبح المركب (1 قوة).

6- الوسط الغذائي هيبوزانثين + ثيمدين (HT) ويتكون من :

الوسط الغذائي RPMI-1640

مضاف اليه مركب هيبوزانثين والثيمدين ليصبح (1 قوة).

7- محلول بولى ايثلين جليكول 50٪ ويتكون من :

وزن البولى إثيلين جليكول المحسوب.

مذاب في نفس الحجم من الوسط الغذائي RPMI-1640 الغير كامل ويعقم بالاوتوكلاف عند الاستخدام فقط.

8- الوسط الغذائي لتجميد الخلايا ويتكون من :

10٪ داي ميثيل سلفوكسيد.

40٪ مصل أجنة العجول.

50٪ الوسط الغذائي RPMI-1640 الغير كامل.

يعقم بالترشيح ويوزع ويحفظ عند درجة تبريد (-20م).

9- مصل زلال العجول في محلول الملح الفوسفاتي :

يستخدم بنسبة 2٪.

10- محلول الملح الفوسفاتي PBS ويتكون من :

كلوريد الصوديوم 8 جرام

فوسفات ثنائي البوتاسيوم 1.21 جرام.

فوسفات البوتاسيوم القاعدي 0.34 جرام.

تذاب الكميات في 1 لتر ماء مقطر وتضبط درجة الأس الهيدروجيني عند 7.2 ثم يعقم بالاوتوكلاف.

يضاف اليه 0.05٪ توين 20 ويستخدم كمحلول غسيل وتخفيف في إختبار الاليزا.

طريقة إنتاج الاجسام المناعية وحيدة النوع والصفة :

وتتم خلال 3 مراحل :

أ- حقن الفئران.

ب- عمل الاندماج للخلايا.

ت- عمل التخفيف للاجسام المناعية المنتجة.

أ- حقن الفئران :

1- يخلط الانتيجين بالمساعد فروندز الغير كامل Incomplete Freund's adjuvant بنسبة متساوية لكل من الانتيجين والمساعد.

2- يحضر على الاقل ثلاثة من الفئران السويسرية عمر 6-8 أسابيع ويحقن كل فأر بجرعة 1 سم من خليط الانتيجين والمساعد في داخل البريتون.

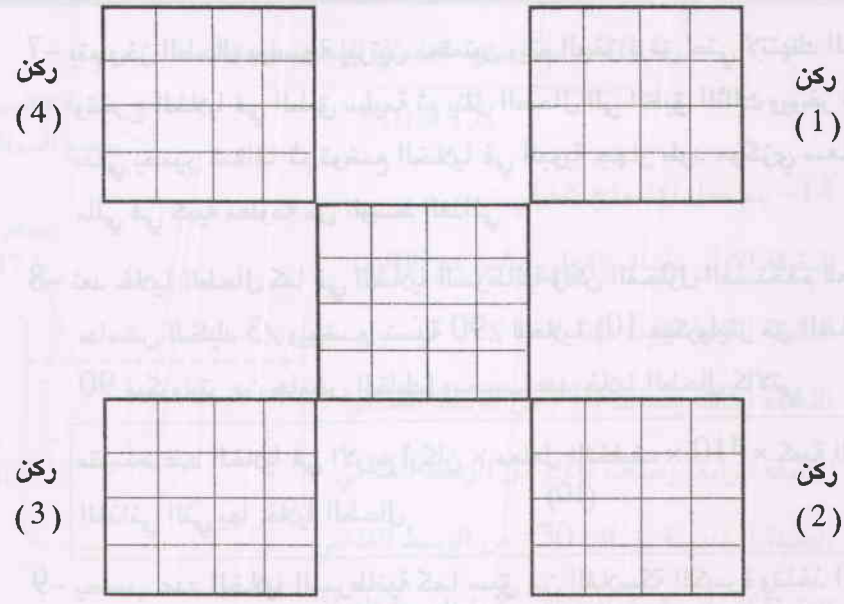
3- تعطى الجرعة الثانية بعد 15 يوم من الجرعة الاولى بنفس الكمية وطريقة الحقن.

4- تعطى الجرعة الثالثة بعد 15 يوم من الثانية وقبل عمل الاندماج بثلاثة أيام ولكن بالانتيجين فقط وبنفس الكمية وطريقة الحقن.

ب- طريقة عمل إندماج الخلايا Fusion :

1- قبل عمل الإندماج بخمسة أيام تحضر الخلايا السرطانية المحفوظة في السائل النيتروجيني وتوضع في حمام مائي 37م لتذوب. ثم تدور بعد ذلك في جهاز الطرد المركزي 1000 لفة/دقيقة لمدة خمس دقائق ويتخلص من السائل العلوى ثم توضع الخلايا في فلاسكة الزرع النسيجي الموجود بها 5 مللي من الوسط الغذائي الكامل RPMI-1640 وتفحص بمجهر الزرع النسيجي للتأكد من حيوية الخلايا . ثم توضع بعد ذلك في حضانة غاز ثاني أكسيد الكربون وفي اليوم التالي يضاف الي الخلايا كمية 5 مللي من الوسط الغذائي RPMI-1640 الكامل وتوضع ليوم آخر بالحضانة.

2- يتم عد الخلايا السرطانية بعداد الدم بأن يؤخذ 15 ميكروليتر من الخلايا وتخلط مع نفس الكمية من التريبان الازرق وتوضع في المربع الاوسط لشريحة عداد الدم وتعد الخلايا في الاربع أركان ويؤخذ متوسطها كما في الرسم.



ركن (1) ركن (4) ركن (2) ركن (3)

تعد الخلايا الحية فقط حيث أن الخلايا الحية تكون غير ملونة والخلايا الميتة تأخذ اللون الازرق. ويحسب عدد الخلايا الموجودة في المليتر الواحد بالمعادلة التالية :

متوسط عدد الخلايا في الأركان الاربعة × معامل التخفيف × 10^{4} = عدد الخلايا/مللي (2)

3- تنقل الكمية من الفلاسكة التي تحتوى على عدد خلايا 1-2 × 10^{4} خلية الى فلاسكة زرع نسيجي تحتوى على 100 مللي من الوسط الغذائي RPMI-1640 الكامل بحيث يصل عدد الخلايا وقت الاندماج الى 1-7 × 10 خلية.

4- يقتل الفأر المحقون بطريقة فصل النخاع الشوكي ويشرح ويتم ذلك داخل الكابينة المعقمة وبادوات تشريح معقمة.

5- يأتي بثلاثة أطباق بتري معقمة ويوضع بكل منها حوالى 6 مللي من الوسط الغذائي الغير كامل RPMI-1640 .

6- يوضع الطحال في الطبق الأول وينزع منه الدهون والأغشية المحيطة به ثم ينقل الى الطبق الثاني نظيفاً.

18- تفحص الخلايا يوميا بمجهر خلايا الزرع النسيجي حتي تتجمع الخلايا مع بعضها (clone) ثم يعمل لها إختبار الاليزا لمعرفة تكوين الاجسام المناعية من عدمه.

19- العيون الايجابية لاختبار الاليزا تنقل الى أطباق 24 عين ويوضع في كل عين 0.5 مللي من الوسط الغذائي HT لان الامينوبترين سام للخلايا ثم توضع الاطباق في حضانة غاز ثاني اكسيد الكربون وبعد يومين تغذى الخلايا بكمية 0.5 مللي لكل عين من نفس الوسط الغذائي HT . وتترك لمدة أسبوعين ثم يعاد إختبار الاليزا والعيون الايجابية للاختبار يعمل لها تخفيف وايضا تتجمد الخلايا في تلك المرحلة.

طريقة عمل تخفيف مجاميع الخلايا Clone dilution :

تستخدم خلايا الغدة الثيمية Thymus gland cells في هذه الطريقة كالاتي :

1- يحضر فأر سويسري من نفس النوع عمر 3-4 أسابيع ويقتل كما سبق وتأخذ الغدة الثيمية بطريقة سليمة ومعقمة تطحن الغدة ويضاف اليها الوسط الغذائي الكامل RPMI ثم تصفى خلال مصفاه وتغسل بنفس الوسط الغذائي.

2- تعد الخلايا بنفس طريقة عدد خلايا الطحال وتوزع الخلايا في أطباق زرع نسيجي 96 عين بحيث تحتوى كل عين (0.1 مللي) على 5×10^6 خلية.

3- تأخذ الخلايا المندمجة من طبق الزرع النسيجي وتوضع كل عين من الطبق في فلاسكة الزرع النسيجي التي تحتوى على 10 مللي من الوسط الغذائي HT ثم توضع في الحضانة لمدة 24 ساعة.

4- يتم عدد تلك الخلايا بنفس طريقة عد الخلايا السرطانية وبواسطة الجدول (في الصفحة التالية) تأخذ الكمية من الفلاسكة التي تحتوى على عدد 200 خلية وتوضع في فلاسكة بها 5 مللي من الوسط الغذائي RPMI الكامل.

5- يوزع 2.5 مللي من الفلاسكة في الصفوف الثلاثة الاولى من الطبق الذي يحتوى على خلايا الغدة الثيمية ثم توضع كمية من الوسط الغذائي تعادل 2.5 مللي في الفلاسكة ثم توزع 2.5 مللي أخرى في الصفوف الثلاثة وهكذا تكرر نفس

العملية حتي ينتهى وضع الخلايا في الطبق، ثم توضع نقطة واحدة من الوسط الغذائي فقط في الثلاث صفوف الاخيرة من الطبق.

6- لو وجد أكثر من طبق به خلايا الغدة الثيمية دائما نبدأ بالكمية التي تحتوى على 200 خلية لكل طبق ونكرر كما سبق الطريقة حتي يتم لانتهاء من الاطباق كلها.

7- تفحص الاطباق يوميا بالمجهر حتي يرى تكوين مجموعة واحدة فقط في العين الواحدة One clone .

8- يجرى إختبار الاليزا للعيون التي بها مجموعة واحدة One clone والعيون الايجابية تجمد ويعمل لها مرة ثانية وثالثة تخفيف.

9- يجرى إختبار التحليل الكهربي اللطعي Western blot للتأكد من أن الاجسام المنتجة هي الخاصة بلانتيجين المقحون.

10- بعد التأكد من الوصول الى خط ثابت من الاجسام المناعية تزرع الخلاي في زجاجيات رو لمضاعفة كميتها وتجمد للحفظ في السائل النيتروجيني او تحقن في فئران لانتاج اجسام مناعية بطريقة سائل الاستسقاء.

متوسط عدد الخلايا في الاربع أركان	الكمية بالميكروليتر تحتوي على 200 خلية	متوسط عدد الخلايا في الاربع أركان	الكمية بالميكروليتر تحتوي على 200 خلية	متوسط عدد الخلايا في الاربع أركان	الكمية بالميكروليتر تحتوى على 200 خلية
1	80	25	3.2	49	1.6
2	40	26	3.1	50	1.6
3	27	27	3	51	1.6
4	20	28	2.9	52	1.5
5	16	29	2.8	53	1.5
6	13.3	30	2.7	54	1.5
7	11.4	31	2.6	55	1.5
8	10	32	2.5	56	1.4
9	8.9	33	2.4	57	1.4
10	8	34	2.4	58	1.4
11	7.3	35	2.3	59	1.4
12	6.7	36	2.2	60	1.3
13	6.2	37	2.2	61	1.3
14	5.7	38	2.1	62	1.3
15	5.3	39	2.1	63	1.3
16	5	40	2	64	1.3
17	4.7	41	2	65	1.2
18	4.4	42	1.9	66	1.2
19	4.2	43	1.9	67	1.2
20	4	44	1.8	68	1.2
21	3.8	45	1.8	69	1.2
22	3.6	46	1.7	70	1.1
23	3.5	47	1.7	71	1.1
24	3.3	48	1.7		

خطوات إختبار الاليزا :

1- تبطن الاطباق (96 عين مسطحة القاعدة) بالانتيجين ويحضن طول الليل بالحضانة أو الثلاجة العادية.

2- تغسل الاطباق بمليء العيون بمحلول الملح الفوسفاتي المضاف الى توين 20 ثلاث مرات.

3- يوضع محلول زلال مصل الابقار (2٪) في كل عين 200 ميكروليتر وتحضن الاطباق لمدة ساعة بالحضانة.

4- تغسل الاطباق كما سبق 3 مرات.

5- توضع الاجسام المناعية المراد إختبارها (50 ميكروليتر لكل عين) وتحضن في الحضانة لمدة ساعة.

6- تغسل الاطباق كما سبق.

7- توضع الاجسام المناعية ضد النوع (ضد الفأر) 50 conjugate ميكروليتر/عين بعد تخفيفها التخفيف المناسب وتوضع الاطباق في الحضانة لمدة ساعة.

8- تغسل الاطباق كما سبق.

9- يوضع الكاشف 100 substrate ميكروليتر/ عين وتترك الاطباق في الظلام لمدة 5 دقائق أو الى أن يظهر لون أزرق أو أصفر حسب نوع الكاشف.

10- يوقف التفاعل بوضع 50 ميكروليتر من 2 جزيء حامض كبريتيك مركز.

11- تقرأ الاطباق بقاريء الاليزا.

إختبار التحليل الكهربي اللطعي Western blot :

1- يحضر الجل المكون من (الاكريلاميد - بس اكريلاميد - صوديوم دودوسيل سلفات) للتحليل الكهربائي.

2- يمرر لانتيجن في الجل ويحلل كهربائيا.

3- تطبع بروتينات الانتيجن الموجودة على الجل على ورق نيتروسليلوز في جهاز نقل البروتين ويترك في ثلاجة طوال الليل.

4- يغسل ورق النيتروسليلوز ثلاث مرات بمحلول الملح الفوسفاتي المضاف الى توين 20 (0.5٪).

5- يوقف التفاعل لورق النتروسليلوز بوضعه في محلول يحتوى على 10٪ منزوع الدسم وتوين 20 لمدة ساعة على الهزاز.

6- يغسل الورق كما سبق 3 مرات بمحلول الملح الفوسفاتي.

7- توضع الاجسام المناعية المراد اختبارها على ورق النتروسليلوز وتوضع على الهزاز لمدة ساعة.

8- تغسل ثلاث مرات كما سبق.

9- توضع الاجسام المناعية ضد الفأر (goat anti-mouse conjugate) بعد تخفيفها حسب النشرة وتوضع على ورق النتروسليلوز وتوضع على الهزاز لمدة ساعة.

10- يغسل الورق ثلاث مرات كما سبق.

11- توضع المادة الكاشفة (أمينوبتردين) على ورق النتروسليلوز لمدة 5 دقائق.

12- يوقف التفاعل بالغسيل في محلول الملح الفوسفاتي (PBS).

13- الاختبار الايجابي يظهر خط واحد فقط بني اللون.

طريقة تجميد الخلايا (السرطانية او المندمجة) :

1- يأتي بالوسط الغذائي الخاص بالتجميد ويترك ليسيل في درجة حرارة الغرفة.

2- تعلم أنابيب التجميد (يكتب عليها كل المعلومات للخلايا مثل نوعها والتاريخ وإسم القائم بعملها ولأي نوع من الانتيجين) وهي موضوعة في الثلج.

3- تدور الخلايا (السرطانية أو المندمجة) عند 800-1000 لفة/دقيقة لمدة خمس دقائق.

4- يسكب السائل العلوى ويضاف للخلايا الوسط الغذائي الخاص بالتجميد بحيث يحتوى كل 1 مللي على عدد 1-2 × 10 7 خلية.

5- يوزع 1 مللي في كل أنبوبة والانابيب موضوعة في الثلج وحين الانتهاء من توزيع الخلايا توضع الانابيب في الفريزر (درجة تجمد - 20م) لمدة نصف ساعة.

6- تنقل الانابيب بعد ذلك الى فريزر أخر بدرجة تجمد - 80م أو - 100م فترة طول الليل ثم بعد ذلك تنقل الانابيب الى خزان السائل النيتروجيني.

7- الخلايا المحفوظة في السائل النيتروجيني يجدد زرعها وتجميدها مرة أخرى (مرة كل ستة أشهر).

إنتاج الاجسام المناعية وحيدة النوع والصفة بطريقة سائل الاستسقاء :

1- تحقن الفئران السويسرية 0.5 مللي في البريتون بمادة البرستان (6.2، 10، 14 تتراميثيل بنتاديكان) لوقف عمل الجهاز المناعي.

2- بعد ستة أسابيع من حقن تلك المادة تحقن خلايا الاجسام المناعية وحيدة النوع والصفة بنسبة 5 × 10 6 خلية لكل 1 مللي لكل فأر داخل البريتون.

3- تراقب الفئران يوميا الى اليوم السابع بعد حقن الخلايا حتي تمتلىء بطن الفأر بالسائل. في ذلك الوقت يسحب السائل بحقنة معقمة من بطن الفأر.

4- يوضع السائل في الحضانة 37م لمدة نصف ساعة حتي تتجلط المواد الصلبة فيه.

5- يأخذ السائل ويوضع عليه 30 ميكروليتر من 10٪ مادة الايدتا (EDTA) لكل مللي من السائل ويحضن عند درجة 2-8م لمدة أسبوعين.

6- يعاير السائل بالاليزا ثم يضاف اليه أزيد الصوديوم كمادة حافظة بتركيز 0.2٪.

7- يصفى السائل بالشاش المعقم ويوزع في أنابيب التجميد ويحفظ في درجة تجمد - 80م.

ملحوظة :

1- لايجمد سائل الاستسقاء درجة معايرة أقل من 4000/1

2- الاجسام المناعية وحيدة النوع والصفة المنتجة قوته 1 مللي منها تعادل 1000 مللي من الاجسام المنتجة بطريقة الزرع النسيجي.

إختبار المكمل المثبت

إختبار المكمل المثبت

إعداد
أ. د. سميرة عبدالسلام الكيلاني
رئيس بحوث – قسم الحمى القلاعية

المواد المستخدمة : 1) المحاليل :

* محلول الفيرونال :

(أ)

- بيكربونات الصوديوم 0.75 في ماء مقطر بارد
- حمض البوريك 0.35 جم في ماء مقطر دافيء
- صوديوم كلوريد 23.98 جم
- بربيتونات الصوديوم 0.90 جم
- كلوريد الماغنسيوم 0.30 جم
- كلوريد الكالسيوم 0.06
- ويكمل 600 مل ماء مقطر مرتين

(ب)

جيلاتين 3 جم (ويقلب في درجة 150م)

ماء مقطر 2400 مل

المحلول (ب)

محلول (أ) + محلول (ب)

ويرشح ثم يقاس الأس الهيدروجيني (7.4)

محلول الألسفر :

ويتكون من : ديكستروز 20.5 جم
سترات الصوديوم 8 جم
حمض الستريك 55. جم
كلوريد الصوديوم 4.20 جم

في ماء مقطر مرة واحدة 1000 مل ثم يرشح.

إختبار المكمل المثبت

التعريف والهدف من التجربة :

أن تجربة المكمل المثبت من التجارب العملية التي تستخدم في تشخيص الامراض الفيروسية والبكتيرية حيث أنها تكشف عن وجود مسببات الامراض وايضا تكشف عن وجود الاجسام المناعية المضادة لهذه الامراض في سيرم الحيوانات المختلفة

الفكرة الاساسية للتجربة :

الفكرة التي بنيت عليها التجربة هي عندما يحدث إتحاد بين الانتيجين والاجسام المضادة الخاصة به فهذ الاتحاد يثبت المكمل المستخدم وبذلك لايحدث تكسير لكرات الدم الحمراء المستخدمة ككاشف للتجربة حيث أنه عندما يحدث تكسير لكرات الدم الحمراء فهذا يدل على عدم وجود المادة البيولوجية المراد الكشف عنها (الانتيجين – الاجسام المضادة).

1- الادوات المستخدمة في التجربة :

1- أطباق خاصة بالتجربة 96 عين شكل U

2- ماصات ميكرومتر.

3- جهاز طرد مركزي.

4- جهاز هزاز للاطباق.

5- حضانه بكتريولوجية عن درجة حرارة 37م.

2- كاشف إختبار المكمل المثبت (مركب تكسير كرات الدم الحمراء)

يتكون من :

أ- كرات الدم الحمراء للاغنام :

كميات متساوية من دم الاغنام ومحلول السيفرز المعدل تخلط جيدا معا ويدور هذا الدم عند 1500 دورة في الدقيقة لمدة 15 دقيقة ثم يغسل بمحلول فيرونال عدة مرات حتي تصبح الطبقة العليا رائقة ثم يستعمل كمعلق 2٪.

الاجسام المناعية المضادة لكرات الدم الحمراء (مضادة لكرات دم الاغنام الحمراء) الممنع لكرات الدم الحمراء للاغنام يحضر في الارانب.

معايرة الاجسام المناعية المضادة لكرات الدم الحمراء

تخفيف الاجسام المناعية المضادة لكرات الدم الحمراء	100/1 200/1 ——— 12800/1 150/1 300/1 ——— 19200/1	المحكم (كنترول)
كميات المواد المستخدمة		
الاجسام المناعية المضادة لكرات الدم الحمراء	25 ميكروليتر	25 ميكروليتر
2٪ كرات دم حمراء للاغنام	25 ميكروليتر	25 ميكروليتر
المكمل 10/1	25 ميكروليتر	-----
محلول فيرونال	50 ميكروليتر عند 37م لمدة دقيقة	75 ميكروليتر

النتيجة النهائية : إن أكبر تخفيف يعطى 100٪ تكسيرات الدم الحمراء يعتبر كوحدة عيارية واحدة من الاجسام المضادة لكرات الدم الحمراء.

* مثال : اذا كان التخفيف 2400/1 تستخدم 4 وحدات منه = 2400/1 × 4 = 600/1 يستخدم في هذا الاختبار.

* لتحضير مركب تكسير كرات الدم الحمراء يضاف كميات متساوية من 2٪ من كرات الدم الحمراء = 4 جرعات من الحد الادني لعيارة الاجسام المضادة.

المكمل هو : مصل طازج طبيعي من الارانب الهندي خالي من الامراض ويحفظ عند درجة حرارة – 70م في عبوات صغيرة.

معاير المكمل في وجود الانتيجن :

– المكمل : 25 ميكروليتر كل تخفيف 1٪، 1.5٪، 2٪، 2.5٪ ——— 6٪

الانتيجن : 25 ميكروليتر (من أول تخفيف مستخدم).

محلول فيرونال 25 ميكروليتر

مركب تكسير كرات الدم الحمراء 50 ميكروليتر

المصل الممنع : 25 ميكروليتر من تخفيف 10/1 .

المكمل : 1٪، 1.5٪، 2٪، 2.5٪، 3٪، 3.5٪ ـــــ 6٪.

- محلول فيرونال 25 ميكروليتر
- مركب تكسير كرات الدم الحمراء 50 ميكروليتر ـــ يحضن عند 37 لمدة دقيقة.

عند قراءة المعايرة نجد أن تخفيف يعطى شكل على هيئة زرار.

تخفيف الانتيجين / كمية المواد المستخدمة	غير مخفف/2، 1/4، 1/8، 1/16، 1/32، 1/64	المحكم	
		مع المكمل	بدون المكمل
الانتيجين	25 ميكروليتر	غير مخفف	غير مخفف
المصل المناعي	25 ميكروليتر	25 ميكروليتر	25 ميكروليتر
المكمل (وحدة واحدة)	25 ميكروليتر	ـــ	ـــ
محلول فيرونال	ـــ	25 ميكوليتر	ـــ
مركب تكسير كرات الدم الحمراء	50 ميكروليتر تحضن عند 37 لمدة 15 دقيقة	25 ميكوليتر	50 ميكوليتر

النتيجة : أكبر تخفيف يعطى 25-50٪ تكسير لكرات الدم الحمراء.

الطرق المختلفة لعزل الفيروسات على البيض المخصب

تركيب بيض اجنة الدجاج

Fig. 1. Structure of the embryonating egg (After Hawkes [2]).

1- غشاء قشرة البيضة :

غشاء ليفى خشن يقع مباشرة تحت قشرة البيضة يغلف كل السطح الداخلي للبيضة ويكون الغرفة الهوائية عند السطح العريض للبيضة.

كل من غشاء قشرة البيضة وقشرة البيض يساعدا على حفظ سلامة البيضة من الميكروبات ويسمحا بانتشار الغازات من والى البيضة.

2- الغشاء اللقانقي CAM :

يقع مباشرة تحت غشاء قشرة البيضة وهو غنى بالاوعية الدموية ووظيفته تبادل الغازات وهو بمثابة الجهاز التنفسي للجنين.

وأثناء مرحلة نمو الجنين فان هذا الغشاء يكون تجويف كبيرا نسبيا يسمى الكيس الالنتوسي يحتوى على 5-10 ملى من السائل الالنتوسي.

3- الغشاء الامنيوسي :

يحاط الجنين بغشاء يسمى الغشاء الامنيوسي ويحتوى على 1-2 ملي من السائل الامنيوسي.

4- كيس المح :

يقع كيس المح تقريبا في منتصف البيضة ويتصل بالجنين ووظيفته مد الجنين بالمواد الغذائية اللازمة للنمو.

طرق حقن البيض :

توجد 4 طرق رئيسية للحقن وهي كالاتي :

1- الحقن في التجويف الالنتوسي.

2- الحقن في كيس المح.

3- الحقن على الغشاء اللقانقي.

4- الحقن في التجويف الامنيوسي.

1- الحقن عن طريق التجويف الالنتوسي :

١-الحقن عن طريق التجويف الألنتوسى

Fig. 3. Allantoic route of inoculation, Method B (After Hawkes [2]).

3- الحقن عن طريق الغشاء اللقانقي :

* يجب أن يكون عمر الاجنة من 10-11 يوم.
* يتم عمل علامة على جانب البيضة على طول المحور الطولي وفي منتصف المسافة تقريبا حيث توجد الاوعية الدموية.
* يتم وضع البيضة افقيا ويظهر الجزء العلوى والجنبي من البيضة.
* يتم عمل ثقبين احدهما في منتصف الغرفة الهوائية والاخر على جانب البيضة بحيث لا يخدش غشاء قشرة البيضة.
* بواسطة الكشاف الكهربي وباستخدام جهاز الشفط يتم انزال الغشاء الالنتوسي عن طريق شفط الهواء من الثقب الموجود باعلى البيضة (يتم سحب الهواء من الغرفة الهوائية وتكوين غرفة هوائية زائفة جديدة فوق الغشاء الالنتوسي).
* يتم اغلاق الثقب الموجود باعلى البيضة بشمع البرافين ويحتفظ بوضع البيضة افقيا.
* باستخدام حقنة انسولين يتم حقن 1.-2. من مادة الحقن وذلك بانزال الابرة رأسيا داخل قشرة البيضة.
* يتم اغلاق الثقب ويتم وضع البيض في الحضانة لمدة 5-7 أيام مع الاحتفاظ بوضعه افقيا طوال فترة التحضين.
* تستخدم هذه الطريقة في تحضير لقاحات التهاب الحنجرة والقصبة الهوائية المعدي، الجدري ، الربو ، والجمبورو.

٤-الحقن عن طريق الكيس الأمنيوسى

Fig. 6. Amniotic route of inoculation (After Hawkes [2]).

4- الحقن عن طريق الكيس الامنيوسي :

* يجب أن يكون عمر الاجنة من 10-11 يوم
* التأكد من وضع البيضة رأسيا بحيث تكون الغرفة الهوائية لأعلى.
* يتم تطهير السطح العلوى للبيضة.
* يتم عمل علامة على مكان الجنين.
* يتم عمل ثقب أعلى الغرفة الهوائية.
* باستخدام حقنة ذات أبرة طولها 38 مم يتم توجيه الابرة ناحية مكان الجنين (باستخدام الكشاف الكهربي) ويتم حقن 1. - 2. مل من مادة الحقن.
* يتم اغلاق الثقب ويتم وضع البيض في الحضانة لمدة 2-4 أيام.
* تستخدم هذه الطريقة في تحضير لقاحات النيوكاسل والالتهاب الشعبي.

أسم الفيروس	عمر الاجنة عند الحقن (يوم)	طرقية الحقن المناسبة	تاثير الفيروس على الاجنة	وقت التجميع - الاجزاء المتجمعة (ساعة)
النيوكاسل (هتشنر ، لاسوتا)	10-9	التجويف الالنتوسي	نقط نزفية على الرأس والارجل خاصية التلازن الدموي	96 السوائل الجنينية
كوماروف	10			72 السوائل الجنينية
الالتهاب الشعبي	10	التجويف الالنتوسي	توقف نمو الجنين التواء الجنين على نفسه وجود يوريا في الكلي والحالب	36 السوائل الجنينية
التهاب الحنجرة والقصبة الهوائية	12-10	الغشاء اللقانقي	توقف نمو الجنين وجود نقط معتمة متجمعة على الغشاء اللقانقي	5 أيام الغشاء اللقانقي
التهاب غدة فابريشيا	12-10	الغشاء اللقانقي	نفوق الاجنة من 3-5 يوم الارتشاح المائي لمنطقة البطن وانتفاخها احتقان جلد الجنين مع وجود نقط نزفية مناطق نزفية وتنكرزية على الكبد شحوب لون القلب والطحال وجود مناطق محتقنة على الغشاء اللقانقي	5 أيام الاجنة منزوعة الرأس والارجل
الربو	12-10	الغشاء اللقانقي	احتقان وتقزم الجنين تورم الكبد والطحال مع وجود نقع نكرزية بقع بيضاء على الغشاء اللقانقي	5 أيام الاجنة منزوعة الرأس والارجل والغشاء اللقانقي

أسم الفيروس	عمر الاجنة عند الحقن (يوم)	طرقية الحقن المناسبة	تأثير الفيروس على الاجنة	وقت التجميع - الاجزاء المتجمعة (ساعة)
الارتعاش الوبائي	7-5	كيس المح	ضمور في العضلات عدم التوافق الحركي العضلي	12 يوم المخ والبنكرياس
جدري الطيور	12-10	الغشاء اللقانقي	سمك الغشاء مع وجود مناطق معتمة منتشرة عليه (pock le-sions)	5 أيام الغشاء اللقانقي
الالتهاب الكبدي للبط	11-10	الغشاء اللقانقي	نفوق الاجنة تورم الجنين نتيجة الارتشاح المائي واحتقانه يميل لون الكبد الى الاخضرار مع وجود بقع نزفيه على الكبد تضخم الطحال واحتقانه مع تغير لون السوائل الجنينية الى اللون الاخضر او الذهبي	3 أيام السوائل الجنينية الاجنة منزوعة الرأس والارجل بالاضافة الى الغشاء الكوريوالنتوسي
طاون البط	10 يوم	التجويف الالنتوسي	نفوق بعض الاجنة تورم الاجنة ارتشاح مائي خاصة في منطقة الرأس انزفة شديدة في تجويف الجنين مع تضخم في الكبد والطحال مع وجود بؤر نزفية ونكرزية حمراء	5 أيام السوائل الجنينية

إستخدام تقانة الاليزا

إستخدام تقانة الاليزا

إعداد
أ. د. سعاد محمد سليمان
رئيس قسم اللقاحات الجدرية

إختبار الاليزا ENZYME-LINKED IMMUNOSURBENT ASSAY

يعتمد هذا الاختبار على العلاقة التداخلية بين الجسم المناعي والميكروب (الانتيجين) ANTIGEN-ANTIBODY INTERACTION

ويستخدم هذا الاختبار لتحديد نوع الجسم المناعي وذلك باستخدام ميكروب معروف Known antigen أو التعرف على نوعية الميكروب (الانتيجينات المختلفة) بإستخدام اجسام مناعية معروفة وذلك من خلال انواع من الاجسام المناعية المرتبطة بمادة مشعة او إنزيم او مادة عاكسة Florescenees

تم تنمية وتطوير هذا الاختبار بداية من عام 1971م ، وهو إختبار عالي الحساسية Sensitive and accurate وغالبا مايستخدم أي من هذه الانزيمات.

1- Alkaline phosphatase.

2- Horseradish peroxidase

3- B galactosidase

المرتبطة باجسام مناعية أو الميكروب مضاف اليه مادة كروموجينية غير ملونة Chromogenie substance تتحول الى مادة ملونة عند الاستخدام باضافة ماء الاوكسيجين.

ويتكون إختبار الاليزا من انتيجين ملتصق بجدار الطبق 96 Well plate . يمنع الالتحام الغير متخصص nonspecific باضافة blocking buffer ثم تضاف

لاجسام المناعية ثم الاجسام المناعية الملتصقة بالانزيم Labeling enzyme ثم تضاف مادة Substrate حيث يتم تغيير اللون.

أنتيجين + أجسام مناعية + مادة كاشفة (إنزيم + Substrate)

وهذا الإختبار يحتاج الى Materials and preparation .

ويعتمد بروتوكول هذا الاختبار على :

1- تحضير الانتيجين (وتركيزه).

2- معايرة الانتيجين (لتحديد الكمية التي يمكن استخدامها في هذا الاختبار ويمكن استخدام التخفيفات 1-50 أو 1-1000) .

3- سيرم الضوابط (سالب وموجب) Negative and positive control sera

4- معايرة HRP conjugate

خطوات التجربة لتحديد نوعية الاجسام المناعية :

1- يتلـــصق الانتيجين في الطبق المتعدد العيون باستخدام الالتصاق السلبي passive adsorption

2- ازالة الانتيجين الزائد بغسيل الطبق.

3- سد العيون باستخدام البيومين العجول Bovine Serum Albumin (100 ul) في كل عين. ثم يوضع الطبق في درجة حرارة الغرفة لمدة 2 ساعة.

4- يغسل الطبق لازالة المادة الزائدة من البيومين العجول (Blocking bulfer)

5- يضاف 100 ميكرون من العينة (السيرم) ويوضع الطبق في درجة حرارة 37م لمدة ساعة.

6- يغسل الطبق لازالة المادة الزائدة من العينات المضافة.

7- يضاف 100 ميكرون من المادة الكاشفة HRP conjugate .

8- يوضع الطبق في الحضانة 37م لمدة ساعة.

9- يغسل الطبق لازالة المادة الزائدة HRP conjugate .

10- يقرأ الطبق باستخدام جهاز Spectrophotometer القياس الضوئي باستخدام فلتر 492 .

ملحوظة : يجب أن يحتوى الاختبار على عينات ضوابط سالبة وموجبة.

الإختبارات المصلية المستخدمة في تشخيص الامراض البكتيرية والفيروسية

إختبار التراص Agglutination test

الاختبارات المصلية المستخدمة في تشخيص الامراض البكتيرية والفيروسية

اختبار التراص Agglutination test

إعداد

أ. د. مجدي محفوظ عوض

رئيس بحوث ورئيس قسم بحوث الامصال والانتيجينات البكتيرية

مقدمة :

الانتجن : أي مادة غريبة تدخل جسد الكائن الحي – ممكن أن تكون غير ضارة مثل بروتين المصل أو ضارة كالبكتريا والفيروسات.

الاجسام المناعية : وهي اجسام بروتينية .I.g تتكون بمعرفة الجهاز المناعي للحيوان عند غزوة بالاجسام الغريبة (الانتيجينات).

التراص : ويسمى أيضا التلازن أو التجمع Agglutination

تحت ظروف معينة يمكن أن تتجمع الاجسام المناعية على الانتجن المسببة لها – وليس مع انتجن اخر – مكونه تجمع كبير يمكن رؤية بالعين المجردة. ويشترط لكي تتم عملية التجمع ان يكون حجم الانتجين كبير نوعا (بكتيريا كاملة) أما عند استعمال جزيئات صغيرة من البكتريا فانه يلزم امد صاحبي هذه الجزيئات على جزيئات على جزيئات اكبر حجما مثل اللاتكس او كرات الدم الحمراء المبثه بحامض التنيك وذلك حتي يمكن رؤية التجمع بالعين المجردة. وعند صبغ الخلايا البكتيرية بالصبغة المناسبة يمكن رؤية التجمع بسهولة اكثر.

ويمكن اجراء اختبار التجمع على لوحة من الزجاج او البلاستيك او القيشاني او في مجموعة من انابيب وازرمان.

1- اختبار التجمع السريع Slide Agg. Test :

يستعمل عندما تكون كميات المصل او الخلايا البكتيرية ضئيلة مثل مستعمرة بكتيرية Bact. colony - ويكون الاختبار مناسبا اذا كان التجمع يحدث في خلال دقائق قليلة - أما عندما يكون مطلوبا لظهور التجمع التحضين في الحضانة البكتريولوجية يصبح هذا لاختبار غير مناسبا.

ويلزم لاجراء هذا الاختبار استعمال مصل قوى أو قليل التخفيف مع خلايا بكتيرية مركزة . ونتائج هذا الاختبار تنبيء عن نوعية الاجسام المناعية وليست كميتها.

ويعتبر اختيار التجمع السريع لتشخيص مرض الاسهال الابيض في الدواجن احد الامثلة الناجحة للتطبيق الحقلي للاختبار.

وفيما يلي ملخص لطريقة استخدام انتجنة الاسهال الابيض الملون (الجامع) في التشخيص السريع للمرض في الدواجن.

أنتيجين الاسهال الابيض الملون (الجامع) :

يتم تحضير هذا الانتيجين من عترات سالمونيلا الاسهال الابيض القياسية والمتغيرة وتصبغ خلايا الميكروب بصبغة الكرستال فيوليت الزرقاء.

كيفية الاستعمال :

يتم استخدام هذا الانتيجين لتشخيص المرضي في الدواجن - واحسن عمر لاختبار الدواجن هو 4 شهور فما فوق ولايستعمل هذا الانتيجين لاختبارات السالمونيلا في البط او الرومي. ويتم الاختبار بخلط كميات متساوية (نقطة لاتقل عن 30 ميكروليتر) من دم الطائر المراد اختباره وكذلك الانتيجين - ثم تقرأ النتائج كمايلي :

1- نتيجة ايجابية : اذا ظهرت التجمعات في خلال دقيقة واحدة من الخلط.

2- نتيجة اشتباه : اذا ظهرت التجمعات في خلال دقيقتين من الخلط.

3- نتيجة سلبية : اذا ظهرت التجمعات بعد دقيقتين من الخلط.

4- نتيجة سلبية : اذا لم تظهر تجمعات بتاتا.

ملحوظة :

في حالة الاشتباه والحالات السلبية يتم اعادة الاختبار مرة ثانية بعد أسبوعين من تاريخ الاختبار الاول – ولاتعتبر الحالة سلبية تمام الا اذا اظهر الفحص السيرولوجي انها سلبية لاختبارين متتالين بينهما مدة لاتقل عن 15 يوما.

طريقة حفظ المستحضر :

* يحفظ في ثلاجة عند 2–4م.

إختبار التجمع الانبوبي : Tube Agg. Test

يستعمل لبيان كمية الاجسام المناعية النوعية المتواجدة في المصل لتحديد عما اذا كانت هذه الكمية كبيرة ناتجة من عدوي ميكروبية مسببة للمرض او كمية صغيرة ناتجة من عدوي بسيطة لميكروب المرض او ميكروبات مشابهة.

يكون الاختبار بعمل عدة تخفيفات من المصل المراد معرفة نوع وكمية الاجسام المناعية المتواجدة ثم خلطها بكمية من الانتوجيين المعروف نوعيته ثم التحضين لمدة مناسبة – وتقرأ النتائج لتحديد أعلى تخفيف من المصل (Titre) أعطى نتيجة تجمع إيجابية – وظهور التجمع في التخفيفات العالية للمصل مؤشر على زيادة كمية الاجسام المناعية في المصل الاصلى مما يعنى شدة المرض او تواجده لفترة طويلة.

ويعتبر اختبار التجمع الانبوبي TAT لتشخيص مرض البروسيلا للماشية احد الامثلة الكلاسيكية للتطبيق العملي للاختبار.

وفيما يلي ملخص لطريقة إستخدام انتجين البروسيلا في اختبار التجمع الانبوبي TAT لتشخيص مرض الاجهاض المعدي في الماشية والاغنام.

إنتجن البروسيلا لاختبار الانابيب

(أنظر لصفحة الملحقة).

إختبار الانتشار المناعي في هلامة الآجار

Agar gel Immuno - diffusion

يعتبر من اكثر الاختبارات الترسيبية Ppt. tests حساسية ويشترط أن يكون الانتجن ذو جزيأت صغيرة مثل سموم او مستخلصات البكتريا الذائبة أو الفيروسات.

يتم إجراء هذا الاختبار في أنابيب إختبار صغيرة 5سم × 2سم وذلك بتحضير ثلاثة كميات من الآجار بتركيز 6.٪.

تخلط الكمية الاولى بالانتجن والثانية تخلط بالمصل المحتوى على الاجسام المناعية المراد اختبارها وتترك الكمية الثالثة من الآجار كما هي بدون أي اضافات.

توضع كمية الآجار المحتوى على الاجسام المناعية أولا في كل أنبوبة ثم يترك ليجف ثم يضاف الاجار الخالي من أي اضافات ويترك ليجف ثم يضاف الاجار المحتوى على الانتجين المعروف.

وتترك الانابيب لفترة كافية لانتشار الاجسام المناعية والانتجين الى طبقة الآجار الخالي – وفي حالة تتناسب نوعية الانتجين مع نوعية الاجسام المناعية تظهر خطوط واضحة عند منطقة التماس مظهره نوعا من الاندماج يظهر في صورة خطوط ترسيبية ppt. lines .

ويستعمل هذا الاختبار لتحديد مكونات البكتريا المختلفة وتشخيص بعض الامراض الفيروسية والفطرية.

انتجن البروسيلا لاختبار الانابيب

التركيب : يحضر هذا الانتجن من عترات هوائية لميكروب البروسيلا (عترة رقم 99) ويعلق في محلول ملح فسيولوجي ويتم معايرته باستعمال مصل قياسي عالمي (ISABS) .

العبوة : عبوة زجاجة سعة 100 سم3 من الانتجن المركز المعاير.

دواعي الاستعمال : يستخدم في التشخيص السيرولوجي لمرض البروسيلا باجراء اختبار التجمع المصلي في الانابيب.

طريقة الاستعمال : يخفف الانتجن كما هو موضح على اللاصق بواسطة محلول ملح فسيولوجي معقم (Phenol Saline) وذلك قبل اجراء الاختبار مباشرة حتي لايحدث تحلل لخلايا الانتجن ويتم اجراء الاختبار كالاتي :

1- تجهز خمسة أنابيب وازرمان لكل عينه سيرم تحت الاختبار بوضع 0.8 سم3 محلول ملح طبيعي مضاف اليه (5.٪ فينول) في الانبوبه الاولى ثم 5. سم3 من نفس المحلول في باقي الانابيب.

2- يضاف 2. سم3 من السيرم تحت الاختبار للانبوبه الاولى ويرج جيدا ثم ينقل 5. سم3 من هذا الخليط الى الانبوبه الثانية ويرج جيدا ثم ينقل 5. سم3 الى الانبوبه الثالثة وهكذا ... الى الانبوبه الاخيرة ثم يطرح 5. سم3 خارجا من الانبوبه الاخيرة بعد الرج. وبهذه الطريقة يصبح السيرم مخففا بنسبة 1/5 ، 1/10، 1/20 وهكذا ...

3- يضاف لكل أنبوبه 5. سم3 من الانتجن (وذلك بعد تخفيفه طبقا للتعليمات المكتوبه على الزجاجة) . وهذا يعطي تخفيف نهائي في كل أنبوبه كالاتي 1/10، 1/20، 1/40 وهكذا ...

4- تحضن الانابيب في حضانة بكتريولوجي لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37م

وتقرأ النتائج كالاتي :

درجة التجمع تحدد بقراءة درجة الوضوح قبل هز الانابيب - وتعتبر النتيجة ايجابية

100٪ (4+) اذا حدث تجمع كامل بالانبوبه وبالتالي رسوب كامل للمادة المتجمعة – أما النتيجة 75٪ (3+) اذا حدث تجمع واضح وترسيب واضح – أما النتيجة 50٪ (2+) اذا حدث بعض الترسيب – والنتيجة 25٪ ترسيب أقل. أما النتيجة السلبية (–) فتعنى تعكر كامل للسائل في الانابيب قبل هزها وكذلك عدم وضوح تجمع.

ويؤخذ أعلى تخفيف للسيرم مظهرا 50٪ تجمع (يعني 50٪ درجة وضوح) أو أكثر كنقطة نهاية end-point أو عيار السيرم titre of the serum .

ولاهمية 50٪ نقطة نهاية تستعمل أنبوبه لمقارنة درجة الوضوح بوضع فيها 0.75سم3 محلول ملحي بالفينول مع 0.25سم3 انتجين مخفف ويستعمل للمقارنة أيضا انتجين قياسي لاعطاء 50٪ تجمع مع تخفيف سيرم قياسي 500/1 سيرم قياسي عالمي.

وتقيم النتائج كالتالي :

1- 50٪ تجمع عند تخفيف 40/1 سيرم أو أعلى يعنى أن الحيوان مصاب بالمرض.

2- تجمع عند تخفيف 20/1 يعنى أن الحالة مشكوك في إصابتها بالمرض.

ملحوظة :

لاختبار مصل الأغنام والماعز يراعي استعمال 5٪ محلول ملحي مضافا اليه 5.٪ فينول لتخفيف كل من السيرم والانتجين .

الاحتياطيات :

1- ترج الزجاجة جيدا قبل الاستخدام.

2- يخفف الانتجن قبل الاستعمال مباشرة كما هو موضح على اللاصق.

3- يتم تخفيف الانتجين يوميا ولايحفظ لليوم التالي.

4- يفضل استخدام مصل إيجابي وسلبي معروف للتأكد من فاعلية الانتجين عند اجراء الاختبار.

الحفظ : يراعي عدم تجمد المستحضر عند الحفظ، ويحفظ عند درجة 4 الى 8م.

انتجن بروسيلا الروزبنجال

Rose Bengal Brucella Antigen

يعتبر انتجين بروسيلا الروزبنجال أحد أنتيجينات البروسيلا المخصصة لاجراء الاختبارات السريعة لتشخيص مرض البروسيلا..

والانتجين يعمل عند درجة حموضة 3.65 وبذلك يكون له القدرة على تثبيط بعض الاجسام المناعية من نوع IgM المتواجدة في المصل - حيث أن تواجد IgM في الامصال المراد اختبارها يعطي نتائج زائفة لانها تحمل اجسام مناعية أخرى شبيهة بالاجسام المناعية الخاصة بالبروسيلا ولذلك فانه عند استعمال انتجين الروزبنجال يكون تفاعلهما بين خلايا البروسيلا المتواجدة في الانتجين والاجسام المناعية المتواجدة في IgG وهي اجسام مناعية عادية النوعية Highly specific وبذلك يعتبر اختبار الروزبنجال اكثر نوعية واقل حساسية بالمقارنة بنتائج إختبار البروسيلا الحمضي (البابا) حيث أن درجة حموضة انتجين البابا 3.8 تعطى فرصة لبقاء نسبة كبيرة من الاجسام المناعية IgM والتي تظهر عند بداية العدوى بالمرض وبذلك تكون نتائج الاختبار الاخير اكثر حساسية واقل نوعية.

أما بالنسبة لانتجين البروسيلا الريفانول يعتبر اكثر انجينات البوسيلا يعطى نتائج نوعية عالية Highly specific . حيث انه يتم أولا ترسيب الاجسام المناعية IgM في المصل المراد اختباره لاستعمال محلول ريفانول ثم يفحص المصل بدون الاجسام المناعية IgM حيث يجرى التعرف على الاجسام المناعية من نوع IgG وهي اجسام مناعية عالية النوعية.

النتائج الايجابية لهذا الاختبار تعتبر مؤكدة بالنسبة لتواجد اجسام مناعية نوعية للبروسيلا. وفيما يلي تفاصيل اجراء اختبار انتجين بروسيلا الروزنبنجال وكيفية قراءة النتائج.

أنتجن بروسيلا الروزبنجال

التركيب :

يحضر هذا الانتجين من عترات هوائية لميكروب البروسيلا أبورتس (عترة رقم 99) ويلون بصبغة الروزبنجال الحمراء ويعلق في محلول ثابت بدرجة حموضة 3.65.

العبوة :

زجاجة سعة 20 سم3 تحتوى على 600 وحدة تشخيصية D.U.

طريقة الاستعمال :

يتم استخدام هذا الانتجين للتشخيص السريع لمرض البروسيلا

* يعمل اختبار التجمع المصلي السريع buffered plate agglutination test (BPAT) وهو اختبار سريع وبسيط وسهل القراءة. وتم تصميم هذا الاختبار ليعمل عند درجة حموضة 3.8 – حيث ان درجة حموضة الانتجين 3.65 تساعد علي تجمع IgG1 والى حد ما تثبط من درجة تجمع IgM – وبذلك يعتبر هذا الاختبار اكثر نوعية وأقل حساسية بالمقارنة بنتائج اختبار انتجين البروسيلا الحمضي المتوازن BAPA.

ويتم الاختبار كالاتي : نقطة من الانتجين (0.3 سم3) يتم مزجها جيدا بكمية متساوية من المصل المراد فحصه (0.3 سم3) على بلاط قيشاني او الكارت المخصص لذلك ويتم المزج والهز لمدة 4 دقائق وتقرأ النتائج كالاتي :

1- لايوجد تجمع	النتيجة سلبية (-)
2- تجمع ضعيف	النتيجة إشتباه (±)
3- تجمع بسيط بعد 4 دقائق	النتيجة إيجابية (+)
4- تجمع متوسط خلال 4 دقائق	النتيجة إيجابية (++)
5- تجمع متوسط بعد الخلط مباشرة	النتيجة إيجابية (+++)
6- تجمع واضح بعد الخلط مباشرة	النتيجة إيجابية (++++)

الاحتياطات :

1- يجب اجراء الاختبار في مكان خالي من الاتربة والغبار.

2- ترج الزجاجة جيدا قبل الاستخدام.

3- يتم اجراء الاختبار عندما تكون درجة حرارة الانتجين والمصل المراد فحصه مقاربه لدرجة حرارة الغرفة.

4- النتائج تقرأ في خلال 4 دقائق والنتائج التي تظهر بعد مدة أطول لاينظر اليها.

5- يفضل إستخدام مصل إيجابي وسلبي معروف للتأكد من فعالية الانتيجن عند اجراء الاختبار.

الحفظ :

يراعى عدم تجمد المستحضر عند الحفظ - ويحفظ عند درجة 4 الى 8 درجة مئوية.

* توجد طريقتين لاجراء اختبار التلازن الدموي :

1- الطريقة السريعة (Rapid Method)

* طريقة مبدئية (كيفية - Qualitative Method).

* تحدد وجود التلازن او عدم وجوده.

* تجرى على شريحة زجاجية وذلك بوضع نقطة من كرات الدم الحمراء المخففة (10٪) على نقطة من الانتجين المراد اختباره.

* تظهر النتيجة في خلال ثواني وتكون على شكل نقط صغيرة من التجمع الدموي (تجلط).

2- طريقة الاطباق الميكرونية :

* تستخدم هذه الطريقة لتحديد قوة الفيروس التلازنية .

* المواد المستخدمة لهذه الطريقة هي كالاتي :

- أطباق بلاستيكية 96 عين ذات قاع V أو U .

- محلول ملح فسيولوجي متعادل ph 7.2

- كرات الدم الحمراء.

(يتم تجميع الدم على مادة مانعة للتجلط مثل 4٪ سترات صوديوم، يتم غسيل الدم ثلاث مرات متتالية عن طريق دورانه في جهاز الطرد المركزي على سرعة 1000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق. يخفف الدم 5. ... 1٪ عند الاستعمال.

* طريقة اجراء الاختبار :

- يوزع محلول الملح بكمية 25 ميكرون في كل العيون.

- يوضع 25 ميكرون من الفيروس المراد اختباره في العين الاولى ويخلط جيدا ثم يؤخذ منه 25 ميكرون وتنقل الى العين التي تليها ويكرر التخفيف لنحصل على 2/1، 4/1، 8/1، 16/1، 32/1 وهكذا ونترك العين الاخيرة كعينة ضابطة (كنترول).

- يوزع الدم المخفف 50 ميكرون في كل العيون ويترك الطبق في الثلاجة (+4) .
- يتم قراءة الطبق عند ظهور نتيجة الكنترول.
- تكون النتيجة الايجابية بالحصول على أعلى تخفيف يعمل على تلزن الدم بالكامل (HAU)وتكون على شكل الدانتيل في حين تكون النتيجة السلبية على هيئة زرار نتيجة ترسيب كرات الدم الحمراء.

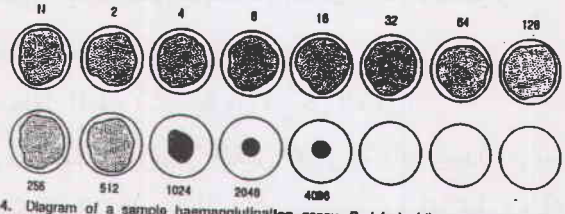


Figure 2.4. Diagram of a sample haemagglutination assay. Serial doubling dilutions of virus shows complete agglutination end point at 1:512 and 50% end point at 1:1024.

إختبار منع التلازن الدموي

Haemagglutination Inhibition Test (HI)

يعتبر هذا الاختبار من الاختبارات السيرولجية المستخدمة لقياس مستوى الاجسام المناعية الموجودة في السيرم وذلك بايقاف عملية التلازن لكرات الدم الحمراء.

المواد المطلوبة لاجراء الاختبار :

1- أطباق بلاستيك 96 عين على شكل U أو V

2- انتجين معروف قوة تلازنة (يستخدم 4 وحدة).

3- كرات الدم الحمراء (تركيزه 5.٪ -- 1٪).

4- محلول ملح فسيولوجي متعادل (كلوريد صوديوم 8.5٪) (الأس الهيدروجيني 7.2).

5- عينات السيرم المراد اجراء الاختبار عليها ويحصل عليها بقصد الدم من القلب او الجناح ، يترك حتي يتجلط ثم يفصل السيرم لاختباره.

طريقة اجراء الاختبار :

1- يوزع محلول الملح 25 ميكرون في كل العيون.

2- توضع كل عينة سيرم في العين الاولى وتخلط جيدا مع محلول الملح ثم ينقل 25 ميكرون الي العين التي تليها ويستمر التخفيف 2/1، 4/1، 16/1، 32/1 ... ونترك العين الاخيرة كعينة ضابطة (كنترول).

3- يوزع 25 ميكرون من الانتجين (4وحدة) في كل العيون ماعدا الاخيرة ويترك لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة.

4- يضاف 50 ميكرون من الدم المخفف في كل العيون ويترك في الثلاجة حتي تظهر نتيجة الكنترول.

5- تترسب كرات الدم على شكل زرار في النتيجة الايجابية Ve+ بينما تاخذ شكل الدانتيل في النتيجة السلبية ve- .

6- تدل النتيجة على الحالة المناعية للقطيع ، مثال ذلك في مرض النيوكاسل تعتبر النتيجة 2 فاكثر حالة مناعية جيدة للقطيع أما أقل من ذلك فننصح باعادة التحصين مرة أخرى.

إختبارات الحساسية
لتشخيص بعض الامراض الجرثومية

إختبارات الحساسية
لتشخيص بعض الامراض الجرثومية

إعداد
الاستاذ الدكتور دانيال جندي ميخائيل
رئيس قسم بحوث المواد المشخصة البكتيرية
بمعهد بحوث الامصال واللقاحات البيطرية

إختبارات الحساسية

عند حقن أي بروتين غريب على الجسم (انتجين) يقابل برد فعل مضاد من الجسم ليحمى نفسه ويقاوم الخضر. وتتوقف هذه المقاومة على عدة عوامل أهمها :

* الحالة العامة للجسم.
* مدى خبرة الجهاز المناعي بنوعية البروتين أو الانتجين الغريب.

وتنقسم هذه المناعة الى نوعين رئيسيين هما :

* المناعة الخلوية.
* المناعة المصلية.

وبالنسبة لاختبارات الحساسية فان الجسم يسرع في ارسال الخلايا الدفاعية الى مكان الحقن فيحدث نوع من الالتهاب كرد فعل مضاد يمكن قياسه بإحدى أو بعض العلامات الرئيسية الخمس للالتهاب وهي :

* الاحمرار.
* الورم.
* الحرارة (السخونة).
* الارتشاحات (الاوديما).
* فقدان الحركة أو قلتها.

وقد استغلت هذه الظاهرة الحيوية للكشف عن بعض الامراض الجرثومية فاذا حقن الميكروب الميت او مشتق منه في سمك الجلد ينتج رد فعل يميز بين الكائن الحي السليم والمريض.

إختبار السلين

منذ أن اكتشف روبرت كوخ الميكروب المسبب لمرض السل (1882م) بدأ عصر جديد في تشخيص وعلاج المرض. وعندما زرع الميكروب على وسط غذائي مناسب حصل على سائل بني اللون شفاف أسماه التيوبركلين (السلين) ووجد انه عند حقنه بالجلد ينتج عنه رد فعل في حالة الاصابة بميكروب السل فقط.

ومر هذا المستحضر بخطوات لتحسينه الى أن وجد أن المادة الفعالة التي تسبب رد الفعل هي البروتين المشتق من الميكروب والذي يتكون اثناء نمو الميكروب على وسط غذائي سائل ولذلك سمى ب . ب. د وهي الحروف الاولى للكلمات الانجليزية وتعنى بروتين مشتق منقى.

ويحضر الان البروتين النقى في صورة محلول بفر مذاب فيه الـ ب . ب. د ومضاف اليه الجلسرول والفينول بنسب معينة ثم يختبر قبل طرحه للاستعمال بعدة اختبارات لضمان خلوه من الجراثيم واحتوائه على النسبة المقررة من البروتين الفعال وكذلك كفاءته لاحداث رد فعل في خنزير غينيا كنموذج لرد الفعل في الحيوانات الكبيرة وينتج الـ ب.ب.د. (أو مادة السلين) في احدى الصور الاتية :

أ- السلين النقي للماشية :

* المحضر من العترة الادمية للسل ويصلح لتشخيص السل البقرى وتركيزه 2مجم/ 1 سم3.
* المحضر من العترة البقرية للسل وتركيزه 1 مجم / ا سم3.

ب- السلين النقي للطيور :

المحضر من العترة الطيرية للسل وتركيزه 0.5 مجم / 1 سم3.

الاختبار وأهميته

يعتبر هذا الاختبار من أفضل الوسائل وابسطها على المستوى العالمي لتشخيص الاصابة بميكروب السل في الحيوان.

إختبار الحقن المفرد في الجلد

يعتبر الاختبار المفرد في الجلد هو الاساس لتشخيص ومكافحة مرض السل في الماشية ويشمل استعماله الحالات الآتية :

1- عند اجراء اختبار عام لمكافحة مرض السل بين الماشية.

2- لاختبار المزارع التي بها تجمعات كبيرة من الماشية لم يسبق اختبارها من قبل على أن يستمر اختبارها بهذه الطريقة طالما كانت نتائج الصفة التشريحية التي تجرى على الحالات الايجابية منها مؤيدة لنتائج الاختبارات بثبوت اصابتها بمرض السل (عدم ظهور حالات رد فعل لانوعي بالقطيع).

3- لاختبار الحالات الفردية التي يراد فحصها لتشخيص مرض السل بها.

4- لاختبار الحالات الفردية التي تشترى وذلك قبل اضافتها الى القطعان المختبرة.

مقدار الجرعة :

** 0.1 سم3 لجميع المواشي المختلفة الاحجام والاعمار.

طريقة إجراء الاختبار

1- موضع الحقن : يفضل منتصف الثلث الاوسط في الرقبة.

2- يحلق الشعر في جزء من هذه المنطقة علي شكل دائرة قطرها 5 سم تقريبا.

3- تطهر هذه المنطقة بقطعة من القطن المغموس في الكحول وتترك لتجف.

4- تؤخذ ثنيه من الجلد في المنطقة المحلوقة بين السبابه والابهام ويقاس سمكها بقدمة خاصة وتسجل القراءة.

5- طريقة الحقن بواسطة حقنة مدرجة ذات ضابط سعتها 1سم ولها أبرة قصيرة متوسطة السمك تجرى عملية الحقن وذلك بغرس الابرة في ثنيه الجلد المحلوقة حتي يصل طرفها الى الطبقة الداخلية من النسيج الجلدي ثم يحقن مقدار 0.1 سم3 من مادة السلين. ويحتاج الامر عادة الى بعض الضغط اثناء الحقن مما يدل على أن الحقن تم في طبقات الجلد وليس تحت الجلد وللتأكد من صحة الحقن في الجلد تمرر الاصابع في مكان الحقن حيث يمكن الشعور بورم في حجم الحمصة اذا كان الحقن صحيحا وفي حالة الشك في صحة الحقن يحقن الحيوان مرة ثانية ويفضل اجراء الحقنة الثانية في الجهة الاخرى من الرقبة وفي موضع مماثل للوضع السابق.

6- قراءة نتائج الحقن : تقرأ نتيجة الاختبار بعد مضي 72 ساعة من الحقن باعادة قياس سمك الجلد بواسطة القدمة ويسجل مقداره للمقارنة بالقراءة الاولى التي اخذت قبل الحقن ومن ذلك يتضح مقدار الزيادة في سمك الجلد وتكون نتائج الاختبار كالاتي :

- الحالات التي يكون فيها مقدار الزيادة في سمك الجلد أقل من 3 مم تعتبر سلبية.
- الحالات التي يكون فيها مقدار الزيادة في سمك الجلد 4 مم فاكثر تعتبر ايجابية.
- الحالات التي يكون فيها مقدار الزيادة في سمك الجلد من 3 الى أقل من 4مم وكذلك الحالات التي تكون فيها الزيادة اقل من 3 مم ويكون الورم من النوع الاوديمي الحساس تعتبر مشتبها فيها.

إعادة الاختبار

المواشي المشتبه فيها لايصح اعادة اختبارها قبل مضى ثلاثين يوما على الاقل من الاختبار الاول والافضل ان يعاد الاختبار بعد شهرين ويراعى ان يكون الحقن بالجهة المضادة بالرقبة لا في نفس الجهة التي سبق اجراء الاختبار الاول بها.

طريقة حفظ السلين ومدة إستعماله

1- يحفظ السلين بالثلاجة على درجة 4 مئوية وتستمر صلاحيته للاستعمال لمدة تسعة شهور من تاريخ تحضيره.

2- زجاجة أو أمبولة السلين التي تفتح تستعمل في نفس اليوم وما يتبقي بها من جوع تعدم ولذا يطلب السلين في العبوة المناسبة للاستعمال.

بعض الملاحظات على الاختبار

احيانا تظهر حالات زائفة سواء إيجابية أو سلبية لاختبار السلين .. الحالات الايجابية الزائفة وهي التي تكون ايجابية للاختبار ولكن ذبحها وفحصها لاتوجد بها آفات مرضية للسل وقد يرجع هذا الى :

1- عدوى مبكرة لم يمكن معها تكون درنات بالغدد الليمفاوية او الانسجة.

2- الحساسية نتيجة العدوى بالعترة الآدمية فيكون الحيوان ايجابيا للاختبار دون وجود آفات ويمكن ان يحدث هذا لوجود احد العاملين المصاب بالدرن الآدمي او القرب من مصدر تلوث بالعترة الآدمية مثل مستشفيات الصدر.

3- الحساسية نتيجة للعدوى بالعترات غير القياسية للميكروب.

4- الحساسية نتيجة للعدوي بعترة يونز (جونز).

5- الحساسية نتيجة بعض الجراثيم المشابهة مثل الكوريني ، التوكاد رديا.

6- الاصابة بالدودة الكبدية (الفاشيولا).

وللتقليل من الحالات الايجابية الزائفة يجرى اختبار الجلد المفرد المقارن كما سيأتي ذكره بعد.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

حفل الإفتتاح

أسماء المشاركين

الاسم	الدولة
1- سامي طلال العدوان	الاردن
2- علي عبدالله عرب	الامارات
3- عباس عبدالله الحايك	البحرين
4- آمال حيول	الجزائر
5- خالد بن علي آل جبر	السعودية
6- مجدي بدوي	السودان
7- عصام عبدالمجيد	السودان
8- الفاتح احمد عبدالرحمن	السودان
9- غسان مجر	سوريا
10- عماد عبدالحسين الزبيدي	العراق
11- حارث محمد سليم صالح	العراق
12- علي عبدالله بن محمد السحمي	سلطنة عمان
13- تهاني علي قاسم	الكويت
14- غازي الحكيم.	لبنان
15- محمد سكرية.	لبنان
16- أسامة عثمان بشير	ليبيا
17- الحسن الصالح	المغرب
18- محمد مكين مصطفى	مصر
19- عبدالخالق محمد عبدالمجيد	مصر
20- ممتاز عبدالهادي عفيفي	مصر
21- فاطمة الزهراء محمد شعيب	مصر
22- الشيخ معالي ولد أمين	موريتانيا
23- محمد يحيى حميد	اليمن
24- احمد علي مصطفى	مشرف الدورة وممثل المنظمة