المختبر السابع

الطرق الكمية Quantitative methods

يمتلك العد الكمي للفيروسات في المحاليل او العينات اهمية ملحوظة،على سبيل المثال في الاغراض التجريبية،في المقام الاول يجب معرفة كثافة عينة الفيروسات عن تحضير اللقاحات او عند زراعة الفيروسات.وايضا يستخدم عن اعطاء العلاج لبعض الفيروسات مثل فيروسات التهاب الكبد.وطرق القياس الكمي تنقسم الى فئتين:

1. الطرق الفيزياوية Physical Method مثل:

المجهر الالكتروني Electron microscope

اضطرت الأمراض إلى اختراع المجاهر وذلك لجعل الفيروسات مثل شلل الأطفال مرئية.وهو أدقّ مجهر اختُرع وعرف حتى اليوم، يعتمده الفيزيائيون للنظر في داخل الذرة وله تطبيقات كثيرة اخرى . قام الفيزيائي الألماني إرنست روسكا والمهندس الكهربائي ماكس نول بصنع النموذج الأولي للمجهر الإلكتروني في عام **1931** بقدرة **400** طاقة تكبير. يتميز المجهر الإلكتروني بتكبير أكبر بكثير عن التكبير الذي تصل إليه المجاهر الضوئية،وذلك نظرا لأن الإلكترونات لها طول موجة أقصر نحو **100000** مرة من طول موجة الضوء العادي ففي استطاعتها رؤية أشياء أصغر بكثير عما "يراه" المجهر العادي. حيث يقوم المجهر الإلكتروني بإرسال حزمة من الإلكترونات بدلا من شعاع الضوء عبر شريحة عينة رقيقة جداً، فيما تقوم العدسات المغناطيسية بتحزيم وضبط شعاع الإلكترونات وتكبير الصورة وضبطها ورؤيتها على شاشة أو تسجيلها على لوح فوتوغرافي .

ويوجد نوعين من هذا المجهر: **المجهر الإلكتروني الماسح Scanning** الذي يزودنا بصور مجسمة مدهشة حيث لا ضرورة لتقطيع العينة إلى شرائح من أجل رؤيتها، إنما يكفي رشها بطلاء معدني رقيق. تُرسل حزمة من الإلكترونات لتسقط على سطح العينة، مما يدفع الطلاء المعدني إلى إطلاق وابل من الإلكترونات نحو شاشة فلورية أو لوحة تصوير فوتوغرافي، فتعطي صورة مكبرة لسطح الشيء. تستطيع المجاهر الإلكترونية الماسحة تكبير الأشياء حتى **100000** مرة، ولا يمكن استخدامها لمشاهدة العينات وهي حية، كما هي الحال بالنسبة للنوع الاخر المسمى **المجهر الإلكتروني النافذ Transmission** والذي يكبر الأشياء حتى **200000** مرة،والذي يزودنا بصور داخلية للعينات.

2. الطرق البايولوجية Biological Method

A. Plaque assay

Plaque هي مساحات من الخلايا في الطبقة المنفردة **monolayer** التي تظهر تاثيرات مرضية مثل ظهورها داكنة اكثر من بقية الخلايا تحت المجهر او بشكل بقع بيضاء عند ملاحظتها بالعين المجرة.وهذه الطريقة يمكن ان تستخدم مع أي فيروس مرضي للانسان او الحيوان يعمل بقع شفافة عند زراعته على الطبقة المنفردة للخلايا الحية في الاوساط النسيجية مثل **adenovirus**،وغالبا مع هذه الفيروسات يستخدم **agarose** الذي يعطي ثباتا للخلايا ويحدد انتشار الفيروسات.وتستخدم هذه الطريقة اما للحصول على **مجاميع فيروسية نقية** او **لحساب الوحدات المكونة للبلاك (Plaque forming units(Pfu** التي تمثل الفيروس او مجموعة من الفيروسات المكونه للبلاك،وغالبا تستخدم مع العاثيات.

والعاثي البكتيري هو نوع من الفيروسات التي لها القابلية على اصابة البكتيريا وتسخير الحامض النووي الخاص بالخلية البكتيرية لها، يعد العالم فريدريك تورت أول من اكتشف الفاجات عام **1915** في انكلترا ، والعالم فليكس ديريل عام **1917** في فرنسا قام بدراسة خصائصها.حيث اطلق العالم فليكس ديريك عليها مصطلح العاثيات البكتيرية او الاقمات البكتيرية لانها تحلل الخلية البكتيرية كاملة. نستطيع عزل اغلب الفاجات من البراز او مياه المجاري او مياه المستنقعات الراكدة.

والعاثيات هي الفيروسات عند إضافتها إلى البكتيريا على أكار تنتج مناطق من البكتيريا الميتة،واكتشف أن أعلى التخفيفات من هذه الفيروسات (أقل تركيز للفيروس) بدلا من قتل جميع البكتيريا يشكل مناطق منفصلة من الكائنات الميتة. وعند حساب عدد هذه المناطق وضربه في معامل التخفيف يعطي حساب عدد الفيروسات في المحلول الأصلي المخفف.

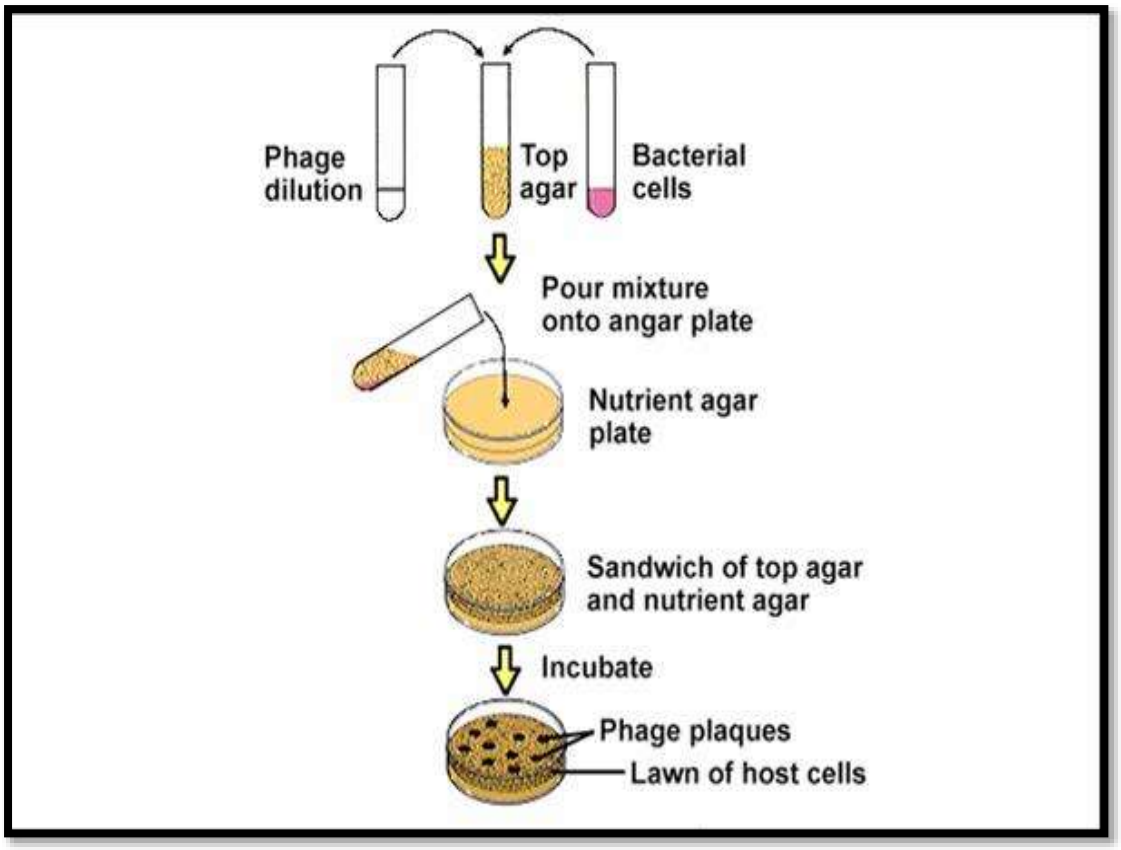
وتتلخص طريقة العمل في عمل سلسلة تخافيف لعينة الفيروس في محلول معقم **(باي اضافات كانت)** ثم يمزج مقدار **1 مل (او باي حجم كان)** من كل تخفيف مع **1 مل** من عالق بكتيري معين و **8 مل** من وسط التصلب **Agar** المعقم والمبرد الى درجة حرارة **50 م°** يمزج جيدا ثم يصب مباشرة في طبق بتري حاوي على **10 مل** من **وسط Nutrient Agar**. تترك الاطباق المزروعة بجميع التخافيف الى ان تتصلب ثم تحضن في الحاضنة لمدة **24** ساعة او اكثر وحسب النوع الفيروسي بعدها يمكن مشاهدة مناطق خالة من النمو البكتيري وعلى شكل بقع شفافة،ويمكن حساب عدد الجزيئات الفيروسية حسب المعادلة التالية:

Calculate titer:

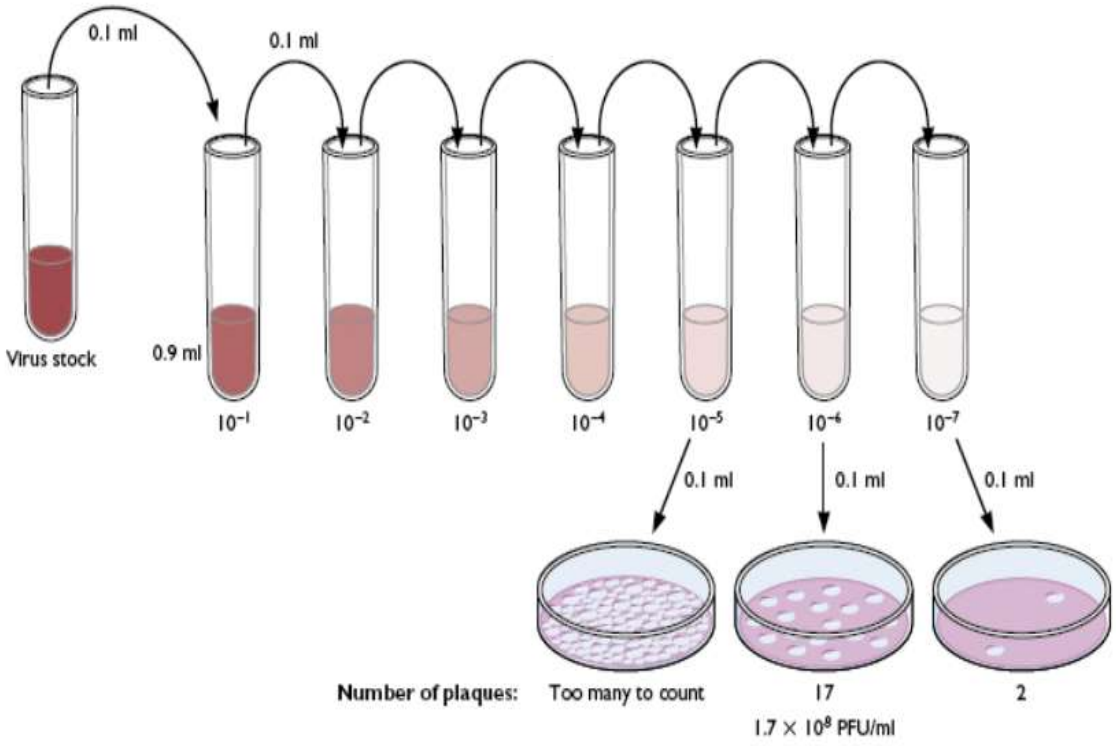
Virus titer or particles (pfu/ml) = number of plaques/ Dilution factor X volume of diluted virus added to the plate (ml)

Or

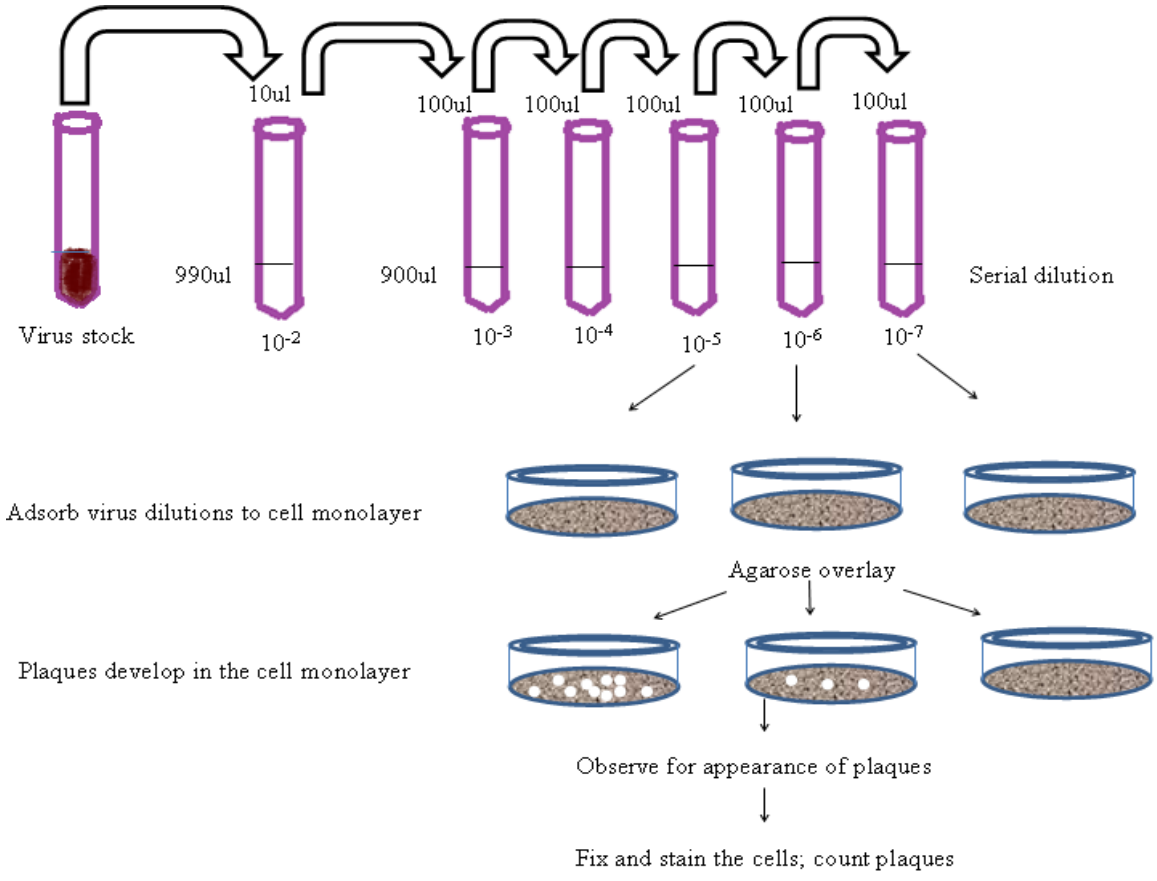
Pfu/ml = number of plaques X Dilution factor / volume of diluted virus added to the plate (ml)



طريقة زراعة التخافيف المختلفة للعاثيات



طريقة عمل التخافيف المختلفة للعاثيات وحسابها



طريقة زراعة التخافيف المختلفة للفيروسات المرضية