

معايرة المعلقات البيولوجية

TITRATION OF BIOLOGICAL SUSPENSIONS

بيدرو فيليجاس
Pedro Villegas

الملخص Summary

تشمل طرق معايرة المعلقات البيولوجية للفيروسات الطريقة المقررة بواسطة ريد ومونش Reed and Muench وبواسطة Spearman-Kärber. يكون الاختيار الأنسب للعائل المراد حقنه ومدى التخفيف أيضاً اعتباراً مهماً لضمان النتائج الموثوقة.

المقدمة Introduction

يقاس نشاط المعلق البيولوجي مثل الفيروس كميّاً بالطرق التي تتكون من تحضير تخفيفات من المعلق وتحديد التخفيفات التي عندها يظل النشاط البيولوجي مُكتشفاً. لعمل التخفيفات لاختبار الأمراض للمعلق البيولوجي أو الفيروسي يجب اعتبار القواعد التالية.

المخففات Diluents

عند تخفيف الفيروس يجب أن يحفظ المخفف إمراضية الفيروس ويكون غير سام للعائل. يمكن استخدام محلول ملح متوازن أو وسط مزرعة الخلية لأنظمة مزرعة الخلية والشورية المغذية أو شوربة التريتوز لأجنة البيض لمعظم الفيروسات. ينصح بإضافة ٢٪ - ٥٪ من المصل مع الفيروسات شديدة التأثير على الرغم من حتمية اختبار المصل قبل استخدامه لخلوه من النشاط المضاد للفيروس.

تجهيز التخفيفات Preparation of Dilutions

يجب استخدام ماصات منفصلة معقمة لكل معلق على الرغم من إمكانية استخدام نفس الماصة لمزج ونقل التخفيف المفرد. بعد نقل الحجم المطلوب من الخليط إلى الأنبوبة التالية، تغير الماصة. أثناء تحضير التخفيف يجب حفظ كل الكواشف وأنايب التخفيف المعقمة على الثلج.

إجراء الاختبار Performing the Test

ابدأ بالتركيز الأقل (أعلى تخفيف) واحقن الحجم المرغوب في كل عائل بالطريقة الخاصة به. يمكن استخدام نفس الأداة (المحقن أو الإبرة أو الماصة) لحقن تخفيفات عديدة في تسلسل عند حقن التركيز الأقل أولاً والتركيز الأعلى آخرًا. يحدث غالباً النفوق غير النوعي نتيجة عملية الحقن خلال الساعات القليلة من الحقن. يعتبر النفوق حتى ١٨ - ٢٤ ساعة عقب الحقن عامة غير نوعي ويحذف من الحسابات. تخضع كل مجموعة تم حقنها للفحص المنتظم (يوميًا إذا لم يُنص على غير ذلك) ويجب تسجيل الملاحظات. عند نهاية الوقت المحدد الذي يختلف بالعامل، يفحص كل فرد ويسجل على أنه مصاب أو غير مصاب أو نافق بالمواصفات المناسبة.

أنواع التأثيرات الإراضية Types of Infectivity Assays

يستخدم نوعان من التأثيرات الإراضية لتعريف الفيروسات وهما: الكمي أو العددي (يعرف أيضاً بالكمي أو البؤري). في التحليل الكمي، تكون الاستجابة إما إيجابية أو سلبية، ويعتمد القياس على طريقة "الكل أو العدم": العائل حي أو ميت، ووجود أو غياب التأثير المرضي الخلوي، وأعراض أو آفات الإصابة ملحوظة أو غير موجودة، وهكذا. في الاستجابة العددية يمكن تقييم عدد الفيروسات المعدية الموجودة في المعلق البيولوجي.

التحليل الكمي Quantal Assays

لعمل ذلك تحقن تخفيفات متسلسلة من الفيروس في عائل مناسب. بعد أزمنة تحضين متفاوتة، عند كل تخفيف، يقيم العائل ويحدد إما موجب أو سالب لتأثير الفيروس. تسجل نسبة العوائل الموجبة وتستهمل لحساب التركيز أو معيار المعلق الفيروسي.

وحدة الإراضية المستخدمة للتعبير عن النتائج للتأثير الكمي هي متوسط الجرعة الممرضة التي تصيب ٥٠٪ من العوائل (ID_{50}). عندما يعتمد التأثير على الأثر المميت يستعمل مصطلح متوسط الجرعة المميتة لـ ٥٠٪ من العوائل (LD_{50}). كل من ID_{50} و LD_{50} تمثلان معيار المعلق البيولوجي الذي يعبر عادة عن عدد الوحدات المعدية لكل وحدة حجم (عادة ١ مل). ID_{50} هي الطريقة المعتمدة للتعبير عن إراضية العامل. تستخدم أيضاً وحدات أخرى للإراضية (الجرعة الممرضة المتوسطة للجنين [EID_{50}])، ومتوسط الجرعة الممرضة لمزرعة النسيج [$TCID_{50}$].

حساب المعيار Calculation of Titters

بعد إجراء المعايرة وتحديد عدد العوائل التي تأثرت من كل تخفيف، ويجب تحديد تخفيف نقطة النهاية والذي يعرف كأعلى تخفيف من الفيروس الذي يحدث تأثيراً ملحوظاً في ٥٠٪ من العوائل المحقونة. لا يمكن تحديد نقطة النهاية بالفحص المرئي للبيانات لذلك تحدد حسابياً. تم وصف عدة طرق حسابية (1, 3, 4, 5, 6, 7).

طريقة ريد ومونش Method of Reed and Muench

معادلة ريد ومونش (7) تسمح بتقييم نقطة النهاية ٥٠٪ من البيانات المشتقة من الاستجابة الكمية ومجاميع المعلقات المختبرة. يعطي الجدول رقم (٤٥,١) مثلاً للتطبيق على حقن فيروس ميمت في أجنة البيض. يمكن أن تطبق المعادلة بطريقة مشابهة لمعدلات الإصابة في أي نظام عائلي.

الجدول رقم (٤٥,١). مثال على تحديد نقطة النهاية ٥٠٪ بطريقة ريد ومونش.

نسبة الميت	المعدل الميت/الكلية	الأعداد التراكمية		الأجنة		تخفيف الفيروس المحقون
		الميت	الحي	العدد الميت	العدد الحي	
١٠٠	١٢/١٢	صفر	١٢	صفر	٥	٣ ⁻ ١٠
٨٨	٧/٨	١	٧	١	٤	٤ ⁻ ١٠
٤٣	٣/٧	٤	٣	٣	٢	٥ ⁻ ١٠
١١	١/٩	٨	١	٤	١	٦ ⁻ ١٠

ينص العمود الأول في الجدول على التخفيفات المحقونة، والعمود الثاني يصف عدد الأجنة الميتة، وينص العمود الثالث على عدد الأجنة الحية. يوضح العمودان التاليان الأعداد التراكمية للأجنة الميتة المحسوبة بافتراض أنه إذا أصيب العائل أو النظام عند تخفيف معين فإنه يجب أن يتأثر أيضاً عند التخفيف التالي الأقل والذي به تركيز أعلى للفيروس. وبطريقة مشابهة تحسب الأعداد التراكمية للأجنة الحية أو غير المتأثرة على أساس أنها إذا لم تتأثر عند تخفيف معين فإنها يجب أن لا تتأثر عند التخفيف الأعلى التالي الذي به تركيز أقل من الفيروس. بسبب هذا الافتراض، يضاف عدد من الأجنة المصابة بداية عند التخفيف الأعلى وعدد الأجنة غير المصابة يضاف بداية عند التخفيف الأقل.

بمجرد حساب الأعداد التراكمية، يحسب معدل العدد الميت على العدد الكلي للعوائل المحقونة لكل تخفيف. تحسب النسبة ويحدد التخفيفان اللذان يحصران بينهما نقطة النهاية ٥٠٪. في المثال السابق نقطة النهاية ٥٠٪ تكون بين ١٠⁻٤٣ و ١٠⁻٨٨). تستعمل المعادلة التالية لحساب المسافة النسبية بين ١٠⁻٤٣ و ١٠⁻٨٨):

النسبة المصابة عند تخفيف تالي أعلى من ٥٠٪ - ٥٠٪

المسافة النسبية (PD) =

النسبة المصابة عند تخفيف تالي فوق ٥٠٪ - النسبة المصابة عند تخفيف تالي أقل ٥٠٪

$$PD = \frac{50 - 88}{43 - 88} = \frac{38}{45} = 0,84 \sim 0,8$$

يمكن أن تحسب نقطة النهاية ٥٠٪ الآن باستخدام المعادلة التالية:

لوغاريتم نقطة النهاية ٥٠٪ = (لوغاريتم فوق ٥٠٪ - PD x لوغاريتم معامل التخفيف

$$-4,8 = (1,0 \times 0,8) - PD =$$

لذلك، نقطة النهاية ٥٠٪ تكون $10^{-4,8}$ وليس لها وحدات.

يعرف المعيار بعدد الوحدات المعدية لكل وحدة حجم. لذلك، معيار المحلول المخضر هو الأس السالب

لتخفيف نقطة النهاية ويعبر LD_{50} /جرعة. إذا كانت الجرعة ٠,١ مل فإن المعيار سوف يكون $10^{-5,8}$ /مل.

إذا كانت التخفيفات غير عشرية القيمة، يجب أن تضرب المسافة النسبية بواسطة لوغاريتم ١٠ للعامل،

على سبيل المثال، للتخفيف الخماسي القيمة مثل 10^{-1} و $10^{-1,7}$ و $10^{-2,4}$ ، اضرب المسافة النسبية بواسطة

٠,٦٩٩٠ للتخفيفات الثنائية، اضرب المسافة النسبية (PD) بواسطة ٠,٣ للتخفيفات الرباعية واضرب بواسطة ٠,٦.

للتخفيفات العشرية، لوغاريتم معامل التخفيف (الذي هو ١٠) يكون ١ صحيح.

طريقة سيرمان-كاربر Method of Spearman-Kärber

يفضل العديد من الباحثين هذه الطريقة (1) لحساب ID_{50} . في معظم الحالات لا تضم هذه الطريقة عدداً

كبيراً من الحسابات والنتائج تكون أدق مقارنة بتلك في طريقة ريد ومونش. يمكن أن تستخدم هذه الطريقة فقط مع

البيانات التي تشمل استجابة ١٠٠٪ أو عندما تتوقع استجابة ١٠٠٪ عند الجرعة التالية الأعلى. لحساب ID_{50} بهذه

الطريقة، نستعمل المعادلة المكثفة التالية:

$$ID_{50} = x + \frac{1}{2}d - \frac{d \sum r_i}{n}$$

حيث :

$$\begin{aligned}
 X &= \text{أعلى مستوى تخفيف مختبر} \\
 D &= \text{المسافة بين جرعات لوغاريتمية متتالية (معامل التخفيف)} \\
 \sum r_1 &= \text{العدد الكلي للعوائل غير المصابة} \\
 n &= \text{عدد العوائل المستخدمة في كل مستوى تخفيف (ثابت)}
 \end{aligned}$$

عندما تستخدم البيانات المعطاة لحساب ID_{50} بواسطة طريقة ريد ومونش في المعادلة السابقة، تصبح

المعادلة :

$$ID_{50} = \frac{(4+3+1)1 - (1) \times 1/2 + 6}{5}$$

$$\begin{aligned}
 4,9 &= 1,6 - 0,5 + 6 = (8/5) - 0,5 + 6 = \\
 &= 10^{-4,9} \text{ لكل } 0,1 \text{ مللي أو } 10^{-9,9} \text{ لكل مللي.}
 \end{aligned}$$

عند استخدام تسلسل عشاري القيمة لحقن العوائل المناسبة، يمكن أن تختزل المعادلة لتسهيل الحسابات :

$$ID_{50} = x + 0.5 - \frac{\sum r_1}{n}$$

والسبب في هذا هو أن المسافة بين التخفيفات (d) هي لوغاريتم 10 أو واحد صحيح.

الاستجابة العددية Enumerative Response

اعتماداً على نظام العائل المستخدم (مثلاً الأغشية الكوريولانتويس لأجنة البيض أو مزرعة الخلية) ونوع الاستجابة الحادثة، يعبر عن المعيار كوحدة مكونة للبقع أو وحدات مكونة للأقراص ويختصر كلاً من هذين (PFU) أو الوحدات المكونة للبيور (FFU) لكل مليلتر. في هذه الطريقة، متوسط عدد البقع من أطباق مزدوجة أو اختبارات (اثنين لكل تخفيف) يرتبط مع كمية الفيروس المضاف أو المحقون ابتداءً كالتالي :

$$10^{-10} = \text{تخفيف الفيروس}$$

$$0,1 \text{ مل} = \text{الحجم المحقون}$$

عدد البقع	= ١٤٥ و ١٣٨
متوسط عدد البقع	= ١٤١
المستوى	= 1.4×10^6 PFU/مل

يمكن أن تستخدم مزارع الخلية في التقييم الكمي أو العددي. في حالة الوسط السائل تصيب الفيروسات التي تنتشر خارج الخلية بالتساوي كل المزرعة وتحدث تأثيراً خلوياً مرضياً أو أنتيجينات فيروسية. في التقييم الكمي، يمكن أن تقيم المزارع المزدوجة لوجود أو غياب تأثير الفيروس. يأخذ التقييم العددي ميزة حقيقة أن الفيروس المعدى يمكن أن يصيب الخلية المفردة ويتكاثر ويعطي تغيراً مستديراً في خلية الطبقة الواحدة تحت الوسط شبه الصلب أو الهلامي محدثاً استجابة عددية أو تقييماً عددياً للبقع. انتشار الفيروس خلال الوسط الرائق يجب أن يحاصر بزيادة صلابة الوسط بواسطة الآجار أو مثيل السيلليلوز مما يؤدي إلى المساعدة أحياناً في المحافظة على أو صحة الطبقة الواحدة للخلايا الطبيعية بينما تتغير الخلايا المصابة بالفيروس. مع بعض الفيروسات يفضل إضافة صبغات حيوية مثل الأحمر المتعادل إلى الوسط الصلب أو إضافة الصبغة على سطح الوسط بعد أن يأخذ الفرصة ليتكاثر. مع فيروسات أخرى أو مزارع أخرى، يمكن إزالة الوسط الصلب ويمكن أن تثبت الخلايا وتصيب عندئذ بالهيماتوكسيلين والإيوسين أو صبغات أخرى. في بعض التقييمات، الملاحظة المجهرية أو العينية المباشرة بدون صبغ قد تكون كافية. تحقن فيروسات عديدة على الغشاء الكوريوالانتويس لأجنة البيض محدثةً آفات مستديرة (أقراص أو بقع) والتي يمكن عدها.

التخفيفات Dilutions

للمعلقات البيولوجية، التخفيفات المستخدمة هي تلك التي فيها سائلين يتم خلطهما في معدلات مختلفة التي تكون حجم : حجم (أو حجم/حجم). في التخفيفات المصلية و الفيروسية، ٢ : ١ يعتبر تخفيفاً يتكون من حجم من المادة في إجمالي حجمين من الخليط الذي يكون حجماً واحداً من كل مكون. بالنسبة لباقي هذا الفصل، يستعمل الشكل الاضطراري (مثلاً ١ : ٢) أكثر من التقليدي (مثلاً ٢/١). يتكون التخفيف ١ : ١٠ يتكون من حجم واحد من الكاشف البيولوجي وتوسع أحجاماً من المخفف.

يستعمل التخفيف التسلسلي لتحديد معيار الفيروس بدقة وهو يستخدم عامة باستعمال عوامل ٢ أو ٥ أو ١٠. والتخفيف المتسلسل الأكثر شيوعاً في فيروسات الدواجن هو التخفيف عشاري القيمة على الرغم أن الأكثر إدراكاً هو الأصغر عاملاً، والمعيار الأكثر تحديداً يعتمد على الحجم النهائي المطلوب والتخفيف العشاري المتسلسل ويمكن استخدامه بتحضير أحجام ثابتة من ٩ أو ٤.٥ أو ٠.٩ مل من المخفف.

تحويل المعيار إلى تخفيف Conversion of Titer to Dilution

يمكن استخدام المعادلة التالية لتحويل محلول أكثر تركيزاً معلوم المعيار أو التركيز إلى محلول أكثر تخفيفاً:

$$C \times V = C' \times V'$$

حيث:

C = المعيار أو التركيز الأصلي أو الأساسي

V = الحجم الأساسي

C' = المعيار أو التركيز المطلوب أو النهائي

V' = الحجم المطلوب أو النهائي

على سبيل المثال: محلول فيروس بمعيار 10^4 EID₅₀/مل مطلوب لحقن ٦٠٠ دجاجة بجرعة 10^3 EID₅₀ في ٠,١ مل/دجاجة.

الخطوة الأولى لجعل معيار الفيروس مُعبراً عنه بنفس وحدة الحجم. لذلك، يجب أن يحسب معيار الفيروس لكل ٠,١ مل، الذي يكون 10^4 EID₅₀ لكل ٠,١ مل. الآن يمكن أن تطبق المعادلة كالتالي:

$$10^4 \times V = (10^3 \times 600) \times 0,1$$

$$V = \frac{60 \times 10^3}{10^4} = 6$$

إجمالي ٦ مل من محلول الفيروس الأساسي يجب أن يؤخذ إلى حجم نهائي ٦٠ مل. ينصح دائماً بإعداد كميات إضافية من الفيروس. يمكن أن تستخدم المعادلة السابقة أيضاً عندما يعبر عن التركيزات كنسب (١:٨، ١:١٥)، على الرغم أنه من الأسهل تحويل الكسور إلى نسب وعندئذ تطبق المعادلة.

تحديد عدد الوحدات المعدية Determining Number of Infectious Units

عند معلومية الفيروس تحديد عدد الوحدات المعدية يجب أن يتم الحصول عليها، ويمكن استخدام طرق عديدة لإيجاد التخفيف الصحيح للفيروس. في المثال التالي، الطريقة باستخدام اللوغاريتم بخطوة stepwise method تستعمل لإيجاد التخفيف الصحيح. يجب أن يحقن نظام العائل في المعمل بـ 10^4 ID₅₀/مل من تحضير الفيروس الذي له معيار 10^4 ID₅₀/مل.

طريقة باستخدام اللوغاريتمات Method Using Logarithms

يقسم عدد ID_{50S} المطلوب إلى معيار الفيروس:

$$10^{0.4} \text{ مستوى الفيروس لكل ميليلتر}$$

$$\div 10^3 \text{ كمية الفيروس المطلوبة في ١ مل}$$

$$= 10^{2.4} \text{ أو } 2.5 \text{ (عكس لوغاريتم } 0.4) \times 10^2$$

هذا الشكل من الأس السالب يمثل التخفيف الذي يجب عنده أن يخفف المحلول الأساسي للحصول على 1000 ID₅₀. يمكن أن يحضر تخفيف 10⁻² ويؤخذ منه 1 مل حتى حجم نهائي 2.5 مل للحصول على ID₅₀ الصحيحة. لو ألغى الكسر العشري في المعيار، يجب حساب عكس لوغاريتم 0.4. هذا عكس لوغاريتم يقابل 2.5، وبالتالي:

$$10^{0.4} = 2.5 \times 10^0 / \text{ID}_{50}$$

طريقة الخطوة Stepwise Method

طريقة الخطوة بخطوة التالية يمكن أن تستخدم لإيجاد التخفيف المحتوي على 1000 ID₅₀ في 1 مل من

الطعم:

$$1 \text{ مل من تخفيف } 10^0 \text{ صفر يحتوي } 10^{0.4} \text{ أو } 2.5 \times 10^0 \text{ ID}_{50}$$

$$1 \text{ مل من تخفيف } 10^{-1} \text{ يحتوي } 10^{0.4} \text{ أو } 2.5 \times 10^1 \text{ ID}_{50}$$

$$1 \text{ مل من تخفيف } 10^{-2} \text{ يحتوي } 10^{0.4} \text{ أو } 2.5 \times 10^2 \text{ ID}_{50} \text{ أو } 2500 \text{ ID}_{50}$$

عند هذه النقطة، المعادلة $V' \times C' = V \times C$ يمكن أن تستخدم كالتالي: عندما

$$2500 = C$$

$$1 = V \text{ (بافتراض أن ١ مل فقط يجب أن يؤخذ من المعلق النهائي)}$$

$$1000 = C'$$

$$V' = \text{غير معلومة}$$

$$\text{باستعمال المعادلة السابقة: } 1 \times 2500 = V' \times 1000 \text{ و } 2.5 = V'$$

لذلك، 1 مل من تخفيف 10⁻² من الفيروس يجب أن تؤخذ حتى حجم نهائي 2.5 مل، الذي هو 1.5 مل

من المخفف و 1 مل من تخفيف 10⁻¹ من الفيروس.

حساب معيار المتوسط الهندسي Calculation of Geometric Mean Titers

عادة يعبر عن النتائج المصلية الفردية بمقلوب نقطة نهاية تخفيف المصل. يستخدم هذا النظام لمسلسل التخفيف الثنائي الذي يبدأ مع إما التخفيف العشري أو الثنائي. مثال لهذه النتائج ١٠، ٢٠، ٤٠، ...، ٣٢٠، أو ٢، ٤، ٨، ...، ٢٥٦. هذه النتائج عادة تعبر بمصطلحات هندسية التي يمكن أن تكون مفيدة عند تقييم نتائج عينات مصل قليلة. في حالة الأعداد الكبيرة تصبح الطريقة السابقة مكلفة جداً للوقت. أيضاً العينات القليلة بمستويات عالية جداً أو قليلة جداً سوف تعطي متوسط هندسياً غير منطقي والذي يمكن أن يكون مضللاً عند تقييم النتائج. توجد معظم النتائج المصلية في الأبحاث كمعايير متوسط هندسي على الرغم أنها تعبر في مصطلحات حسابية. بالتالي تكون معرفة الطرق لحساب المتوسط الهندسي مهمة. المعادلة العامة لحساب المتوسط الهندسي هي:

$$GM = \sqrt[n]{X_1 X_2 X_3 \dots X_n}$$

حيث x = قيمة الملاحظة، و n = عدد الملاحظات. يمكن تحديد المتوسط الهندسي بعدد من الطرق التالية.

طريقة تستخدم مستويات اللوغاريتم العاشر لو ١٠ Method Using Log₁₀ Titers

قاعدة لو ١٠ لمقلوب المستوى لكل عينة تجمع ويقسم المجموع على العدد الكلي للعينات. يمثل العدد الناتج لوغاريتم المتوسط الهندسي. سوف يكون مستوى المتوسط الهندسي عكس اللوغاريتم للعدد الناتج. على سبيل المثال نتيجة اختبار منع تلازن الدم من ٢٠ عينة مصل كانت كالتالي (المعيار معبراً عنه كمقلوب تخفيف المصل): ست عينات بمعيار ٥، و٧ عينات بمعيار ٢٠، و٥ عينات بمعيار ٤٠، وعينتين بمعيار ٨٠. لإيجاد المتوسط الهندسي للوغاريتم ١٠:

$$(١) \text{ لوغاريتم } ٥ = ٠,٦٩٨ \times ٦ = ٤,١٩٣$$

$$\text{لوغاريتم } ٢٠ = ١,٣٠١ \times ٧ = ٩,١٠٧$$

$$\text{لوغاريتم } ٤٠ = ١,٦٠٢ \times ٥ = ٨,٠١٠$$

$$\text{لوغاريتم } ٨٠ = ١,٩٠٣ \times ٢ = ٣,٨٠٦$$

(٢) أضف كل النتائج الجزئية واقسم على العدد الكلي للعينات:

$$١,٢٥٥٨ = ٢٠ \div ٢٥,١١٦ = ٣,٨٠٦ + ٨,٠١٠ + ٩,١٠٧ + ٤,١٩٣$$

والتي تمثل لوغاريتم المتوسط الهندسي.

(٣) أوجد عكس اللوغاريتم ١,٢٥٥٨ = ١٨,٠٢ = مستوى المتوسط الهندسي.

طريقة باستخدام عدد الأنبوبة (لوغاريتم، المعدل) والجداول

Method Using Tube Number (Modified Log₂) and Tables

عند تسجيل نقطة نهاية التخفيف للاختبارات المصلية بواسطة رقم الأنبوبة واستعمال أي مسلسل تخفيف، يمكن أن يحسب المتوسط الهندسي بسهولة بالرجوع إلى الجدول الموضوع بواسطة Brugh (2) (الجدول رقم ٤٥،٢). يمكن حساب معيار المتوسط الهندسي عندما يكون التخفيف الأساسي إما ٢ : ١ أو ٥ : ١ أو ١٠ : ١ أو ٢٠ : ١.

الجدول رقم (٤٥،٢). تحويل قاعدة لوغاريتم، متوسط المعايير إلى متوسط معايير هندسية.

Mean titer ^A			Reciprocal of GMT at proportionate distance between dilutions.									
1:5	1:10	1:20	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
1	—	—	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9
2	1	—	10	11	12	12	13	14	15	16	17	19
3	2	1	20	21	23	25	26	28	30	32	35	37
4	3	2	40	43	46	49	53	57	61	65	70	75
5	4	3	80	86	92	98	106	113	121	130	139	149
6	5	4	160	171	184	197	211	226	243	260	279	299
7	6	5	320	343	368	394	422	453	485	520	557	597
8	7	6	640	686	733	788	844	905	970	1040	1114	1194
9	8	7	1280	1372	1470	1576	1689	1810	1940	2079	2229	2389
10	9	8	2560	2744	2941	3152	3378	3620	3880	4159	4457	4777
11	10	9	5120	5487	5881	6303	6756	7241	7760	8317	8914	9554
12	11	10	10,240	10,975	11,763	12,607	13,512	14,482	15,521	16,635	17,829	19,109
13	12	11	20,480	21,950	23,525	25,214	27,024	28,963	31,042	33,270	35,658	38,217
14	13	12	40,960	43,900	47,051	50,428	54,047	57,926	62,084	66,540	71,316	76,434
15	14	13	81,920	87,800	94,101	100,856	108,094	115,852	124,168	133,079	142,631	152,868
16	15	14	163,840	175,599	188,203	201,711	216,188	231,705	248,335	266,159	285,262	305,736

^A يعبر عن متوسط نقطة نهاية المعيار بالتخفيف أو رقم الأنبوبة. تخفيف مادة الاختبار (مثلاً المصل) في الأنبوبة الأولى من التسلسل المزدوج. للقياسات بتخفيف أولي ٢ : ١، استخدم العمود ١ : ٢٠ واقسم النتائج على ١٠.

اعتماداً على أيها التخفيف الأساسي المستخدم، يمكن الحصول على العدد الكلي الناتج من متوسط أعداد الأنابيب الموجود في واحد من ثلاثة أعمدة على الجانب الأيسر للجدول رقم (٤٥،٢). يوجد الرقم العشري غالباً في رؤوس العمود لباقي الجدول. على سبيل المثال إذا كان التخفيف الأساسي المستخدم في اختبار منع التلازن لعدد ١٠ عينات مصلية هو ٥ : ١، فتسجل النتائج برقم الأنبوبة كالتالي:

عينتين بنقطة نهاية في الأنبوبة ٣، و ٣ عينات بنقطة نهاية في أنبوبة ٤، و ٤ عينات بنقطة نهاية في أنبوبة ٥، وعينة واحدة بنقطة نهاية في أنبوبة ٦. متوسط رقم الأنبوبة:

$$٤٤ = (٦ \times ١) + (٥ \times ٤) + (٤ \times ٣) + (٣ \times ٢)$$

$$٤.٤٠ = ١٠ \div ٤٤$$

العدد الكلي ٤ يوجد في العمود تحت تخفيف ٥ : ١ والكسر العشري ٠.٤ يوجد على اليمين من الجدول. يكون المتوسط الهندسي من الجدول هو ٥.٣. هذه الطريقة مفيدة جداً، خاصة عند استعمال الأدوات الأوتوماتيكية وعدد كبير من العينات يتم اختبارها.

الطريقة الحسابية لأي معامل تخفيف Arithmetic Method for Any Dilution Factor

يمكن حساب المعيار حسابياً للتخفيف الثنائي أو لأي تخفيفات أخرى من المعادلة التالية:

$$\text{المتوسط الهندسي} = \text{عكس اللوغاريتم (متوسط نقطة النهاية لرقم الأنبوبة - 1)} \times (\text{لوغاريتم العامل}) + (\text{لوغاريتم مقلوب أول تخفيف})$$

في المثال السابق:

$$\text{المتوسط الهندسي} = \text{عكس اللوغاريتم (1 - 4.4)} \times (0.30102) + (\text{لوه})$$

$$= \text{عكس لوغاريتم } 1.0234 + 0.6990$$

$$= \text{عكس لوغاريتم } 1.7224$$

$$= 52.77 = 53$$

المراجع References

1. Brian W. J., and H. O. Kangro. Virology methods manual. Academic Press, Inc., San Diego, California, 1996.
2. Brugh, M. A., Jr. A simple method for recording and analyzing serological data. Avian Dis. 22:362-365. 1978.
3. Burlison, F. G., T. M. Chambers, and D. L. Wiedbrauk. Virology—a laboratory manual. Academic Press, Inc., San Diego, California 1992.
4. Campbell, J. M., and J. B. Campbell. Laboratory mathematics: medical and biological applications, 3rd ed. The C. V. Mosby Co., St. Louis, Mo. 1984.
5. Cottral, G. E., ed. Manual of standardized methods for veterinary microbiology. National Academy of Sciences, National Research Council, Washington, D.C. p.731. 1978.
6. Hsiung, G. D. Diagnostic virology. Yale University Press, New Haven, Conn. 1982.
7. Reed, L. J., and H. Muench. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27:493-497. 1938.
8. Villegas, P., and H. G. Purchase. Titration of biological suspensions. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3rd ed. H. G. Purchase, L. H. Arp., C. H. Domermuth, and J. E. Pearson, eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Penn. pp. 186-191. 1989.