2 . البحث عن مستضدات الفيروس في السائل السقائي أو السلى فمثلاً زرع الأنفلونزا يتم بسائل السلى ويكشف بتفاعل تراص دموي (لأن عليها أشواك Spike الـ HA) فالارتصاص يدل على أن الفيروس الموجود هو أنفلونزا، لأن هذا الفيروس يألف البروتينات المخاطية على سطح الكريات الحمراء فيرصها (قادمة من خاصية الـ HA).

3 . قد يحدث موت جنين الدجاج كما بحالة النكاف (Mumps) .

ثالثاً . الزرع على المستنبتات الخلوية Tissue Culture:

• طورت عملية زرع البيض واستخدمت المستنبتات الخلوية لأول مرة عام 1949 وهي عبارة عن خلايا من انسجة حيوانية أو بشرية جنينية , فقد أتى العالم دولبيكو وفكر بكيفية إمكانية إيضاح هذه الخلايا لرؤية الأثر الفيروسي ضمنها، وهنا تحتاج لفرد هذه الخلايا، وتم ذلك باستخدام مستحضر التربسين، حيث هضم الأنسجة مع التربسين ففصل الخلايا عن بعضها وحصل على طبقة خلايا وحيدة مثبتة على جدار وسط الزرع , وقد أضيفت الصادات لهذه الأوساط لمنع نمو الجراثيم المعيقة للدراسة , وأول استخدام لها كان لتكثير فيروسات الحمَى السنجابية (شلل الأطفال polio vious) لفيروس مزروع بالزجاج ، وتبين تنخر متميز يشاهد بتكبير 25–100 مرة (مجهر عادي) , ومنذ عام 1950 بدأت تستخدم المستنبتات الخلوية بكثرة , وعملياً يمكن استخدام كل خلايا الفقاريات لكن الأكثر استخداماً هي المأخوذة من الإنسان والقرد.

تحضير المستنبتات الخلوية:

1 . تأمين سائل مغذي لحفظ الخلايا الحية وهي وسط سائل موقى Buffer يحوي حموض أمينية . فيتامينات . غلوكوز . أملاح معدنية . بروتينات مصلية تحضّر من مصول الحصان أو البقر Bovine (Bovine = بقري ، Avian = طيري) , وتعقم هذه المكونات بالترشيح Filtration بمراشح بقطر 0.2–0.45 نانومتر (ميلي مكرون) , ونضيف صادات Anti Bioatic لمنع تلوث الوسط فيما بعد ، ووظيفة هذا الوسط هو الحفاظ على الخلايا حية.

2 . أوعية زجاجية أو بلاستيكية خاصة خالية من أي تأثير سمي، يوضع فيها الوسط الزرعي مع الخلايا المستخدمة بزرع الفيروسات , وتحضن بشكل أفقي وتراقب تحت المجهر العادي بشكل أفقي (لأن إيقافها يسبب سقوط الخلايا عنها).

3 . هو الرئيسي ويتمثل بالخلايا المستخدمة للزرع وهي يجب أن تكون كفيئة لتسمح بتكاثر وتكثير الفيروسات , وتستخدم ثلاث أنماط من الخلايا الكفيئة لزرع الفيروسات:

1 . **الخلايا المزروعة للمرة الأولى Primer Cells:** تؤخذ من الأنسجة الجنينية أو الكهلة السوية للإنسان والحيوان مثل: كلية قرد . سلى بشري Human Amnios . جنين فأر . رئة

جنين بشري , وجميعها تؤخذ بشكل عقيم و تقطع لقطع صغيرة ويضاف لها التربسين الذي يفصل الخلايا عن بعضها، ثم تستحلب الخلايا في السائل المغذي المحضر العقيم , ونوزع المستحلب بالأوعية (زجاجية أو بلاستيكية) ونترك بالحاضنة فتترسب الخلايا بأسفل الوعاء مشكلةً طبقة من الخلايا المتجانسة (ممدودة كأنها سجادة) , وإن مقدرة هذه الخلايا على الانقسام والتكاثر محدود لا يتجاوز مرة أو مرتين، ويستخدم هذا النمط لعزل الفيروسات البيكورنية PicornaViruses والمعوية EnteroViruses والغدية AdenoViruses والفيروسات الحلئية Herpes Viruses.

2 . **الخلايا مضاعفة الصبغيات Diploid Cells (خلايا الأورمات الليفية أو الفيبروبلاست Fibroblast)**: تؤخذ من الأنسجة البشرية الجنينية من الكلية أو الرئة عادةً، وهي قادرة على الانقسام خارج العضوية من 35–45 مرة وتبقى محافظة على صبغياتها المضاعفة أثناء هذا الانقسام، ويتم حفظها بالدرجة –190°م بالآزوت السائل، وأكثر الأنواع المستخدمة تجارياً WI_{38} وهي: أ– تعتبر خالية من الجراثيم و الفيروسات.

ب– حساسة للعديد من الفيروسات وخاصةً البشرية.

ج– غالباً ما تستخدم لتحضير لقاحات الفيروسات.

3 . **الخلايا متغايرة الصبغيات Heteroploid Cells**: مصدرها من الأورام السرطانية حيث يستأصل الورم ويهضم بالتربسين، وميزة هذه الخلايا قدرتها على التكاثر خارج الجسم بصورة غير محدودة لذا تدعى بالسلالات الخلوية المستمرة، وأكثرها مشاهدة تجارياً:

. الخط Hela: مأخوذة من سرطانة عنق الرحم.

. الخط HEP_2: مأخوذة من سرطان الحنجرة.

. الخط KB: مأخوذة من سرطانة الفم.

وتستخدم هذه الخلايا بزرع عدد محدود من الفيروسات، ولا يمكن استخدامها عادةً لتحضير لقاحات ضد الفيروسات كونها خلايا سريعة التكاثر.

* الطريقة المتبعة في مخابر تشخيص الفيروسات هي أن نزرع العينة المرضية على ثلاثة نماذج للخلايا وهي: – مستنبت خلايا كلية القرد (Primer).

– مستنبت خلايا مضاعفة الصبغيات WI_{38}.

– مستنبت خلايا متغايرة الصبغيات Hela و KB.

بعد الحضن عدة ساعات بحرارة 37°م نراقب الفعل والشواهد الناتجة , ونلاحظ أن دراسة المستنبتات الخلوية بعد خمجها بالفيروسات يسمح بدراسة العلاقة بين الخلية وبين الفيروس المتطفل، ونتائج خمج هذه الخلية بهذا الفيروس يختلف حسب نوع الفيروس وحسب نوع الخلية.

التأثيرات الفيروسية على الخلايا

أولاً ـ الأثر الممرض Cyto Pathic Effect (CPE):

هو مميز ونوعي لكل فيروس على المستنبت المحدد , ويختلف حسب نوع الفيروس وحسب نوع الخلية المصابة , وأهم التأثيرات المرضية للفيروسات على الخلايا:

. تنكس Degeneration.

. انحلال.

. موت.

. تبقى حية وتكتسب صفات جديدة.

حيث أن معظم الفيروسات البشرية عند زرعها بالمستنبتات الخلوية تؤدي لتنكس الخلايا وتغير أشكالها , ويمكن متابعة ذلك يومياً بالمجهر العادي مباشرةً أو بعد تلوين هذه الخلايا .

ملاحظة: أغلب الفيروسات المغلفة تمتلك بروتينات انصهار Fusion Protein هي التي تساعدها بإجراء إنصهار Fusion عند دخول الخلايا المضيفة , وإدخال المادة الوراثية الخامجة لسيتوبلازما الخلية, وأثناء تكاثر الفيروس يحدث تعبير عن الـ Fusion في غشاء الخلية وينجم عن ذلك انصهارها بجدار الخلايا المجاورة مما يؤدي لظهور خلايا متعددة النويات أو المخلى تدعى **Syncytia**

ومن أمثلة الـ CPE :

أ- إدخال Polio Virus في مستنبت خلايا كلية القرد(PMK):

نلاحظ باليوم التالي أن الخلايا تصبح مدورة كاسرة للأشعة ومنكمشة، وباليوم الذي يليه تنفصل هذه الخلايا عن الجدار الحامل لها وتموت(تدمَر الخلايا) ، وبتلوين هذه الخلايا المخموجة نجدها تحتوي على مشتمل كبير موجود بالهيولى، وهو حامضي ويحيط بشكل هلالي بنواة غليظة.

* خلايا PMK قبل الخمج تكون بشكل طبقة وحيدة الخلاياMono Layer Cells , حيث أن التشخيص المخبري للأخماج الفيروسية يتطلب عزل الفيروس على مستنبت خلوي وحيد الطبقة Mono Layer Cells ثم نخمجه ونلاحظ CPE التي تدل على نمو الفيروس وهي قد ترى بالمجهر

العادي , وهي تتضمن تورّم أو انكماش بالخلايا أو تشكيل خلايا ضخمة عديدة النوى Syncytia، أو أن تتضمن مشتملات في نوى أو سيتوبلازما الخلية المخموجة يمكن توضيحها بتلوينها حيث أن أفضل طريقة لإظهار الـ Mono Layer Cells هو تلوينها بملونات حمضية أو أساسية أهمها:

ويدعيان: H & E Staining
- الهيماتوكسيلين: كملون أساسي(لدينا AdenoVirus كمثال عن المشتملات داخل النووية المحبة للأساس)
- الإيوزين: حمضي(ReoVirus المسببة للبرد كمثال عن المشتملات داخل الهيولية المحبة للحمض).

فكل من مظهر التغير الخلوي وطبيعة المشتملات (أساسية , حمضية) ومظهرها قد تستخدم كقرائن تشخيصية للتعرف على الفيروس المسبب للخمج.

ب- إدخال Hepres Virus على نفس مستنبت القرد:

. خلايا منتفخة ضخمة (شكل آخر).

. وجود مشتمل في النواة محاط بهالة نيرة تفصله عن الكروماتين ويلتصق بجدار النواة.

Heryses Virus: ← I type: يسبب عقبولة الحلأ البسيط (تأبيلة السخونة).
← II type: يسبب العقبولة الجنسية.

. كلها تتكاثر بنويات الخلايا ويحصل تراكم بالبروتينات الفيروسية يُنتج تشكل مشتملات داخل نووية محبة للأيوزين , ولكن هناك فروق بالـ CPE بين فصائل الـ Herpes حيث:

* نشاهد لطاخات مدورة تميز الـ I.
* النواة مدورة تحوي مشتملات محبة للإيوزين.
* خلايا عملاقة و syncytia متعددة النوى وهو أكثر شيوعاً بالـ II.

ج- إدخال فيروس الإيكو9 على نفس مستنبت القرد:

تُظهر CPE تدوّر الخلايا وتشرشرها.

د- فيروس الكَلَب في في مقاطع نسيجية من دماغ حيوان مصاب:

نلاحظ أجسام نغري Negri Bodies وهي أول المشتملات(Inclusions) المعروفة على الإطلاق.

هـ- فيروس الحصبة Measles Virus:

يشكل Syncytia كبيرة جداً، ولها مظهر مميز هو وجود مشتملات محبة للإيوزين واضحة في نوى الخلايا المخموجة وهي تمثل مكونات غولجي للخلايا المنصهرة ,وهذا الفيروس يحوّل الخلايا لخلايا عملاقة giant cells وذلك لأن هذا الفيروس يزيل الحواجز بين الخلايا باستخدام إنزيماتها ويشكل

مخلى (فجوة) مليئة بالفجوات تبدو بشكل غطاء من الهيولى يحتوي على كتل من النواة (10-50 نواة) بشكل خلايا ضخمة عديدة المخالب(Syncytia).

و- الـ AdenoVirus:

تصبح الخلايا المخموجة مدورة وتتنكس وتظهر مشتملات محبة للأساس (سوداء) داخل النواة وهي تمثل بروتينات فيروسية متراكمة في موقع تجمع الفيروس , والخلايا المخموجة ذات ولع للهيماتوكسيلين , لونها بلون المنثور (لون خاص) Purplish blue dye.

ز- الـ ReoVirus:

تكاثر الجزيئات يتم بسيتوبلازما الخلية، وبالمراحل الأخيرة لتجميع الجزيئات الفيروسية تتبرعم عبر الشبكة الهيولية البطانية، وبروتينات الفيروس المتراكمة تتلون بالحمض في موقع تجمع الفيروس.

ح- الفيروسات التنفسية Respiratory Syncytia Virus (RSV):

Syncytia كبيرة . النواة تحوي مشتملات محبة للحمض شاحبة قد تشاهد بالسيتوبلازما.

ط- فيروس النكاف MumpesVirus:

Syncytia مشابهة للـ RSV ولكن الـ CPE له متميز لأنه يملك بروتين HA تتبرعم من خلاله أنسال الفيروس، وإذا أضفنا الكريات الحمراء لصفحات الخلايا المخموجة فإن الفيروسات ستلتصق على سطح الخلية وتدعى هذه العملية Haemo adsorptian وتفيد بتمييز الـ Mumps عن الـ RSV لأنهما متشابهان بالـ CPE , إذاً حتى لو تشابه الـ CPE لفيروسين فيمكن تمييزهما بالـ Hemo Adsorption.

ي- الفيروس المضخم للخلايا Cyto Megalo Virus:

يتكاثر فقط في الفيبروبلاست . بطيء النمو، تظهر مشتملات مميزة تشبه عين البوم Owl Eye Cell تتواجد بنوى الخلايا المخموجة، وهي وجدت عند فحص البول Urine , حيث أنه أفضل وسط للبحث عن الـ Cyto Megalo Virus لأنها تطرح بولياً.

ك- الـVaricella Virus :

. تتكاثر بالخلايا الإبتليالية والفيبروبلاست.

. CPE يحتاج لوقت أطول من سابقه.

. النواة تكبر وتظهر مشتملات مدورة محبة للأيوزين

. تتدور الخلايا وتصبح شديدة الألفة للأيوزين وهو مميز للمراحل الأخيرة للخمج.

ملاحظة: هناك موقع خاص للـ CPE على الإنترنت www.uct.ac.za