

المختبر 4: طرائق التشخيص المختبري Laboratory Diagnostic Methods

يعد تشخيص الفيروسات من الفحوصات المهمة والأساسية وله تطبيقات واسعة في تشخيص معظم الامراض المهمة مثل AIDS، SARS وغيرها، كذلك فان تشخيص وعزل الفيروسات ساعد في منع الاصابات الفيروسيّة من خلال انتاج مضادات فيروسية ولقاحات ساعدت في انحسار العديد من الامراض الفيروسيّة مثل لقاحات شلل الاطفال واللقاح الثلاثي.... الخ. ويعد تشخيص الفيروسات مفيد جدا خاصة على صعيد الصحة العامة فمثلا ظهور امراض مثل الحصبة الالمانية Rubella والحصبة Measles يحفز على بدء مشروع تمنيع (تلقيح) ضد هذه الفيروسات، او عند ظهور امراض فيروسيّة منقولة بواسطة الحشرات مثل Arboviral Encephalitis المنقول بواسطة الحشرات مثل البعوض يحفز على بدء مشروع مكافحة الحشرات الناقلة للمرض لمنع انتشاره، او تشخيص اصابات Rotavirus المسببه لإمراض الجهاز الهضمي تدفعنا للسيطرة على منابع انتقال المرض مثل الماء والطعام الملوثين .

في العديد من الحالات التشخيص المرضي الدقيق يمكن ان يتم فقط بالاعتماد على العلامات السريرية للمريض كما في معظم حالات الحصبة measles، والنكاف mumps وجذري الماء varicella-zoster، التي تشخص من قبل المريض نفسه او عائلته. وتنطلق معظم الفيروسات بغير اعراض واضحة او تكون الاعراض معتدلة جدا لذا لا يعار لها اهمية طبية. بينما يكون التشخيص المبكر مهما لعلاج الحالات الفيروسيّة، لذا يجب البحث عن طرق تشخيص سريعة وكفاءة للفيروسات. وضعت عدة طرق لتشخيص الفيروسات مختبريا، وكل تلك الطرق يجب فيها مراعاة الشروط التي تم ذكرها سابقا بشأن جمع العينات وطريقة نقلها وحفظها والبيانات الواجب جمعها لغرض دقة التشخيص.

وتقسم طرق التشخيص المختبري للفيروسات الى:

1. Direct Examination:
2. Indirect Examination (Virus Isolation)
3. Serology

■ Direct Examination

1. **Antigen Detection** immunofluorescence, ELISA etc.
2. **Electron Microscopy** morphology of virus particles
Immune electron microscopy
3. **Light Microscopy** histological appearance
Inclusion bodies
4. **Viral Genome Detection**
Hybridization with specific nucleic acid probes
polymerase chain reaction (PCR)

■ Indirect Examination

1. **Cell Culture** cytopathic effect (CPE)
haemabsorption
immunofluorescence
2. **Chick egg embryos** pocks on CAM
haemagglutination
Inclusion bodies
3. **Animals** disease or death

I. الفحص المباشر Direct examination

1. المجهر الالكتروني Electron microscope

يعد من طرق التشخيص السريعة ويستخدم بدراسة الصفات المظهرية للدقائق الفيروسية او للتقدير الكمي للفيروسات مباشرة في العينة او بعد الزراعة النسيجية مثل Parainfluenza viruses. ويعد من الطرق المهمة بتشخيص فيروسات المسببة للاسهال. ويمكن فحص العديد من العينات الفيروسية الا انه يجب الا يقل الحد الادنى للجزيئات الفيروسية عن 10^6 جزيئة في المل الواحد.

2. تشخيص المستضدات Antigen detection

ويتم باستخدام عدة طرق منها التآلق المناعي **Immunoflorescence** وخاصة للفيروسات المغلفة التي تمنح مستضدات جديدة لاسطح خلايا العائل، وتتم هذه العملية اما مباشرة عن طريق تعليم العينة بأجسام مضادة متخصصة ومصبغة بصبغات متألفة، اما بطريقة غير مباشرة بتعليم العينة اولا بأجسام مضادة غير مصبغة ثم يضاف اجسام مضادة مصبغة ضد الاجسام المضادة الاولى، وفي كل من الطريقتين يكشف عن الاجسام المضادة المتألقة المرتبطة مع مستضد الفيروس وذلك بفحص العينة تحت جهاز **UV illumination**. وعادة تستخدم في الكشف عن فيروسات الجهاز التنفسي في العينات التنفسية. وهناك طريقة اخرى للكشف عن المستضدات بواسطة الامتصاصية المناعية المرتبطة بالانزيم **Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)** ، في معظم الاصابات الفيروسية عديمة الاعراض فان وجود الاضداد ليس له قيمة مالم يرتفع معيارها **Antibody titer**. لذلك تستخدم هذه الطريقة لتشخيص مستضدات الفيروس في العينة باستخدام اعداد نوعية لتلك المستضدات.

3. تشخيص الاحماض النووية الفيروسية Detection of virus nucleic acids

تقنيات البايولوجيا الجزيئية للتشخيص المباشر للجينات الفيروسية ازدادت في مختبرات التشخيصات الفيروسية في التشخيص السريع للاصابة التي تحتاج الى العلاج مثل **herpes simplex encephalitis** و **CMV**، ولتشخيص الاصابة بالفيروسات التي لايمكن زرعها مثل **human papilloma virus**، او الفيروسات التي نموها بطيء في المزرعة مثل **enteroviruses** ، او في بعض الحالات السريرية التي لايمكن اجراء تشخيص محدد بالوسائل الاعتيادية مثل **HIV , hepatitis B,C** في الاطفال حديثي الولاده والاجنة.ويمكن تشخيص

الاحماض النووية بعدة طرق، منها الطرق النوعية **Qualitative** باستخدام اما تقنية التضخيم **Polymerase chain reaction (PCR)** ، وتتم بواسطة تضخيم الجين المحدد بالاعتماد على انزيم التضخيم **DNA polymerase** ولا يستخدم **probes** ، ويتم اظهار المادة المضخمة بواسطة الترحيل الكهربائي ، او عن طريق التهجين مع الاحماض النووية النوعية او الخاصة **Hybridization with specific nucleic acid probes** ، وذلك بتضخيم المادة النووية للفيروس ثم عمل تهجين مع تتابع عكسي **probes** لهذه الحوامض وعند التطابق وظهور اللون يعني وجود الفيروس المعين. وهناك طرق كمية **Quantitative** وذلك عن طريق قياس كمية المواد الوراثية في العينة وتتم غالبا باستخدام **Real Time PCR**.

II. الفحص غير المباشر Indirect examination

4. المزارع الخلوية **Cell culture**

لها عدة انواع ، وبعد تنمية الفيروسات فيها يمكن تشخيص الفيروسات اما بدراسة التأثيرات الخلوية المرضية **cytopathic effect** على المزارع مثل فيروسات **enterovirus** ، او باستخدام تقنية التآلق **adenovirus** , **herpes simplex virus** , **cytomegalovirus** ، او عن طريق الامتصاص الدموي **haemabsorption** المناعي **Immunoflorescence**. او عن طريق الدموي **haemabsorption** لكريات الدم الحمر على الخلايا المصابة بفيروسات الانفلونزا او النكاف او **parainfluenza** او **viruses** او **togaviruses** وذلك لاحتواء هذه الفيروسات على **hemagglutinin** على سطحها.

5. اجنة بيض الدجاج **Chicken eggs embryos**

بعد تنمية الفيروسات يمكن التشخيص اما بملاحظة البثرات **Pocks** مثل **influenza virus** ، او ملاحظة اجسام الاشتمال **inclusion bodies** التي تكون مميزة لبعض العوائل الفيروسية مثل الهربسية باستعمال **المجهر الضوئي Light microscopy** ، او عمل التلازن الدموي **Haemagglutination** وخاصة الفيروسات المغلفة والتي لها القدرة على عمل تجلط مع كريات الدم الحمراء ، وهي ايضا طريقة ناجعة في التقدير الكمي للفيروس.

6. الحيوانات المختبرية **lab Animals**

بعد تنمية الفيروسات يحدث المرض او الموت وبعد ذلك يمكن عزل الفيروسات او تشخيصها باي طريقه سابقة الذكر.

III. الفحوصات المصلية Serological examination

7. تشخيص الازداد النوعية للفيروس Detection of virus-specific antibodies

ويستخدم بشكل واسع لتشخيص الاصابات الفيروسية وذلك بتشخيص الازداد في العينة المرضية مثل **IgG** او **IgA** او **IgM** ، وغالبا تستخدم طريقة **ELISA** في التشخيص، او طريقة **western blot**. وهناك اختبارات اخرى تستخدم لتشخيص الازداد مثل **المعادلة Neutralization** و **التلازن الدموي** او **تثبيط التلازن الدموي hemagglutination .inhibition**

8. تشخيص عيار الازداد Antibodies titer detection

يستخدم في تشخيص ارتفاع عيار الازداد ما بين المرحلة الحادة والشفاء اثناء الاصابات مثل **IgM** او **IgG** ، وله دور مهم في معرفة دور المناعة في القضاء على الاصابات الفيروسية. او يستخدم لتشخيص **IgM** في الاصابة الاولى.

اهم الطرق التشخيصية المستخدمة في الفيروسات المهمة الشائعة

VIRUS	METHOD
Adenovirus (gastrointestinal)	ELISA
Adenovirus (respiratory)	Antigen, PCR, culture
Cytomegalovirus	Antigen, PCR, culture
Enteroviruses (echo, coxsackie, polio)	PCR, culture
Epstein-Barr virus	PCR, serology
Hepatitis A virus	Serology
Hepatitis B virus	Antigen, PCR, serology
Hepatitis C virus	PCR, serology
Herpes simplex virus	Antigen, PCR, culture
HIV	Antigen, PCR, culture, serology
Influenza virus	ELISA, antigen, culture
Parainfluenza virus	Antigen, PCR, culture
Respiratory syncytial virus	ELISA, antigen, PCR, culture
Rotavirus	ELISA
Varicella-zoster virus	Antigen, PCR