الفصل السادس والأربعون

الطرق المصلية
SEROLOGICAL PROCEDURES

ستيفان ج. ثاير، وتشارلز و. بيرد
Stephan G. Thayer and Charles W. Beard

الملخص Summary

يتكون الفحص المصلي للطيور من اتحاد طرق الاختبار الكلاسيكية مثل اختبار الترسيب في الآجار واختبار التلازن الشريحي واختبار تعادل الفيروس ومنع تلازن الدم، مع التقنيات الجديدة مثل الإليزا. معظم الاختبارات سهلة التطبيق نسبياً لكن يكون ضبط الجودة مهماً وأساسياً.

يعرف أيضاً اختبار الترسيب في الآجار (AGP) باختبار الانتشار المناعي في هلام الآجار (AGID) أو اختبار الانتشار المناعي المزدوج (DID)، وهو الأبسط في الإعداد، ويتطلب فقط أمصالاً ضابطة إيجابية وسالبة، وأنتيجيناً مركزاً والآجار المناسب. يمكن أن تكتشف الأجسام المناعية للعوامل المرضية مثل فيروس إنفلونزا الطيور وفيروس النزف المعوي والأدنيوفيروس بهذه الطريقة.

تستخدم اختبارات تلازن الطبق كاختبارات استكشافية للسالمونيلا بللورم وجالينيرم والأنواع الأخرى من السالمونيلا وأنواع ميكوبلازما. تتطلب هذه الاختبارات أنتيجيناً مصبوغاً أو غير مصبوغ يختلط مع إما الدم الكامل (سالمونيلا بللورم جالينيرم) أو المصل (ميكوبلازما). إنه من الضروري إجراء اختبارات تأكيدية لأن اختبارات التلازن يمكن أن تعطي تفاعلات إيجابية زائفة أو سالبة زائفة.

اختبار تعادل الفيروس هو الأكثر إجهاداً ويحتاج للخبرة في تداول الفيروسات الحية أو تقنيات مزرعة الخلية أو طرق حقن الأجنة وتقييم التغيرات المرضية الخلوية أو التأثيرات المرضية في الأجنة النامية. يمكن أن تقيم الأجسام المضادة للأمراض الفيروسية المختلفة مثل مرض البيرسا المعدي وفيروس التهاب المفاصل وبعض فيروسات الأدينو بهذه الطرق. تفضل اختبارات تعادل الفيروس غالباً لأنها تميل أن تكون أكثر قرباً في انعكاس التعادل الفيروسي داخل الخلية الحية.

اختبار منع تلازن الدم يستخدم لمعايرة الأجسام المضادة لأمراض الطيور مثل فيروس مرض نيوكاسل وإنفلونزا الطيور والالتهاب الشعبي وفيروس أدينو ١٢٧ وميكوبلازما. تلازن الدم هو نشاط طبيعي لفيروسات إنفلونزا الطيور وفيروسات نيوكاسل وأدينو ١٢٧. ويمكن أن يُستَحث مع فيروس الالتهاب الشعبي بالمعاملة ما قبل بواسطة إنزيم نيوراميداز.

يمكن أن تستخدم الإليزا لعمل معايرة الأجسام المضادة لعدد كبير من عوامل المرض الفيروسية والبكتيرية في الطيور. تتوافر الأطقم تجارياً وتقدم ميزة للبروتكول المفرد لعمل اختبارات متعددة على نفس العينة. يستخدم طبق صغير به ٩٦ حفرة كما يمكن جعل الاختبار نصف أوتوماتيكياً باستخدام غسالات للطبق وكمبيوتر للتحكم في قارئ الطبق الصغير.

المقدمة Introduction

يناقش هذا الفصل الطرق المصلية الأكثر استخداماً في مجال طب الطيور. لا تعطينا المناقشة خطوات محددة لتتبع كل الأمراض لأن الاختبارات تختلف باختلاف المرض وباختلاف النظام المعملي هل يعمل على أساس ماكرو أو ميكرو. ويضم هذا الفصل المعلومات التي يمكن أن تستعمل مع التوصيات النوعية المصلية الأخرى في فصول المرض السابق شرحها وفي البحوث الأخرى لعمل التقنية المرغوبة بشكل أكثر دقة ومتكرر النتائج.

الاقتراحات التالية قد تساعد في الحصول على مصل نظيف في كميات مناسبة :

١) استعمل أنابيب من السيليكون المشطوف (33). يمكن أن تشترى أو تعامل بالسيليكون في المعمل.

٢) لا تملأ الأنبوبة لأكثر من ربع طاقتها إذا لم تستعمل أوعية جمع الدم مثل تلك المزودة بحبيبات بلاستيكية للمساعدة في فصل المصل.

٣) بعد تغطية الأنبوبة ، ضعها في الوضع الأفقي أو قريباً إلى ذلك.

٤) احفظ عينات الدم دافئة أثناء طريقة الإدماء ، واستعمل الحرارة من لمبة إضاءة أو وسائل أخرى.

٥) ضع العينات أفقياً في حضان عند درجة ٣٧ $^{\circ}$م لعدة ساعات.

٦) اترك العينة رأسياً عند درجة الغرفة أو في المبرد (٤ $^{\circ}$م) طوال الليل. يمكن أن يسكب المصل بحرص في عبوات أو يسحب في أطباق تخزين مصل دقيقة (31). تحوير طريقة أخذ عينات الدم بورق الترشيح (10) تجعل هذه التقنية خاصة مناسبة للفحص المصلي الدقيق في الدواجن.

اختبار منع تلازن الدم Haemagglutination-Inhibition (HI)

تشمل فيروسات الدواجن التي تلزن خلايا الدم الحمراء فيروس مرض نيوكاسيل وفيروس الإنفلونزا وفيروس الالتهاب الشعبي المعدي (بعد التركيز ومعاملة الإنزيم) وفيروس أدينو ١٢٧. تستطيع عدة أنواع ميكوبلازما أيضاً أن

تلزن الدم. تثبيط التلازن بالأجسام المضادة النوعية هي أساس هذا الاختبار. هذا الاختبار هو وسيلة مصلية تقليدية واقتصادية تطبق بكثرة في أمراض الدواجن العديدة عن طريق قياس الاستجابة للتحصين وأدلة ما بعد العدوى.

المكونات الأساسية للاختبار هي الأنتيجين الملزن للدم والمصل المخفف بتسلسل متناقص التركيز ومعلق خلايا الدم الحمراء. يمكن أن يجرى الاختبار في أنابيب أو أطباق اختبار دقيقة. تستعمل طريقة بيتا (أنتيجين ثابت مصل مخفف) أكثر من طريقة ألفا (مصل ثابت أنتيجين مخفف).

يختلف تحضير الأنتيجين الملزن للدم اعتماداً على المعمل والعامل الممرض. إنه يمكن أن يكون بسيطاً مثل فيروس نيوكاسيل في سوائل البيض ٤٨ – ٧٢ ساعة بعد الحقن أو معلق مركز من ميكروب ميكوبلازما.

وصفت طريقة تحضير أنتيجين النيوكاسيل (6). عند جمع سوائل البيض يجب تبريد البيض عند ٤ °م لعدة ساعات لتقليل فرصة تلوث السوائل بخلايا الدم الحمراء. تتراوح كمية الأنتيجين المستعمل لكل حفرة في الاختبار من ٨ – ١٠ وحدات تلازن دم للنيوكاسيل و٤ وحدات للإنفلونزا حتى ٢ – ٤ وحدات للميكوبلازما، ويعتمد تخفيف الأنتيجين المطلوب على تحديد عدد وحدات التلازن في معلق الأنتيجين. إذا خفف معلق الأنتيجين بالنقل الثنائي (٠,٥ مل إلى ٠,٥ مل في أنبوبة أو ٥٠ ميكروليتر إلى ٥٠ ميكروليتر في الأطباق الدقيقة) يؤدي إلى تخفيفات ١ : ٢، ١ : ٤، ١ : ٨ ... وهكذا، ويحدث التلازن الكامل عند ١ : ٥١٢ لكن ليس عند ١ : ١٠٢٤، ويحتوي المعلق على مستوى تلازن دم ٥١٢ (تخفيف ١ : ٥١٢ من المعلق يحتوي نظرياً على وحدة تلازن واحدة). هذا يعني أن تخفيف ١ : ٥١٢ من المعلق بها ١٠ وحدات تلازن دم، وتخفيف ١ : ٢٥٦ به ٢ وحدة، وهكذا. وإذا كان المطلوب الحصول على دقة أكثر في تقدير نشاط التلازن لمعلق الأنتيجين، تُستخدم تلقائياً مجموعتان من تخفيفين مضعفين: واحدة تبدأ بتخفيف ١ : ١٠ والثانية تبدأ بتخفيف ١ : ١٥. ينصح دائماً بالمعايرة الراجعة أو العكسية لمعلق الأنتيجين مع معلق خلايا الدم المستعمل في اختبار منع التلازن للتأكد من أن نشاط التلازن قد قيم فعلياً. إذا حسب ٨ وحدات تلازن دم أنه معلق الأنتيجين النهائي الاستخدام فإن التخفيف الثنائي (١ : ٢) سوف يحتوي على ٤ وحدات والذي يليه (١ : ٤) يجب أن يحتوي على ٢ وحدة، والتالي (١ : ٨) يحتوي على وحدة واحدة، والتالي (١ : ١٦) يجب أن يكون سالباً للتلازن.

يوجد اختلافان أساسيان في طرق اختبار التلازن ترجع إلى أنتيجين التلازن. في اختبارات فيروس الإنفلونزا والميكوبلازما والتلازن، تخفيفات السيرم تتم عادة في مخلوط من الأنتيجين والمحلول الملحي (saline). في اختبارات الإنفلونزا التلازن وأنتيجين التلازن يضاف عادة إلى السيرم المخفف في خطوة إضافية. لو استخدمت طريقة إضافة الأنتيجين، فإن الأنتيجين يجب أن يخفف إلى العدد المطلوب من وحدات التلازن في الحجم النهائي من السيرم المخفف مع إضافة الأنتيجين قبل إضافة كرات الدم.

مستوى أنتيجين التلازن المستخدم في الاختبار بدون شك يؤثر على نتائج الاختبار النهائي ولكم اختلافات طفيفة في عدد وحدات التلازن قد تسبب تأثيراً على معيار التلازن في اختبار السيرم. عامة، زيادة مستوى الأنتيجين يؤدي إلى خفض الحساسية وتقليل مستوى الأنتيجين يزيد من الحساسية.

العديد من المتغيرات الأخرى غير تركيز الأنتيجين المستعمل يمكن أن يؤثر على النتائج وتشمل تركيز معلق خلايا الدم الحمراء والوقت بين الخلط للمصل والأنتيجين وإضافة خلايا الدم، درجة الحرارة التى عندها يترك هذا الخليط والمقاييس المستعملة في قراءة الاختبار. Brugh *et al.* (11) قام بدراسة العديد من المتغيرات لفيروس النيوكاسيل وأوصى بزمن قياسي قبل إضافة خلايا الدم. عندما تكون درجة حرارة الاختبار ٣٧ °م، يجب أن يكون نشاط تلازن الدم للأنتيجين ثابتاً عند تلك الدرجة لأن تغير الأنتجين يمكن أن يزيد من خطأ معيار منع التلازن.

معلق خلايا الدم الحمراء Erythrocyte Suspension

تؤخذ خلايا الدم من دجاجة مفردة إذا أوضحت الخبرة أن المعطى مناسباً، وإلا فإنه يوصى بالجمع من ثلاث دجاجات كحد أدنى (1). يمكن أن يستعمل الدجاج المحصن ضد فيروس النيوكاسيل كمعطى عند الضرورة ويعطى الحرص لطريقة غسيل كرات الدم الحمراء. يستعمل غالباً الرومي كمعطى عند اختبار مصل الرومي لنشاط منع تلازن الدم، ومن ثم تتضاءل التفاعلات غير النوعية. عند اختبار أمصال الرومي، يجب عمل كلٍّ من تلازن الدم ومنع التلازن باستعمال خلايا الدم الحمراء للرومي.

يجب أن يحتوي المحقن المستعمل لسحب الدم على مانع تجلط مثل ٤٪ سترات الصوديوم (١ جزء إلى ٤ أجزاء من الدم) أو محلول ألسيفر (حجم متساوي). بعد خلطه جيداً بلطف ينقل الدم ببطء إلى أنابيب طرد مركزي مخروطية كبيرة للغسل. يضاف حجم مساوي من محلول ملح منظم الفوسفات (رقم حموضة ٧ – ٧,٢) ويطرد الخليط مركزياً عند ٥٠٠ إكس جي لمدة ٥ دقائق. يتخلص من الرائق ويضاف من ٢٠ – ٣٠ حجم من محلول ملح الفوسفات إلى الخلايا المعبأة. يعاد تعليق الخلايا بهدوء وتعاد خطوة الطرد المركزي مرة أخرى وهكذا. عند ذلك يمكن أن تستعمل الخلايا لتحضير معلق ٠,٥٪ اعتماداً على الحجم بإضافة ٠,٥ مل من الخلايا المعبأة إلى ١٠٠ مل من محلول الملح عند رقم حموضة ٧ – ٧,٢. يمكن أن يضبط تركيز خلايا الدم الحمراء باستعمال أنبوبة هوبكنز Hopkins أو مقياس كثافة الضوء.

يمكن أن تخزن الخلايا غير المخففة في حجم كبير من محلول ألسيفر (حوالي ٣٠ مل إلى ٢ مل من الخلايا المعبأة) بخلطها في المحلول وحفظها عند ٤ °م. يمكن أن تستخدم الخلايا حتى ٦ أيام عند عدم ملاحظة التحلل. يتم إجراء الطرد المركزي للخلايا وتخفف كما وصف عند الحاجة للاختبار.

طرق الاختبار (بيتا وألفا) Test Procedures (β and α)

طرق الاختبار الدقيق تستخدم على نطاق واسع ويوصى بها في اختبارات التلازن. هذه التقنيات مناسبة واقتصادية ومرضية وتقلل ١٠ مرات كمية المواد المستخدمة. وصف طريقة الاختبار الدقيق تم في نسخة سابقة من هذا الكتاب (34).

طريقة بيتا (مصل مخفف–فيروس ثابت)

β-Procedure (Diluted–Serum Constant–Virus)

يمكن إجراء اختبار منع التلازن بطريقة بيتا كالتالي:

١) يخفف أنتيجين تلازن الدم في محلول الملح حسب نشاط التلازن ليعطي ١٠ وحدات تلازن دم في ٥٠ ميكروليتر، على سبيل المثال إذا كان معيار الأنتيجين ١ : ٢٥٦٠، ويخفف ١ : ٢٥٦. الأنتيجين المعطل الموصوف بواسطة Beard *et al.* (6) ثابت وآمن لأنه غير معدي.

٢) يوزع الأنتجين–محلول ملح إلى الأطباق باستعمال موزع ١٢ قناة أو ماصة دقيقة متعددة القنوات المزودة بطرق للاستخدام مرة واحدة. أضف ١٠٠ ميكروليتراً إلى الصف الأول و٥٠ ميكروليتراً إلى الصفوف الأخرى. يمكن أن ينجز هذا بسهولة بوضع موزع dispenser لتوزيع الكمية المطلوبة لكل ضربة. الموزعات الآلية أيضاً متوفرة لتوزيع الكواشف ولعمل التخفيفات في الأطباق الدقيقة microplates.

٣) إذا جمعت الأمصال وحفظت في أطباق دقيقة (28)، يمكن أن يلتقط ١٢ مصلاً بسهولة مرة واحدة باستعمال ماصة دقيقة ضرورة ١٢ طرف. تضاف الأمصال (٢٥ ميكروليتراً) إلى الصف الأول من ٩٠ ميكروليتر–حفر وتخلط، مؤدية إلى تخفيف ١ : ٥ من المصل للصف الأول لكل طبق. تخفف الأمصال بحرص كل طبق باستخدام ماصة دقيقة مضبوطة عند ٥٠ ميكروليتراً للخلط في الحفرة والنقل في التخفيفات التسلسلية. هذا يؤدي إلى تخفيفات ١ : ٥، ١ : ١٠، ١ : ٢٠، وهكذا. دائماً يوضع مصل ضابط إيجابي معلوم القيمة في مكان محدد من أطباق تخزين المصل يخدم في الاستدلال على كمية الاختلاف بين الاختبارات. الطريقة البديلة لتخفيف المصل هي إضافة ٥٠ ميكروليتراً من الأنتيجين–محلول الملح إلى كل حفرة. يضاف ٥٠ ميكروليتراً من المصل المراد اختباره إلى الصف الأول مؤدياً إلى تخفيف ١ : ٢. بعد خلط المصل، يمرر ٥٠ ميكروليتراً إلى الصف التالي وهكذا مؤدياً إلى تخفيفات ١ : ٤، ١ : ٨، ...، وهكذا. العيب الوحيد لهذه الطريقة هي أن التخفيف ١ : ٢٥٦ هو أعلى تخفيف للمصل الذي يمكن اختباره عند وضع ١٢ اختباراً في طبق مفرد. من غير المعتاد الحصول على نتائج منع تلازن غير نوعية عند التخفيفين الأول والثاني في الطريقة البديلة.

٤) تترك الأطباق على درجة حرارة ٣٧°م لمدة ساعة. بعض المعامل تترك الاختبار عند درجة حرارة الغرفة لمدة ١٠ دقائق، ويمكن تغطية الأطباق لتجنب التبخر بدلاً من وضعها في الكيس البلاستيكي.

٥) بعد ساعة من التحضين يضاف ٥٠ ميكروليتراً من ٠,٥٪ معلق خلايا الدم الحمراء للدجاج لكل حفرة. يساعد التقليب الدائري الهادئ لمعلق الخلايا في الحفاظ على توزيع متساوٍ للخلايا في الحفر.

٦) تترك الأطباق عند درجة حرارة الغرفة حتى يترسب زراراً كامل الاستدارة من الخلايا غير المتلازنة. يحدث عادة ذلك في حوالى ٤٥ دقيقة. هذه الحفر التي تكون سالبة للتلازن تكون بها طبقة منتشرة من خلايا متلازنة تغطي القاع وتساعد مرآة القراءة في قراءة النتائج وتكون ذات فائدة في تسجيل النتائج مباشرة. بعض الباحثين يعتقد في إمالة الأطباق وملاحظة "سقوط الدمع" أو تحرك الأزرار لمشاهدة أن الخلايا غير متلازنة.

٧) تسجل النتائج كمقلوب التخفيف الأعلى للمصل الذي عنده يحدث تثبيط كامل للتلازن الدموي. هذه القيمة (١٦٠ إذا كان ١ : ١٦٠ هو أعلى تخفيف مثبط) لا تضرب بعدد وحدات التلازن المستخدمة في الاختبار. الطريقة المعتادة لقراءة النتائج وحساب متوسط القيم الهندسية قررت بواسطة Brugh (9). في المعامل حيث لا تتوافر أدوات الاختبار الدقيق، يمكن إجراء اختبار بطريقة كافية باستخدام نفس التخفيفات لكن بإحلال ٠,٥ مل بدلاً من ٥٠ ميكروليتراً. تعتبر النتائج بين الطريقتين الدقيقة والكمية ذات قيمة في المقارنة. يمكن أن يحكم بالخطأ على تهرب الأنتيجين من الخلايا المتلازنة كتثبيط تلازن الدم. مشكلة التهرب غالباً عند استخدام فيروسات نيوكاسيل حية أو سريع التهرب كأنتيجين لاختبار التلازن في المعامل التي بها درجات حرارة مرتفعة. يجب ألاّ تستعمل الفيروسات سريعة التهرب كأنتيجين تلازن دم. يمكن تلافي التلوث التصالبي في المعامل متعددة الأغراض بإبطال كل الأنتيجينات الملزنة للدم بإضافة الفورمالين حتى تركيز نهائي ٠,١٪ والتحضين لمدة ٢٤ ساعة عند ٣٧°م وهذه تمثل طريقة كافية لفيروس مرض نيوكاسيل.

التعليمات الأخرى لعمل اختبار منع تلازن الدم مع فروق ضئيلة أو كبيرة تتوافر من مصادر أخرى (19, 7, 3, 2, 1). يجب أن يشمل الاختبار أمصالاً ضابطة إيجابية مماثلة ومعروفة المستوى لتسهيل مقارنة النتائج (8). لو تم الحصول على هذه الأمصال الإيجابية من معامل مرجعية، يمكن أن تعمل مقارنة بين المعامل المختلفة في إنجاز الاختبار. المقارنة على مدى واسع في معيار التلازن يمكن الوصول إليه من المعامل المختلفة حتى لو استخدم نفس معلق الأنتيجين والذي يؤكد الحاجة إلى مصل مرجعي له معيار معروف.

طريقة ألفا (مصل ثابت–فيروس مخفف)

α-Procedure (Constant–Serum Diluted-Virus)

تحتاج طريقة ألفا لتخفيفات مختلفة من فيروس مرض نيوكاسيل وكمية ثابتة من المصل. يخفف المصل ليختبر حتى ١ : ٥ أو إلى تخفيفات أخرى مناسبة وينقل إلى محلول الملح في اختبار تلازن الدم. تخلط تخفيفات الفيروس والمصل وتحضن عند درجة الغرفة لمدة ١٠ دقائق قبل إضافة خلايا الدم الحمراء. ويكمل الاختبار كما في الطريقة السابقة. يجب أن يجرى اختبار التلازن لمستوى الفيروس فقط ولمستوى المصل مع الفيروس لكي يقارن.

لأن طريقة بيتا تعطي تقييماً أفضل لمستوى منع التلازن للأمصال فإن طريقة ألفا لم تستخدم في معظم المعامل. لوصف أكثر لطريقة ألفا انظر كتاب "الطرق لفحص بيولوجيات الطيور والتعريف وقياس الكم لمرضات الطيور" Methods for Examining Poultry Biologics and for Identifying and Quantifying Avian Pathogens (4).

اختبار تلازن الدم Hemagglutination Test

التطبيق المفيد لهذا الاختبار يكون أثناء عزل فيروس مرض نيوكاسيل والفيروسات الأخرى الملزنة للدم. تؤخذ كمية صغيرة من السوائل السقائية عقب العزل في بيض الأجنة. يمكن أن تجرى هذه الخطوة بعد تبريد البيضة لتقليل فرصة تلوث سوائل البيض بكرات الدم الحمراء أثناء طريقة أخذ العينة من السوائل. توضع كمية ٠,١ مل من السوائل السقائية في طبق المعايرة الدقيقة أو أنبوبة زجاجية. بعد عمل التخفيفات الثنائية في محلول الملح، يضاف ٠,١ مل من ٠,٥٪ معلق خلايا الدم. يمكن عمل نفس الطريقة من السوائل السقائية من البيض الذي لم يتم حقنه كضابط سالب. هذا السائل يعمل كضابط سالب لا يجب أن يلزن الدم. عند ملاحظة نشاط التلازن مع السوائل من البيض المحقون، يجب عمل اختبارات منع التلازن لمعرفة الأمصال الملزنة وغير الملزنة لمرض نيوكاسيل للدجاج (يفضل من دجاج خالٍ من المرضات النوعية) لتحديد ما إذا كان فيروس مرض النيوكاسيل هو سبب التلازن. بعد خلط التخفيفات من السوائل السقائية مع الأمصال العادية والمناعية، تضاف كميات متساوية من ٠,٥٪ خلايا دم حمراء. إذا كان الأنتيجين المشتبه هو فيروس نيوكاسيل، سوف يمنع المصل المضاد لفيروس النيوكاسيل التلازن في السوائل المحتوية على فيروس نيوكاسل التلازن. هذه طريقة مرضية وسريعة لحصر الأجنة التي تم حقنها بينما لا تزال قيد الاستخدام المعملي. إذا كان إيجابياً تجمع السوائل الباقية لاختبارات إضافية.

نظراً لوجود ١٥ أنتيجيناً ملزناً للدم على فيروسات إنفلونزا الطيور، فإن هذه الطريقة غير تقليدية لتحديد ما إذا كان التلازن بسبب فيروس الإنفلونزا إلا إذا حدث وباء معروف بنمط فيروس الإنفلونزا المسبب له.

الانتشار المناعي Immunodiffusion

يستخدم كثيراً في طب الطيور لإظهار وتحليل تفاعلات الأجسام المضادة والأنتيجين، حيث يسمح الاختبار بمشاهدة مركب الأنتيجين مع الجسم المضاد كترسيبات عند اختلاط هذين المتفاعلين أثناء الانتشار في الوسط شبه الصلب مثل الآجار. الانتشار المناعي هو تقنية مناعية عالية التخصص وقليلة التكلفة وبسيطة التطبيق. تستخدم عامة في معظم المعامل بطريقة الانتشار المزدوج وفيها ينتشر كلٌّ من الأنتيجين والجسم المضاد تجاه الآخر خلال الآجار على شرائح زجاجية أو أطباق بتري. تسمى عدة مسميات مثل اختبار الترسيب في الآجار واختبار الانتشار المناعي في الآجار واختبار الانتشار المناعي المزدوج واختبار أوشتولوني Ouchtelony test.

يعتمد الاختبار على انتشار الأنتيجين والأجسام المضادة من حفرتها خلال الآجار شبه الصلب. عند وصول التركيز النسبي المناسب لكل كاشف يتكون ترسيب محدثاً خطاً أو خطوطاً اعتماداً على عدد اتحادات الأنتيجين والجسم المضاد الذي يحتوي على التركيزات النسبية المطلوبة لتكوين ترسيب مرئي.

وصف الاختبار لأمراض الدواجن المختلفة شاملة مرض مارك (29)، ومرض البيرسا المعدي (16)، والالتهاب الشعبي المعدي (36 ,37)، والتهاب المفصل الفيروسي (23)، والارتعاش الوبائي (AE) (20)، وإنفلونزا الطيور (5)، ومرض نيوكاسيل (14)، وجدري الطيور (17)، والإصابة بالميكوبلازما (22)، وأخرى (21). يتطلب كل تطبيق عملي تقنيات مناسبة لتحضير الأنتيجين واختبار المحاليل المنظمة وتكوين الهلام. لذلك يجب أولاً الإحاطة بأساسيات التفاعل والطريقة العامة كما وصفت في كتب مختلفة (13 ,18 ,32).

ميزات مثل هذا الاختبار متعددة. باستخدام الكواشف المرجعية المعروفة يستطيع الباحثون في المعمل التعرف على إما العامل المعدي أو الأجسام المضادة. رؤية خطوط الترسيب التي تلتحم مع خطوط التعرف من المتفاعلات المعروفة هو طريقة تشخيصية مؤكدة تحتاج لتكلفة وجهد قليل.

تستخدم عدة طرق لوضع الهلام وتُستخدم غالباً أطباق بتري البلاستيكية أو الزجاجية. تقطع أسطوانات من الهلام بالقاطعة المصنعة أو التجارية وتزال لتحدث حفر العينة (24). الشكل المعتاد هو ستة حفر حول حفرة مركزية. الحفر تكون تقريباً ٥،٣ ملم في القطر وتسع حوالى ٢،٤ ملم. ينتج السمك الصحيح للاجار (٢،٨ ملم) تقريباً بوضع ١٥ — ١٧ مل من الآجار في طبق بتري سعة ١٠٠ ملم أو ٦ مل في طبق سعة ٦٠ ملم. تشفط سدادة الآجار بماصة صغيرة متصلة بقارورة الشفط. أحياناً يقفل قاع الحفرة بنقطة صغيرة من الوسط الذائب لمنع الكواشف من التسرب تحت الهلام بدلاً من الانتشار خلاله. بعض العاملين يستخدم الأطباق البلاستيكية المتوافرة تجارياً للاختبار (معامل ألفا جاما، كاليفورنيا) (Alpha Gamma Laboratories, Inc., Sierra Madre, Calif.). إذا كانت الأطباق المحتوية على وسط الانتشار غير محكم الغلق، يجب أن توضع في غرفة رطبة مثل الكيس البلاستيك الذي يحتوي على فوطة ورقية لتجنب جفاف الآجار. يمكن أن تجهز بيئة الانتشار على شريحة المجهر الزجاجية التي لها أطرف مجمدة.

إذا قطع نمط ثابت من الحفر إلى الوسط، يمكن أن تعلم الحفر عند نهاية الشريحة المتجمدة للهبوط. الشرائح يمكن أن توضع في غرفة عند رطوبة في صينية صبغ الشرائح بشكل عمودي بحيث تكون الشرائح أفقية. يمكن أن توضع الشريحة في غرفة رطبة، إناء مغلق يؤمن عدم جفاف الهلام. إذا كانت الحرارة في المعمل أقل من ٢١° م فيجب وضع الأطباق أو الشرائح في حضان ٢٦° م.

يوضع كل مصل مشكوك فيه أو أنتيجين جوار الكاشف الإيجابي المعلوم. هذا يجعل ملاحظة خط التشابه المستمر ممكنة وتظهر التفاعلات الإيجابية الضعيفة بواسطة الإنحناء الخفيف لطرف خط الترسيب قرب الحفرة المشكوك فيها.

يحضر وسط شبه صلب شائع الاستعمال للانتشار المناعي مع ٠,٧٪ - ١٪ آجار نقي أو منقى جزئياً و٨٪ كلوريد الصوديوم. هذه النقاوة تمثل اعتبار مهم لأنها يمكن أن تؤثر على الانتشار الحر للمتفاعلات. بعض أنواع الآجار المستخدم للزرع البكتيري له مجاميع كيميائية مشحونة بقوة تستطيع الالتحام مع أنتيجينات معينة، التي تتداخل مع تكوين شريط ترسيب ظاهر. الآجاروز في تركيز ٠,٩٪ أيضاً يكون مناسباً كوسط انتشار.

العامل المهم الأخير هو تركيز المتفاعل. يتحدد موضع خط الترسيب بين الأنتيجين والجسم المضاد بالتركيزات النسبية ومعدلات الانتشار للمتفاعلات. للأغراض العملية، لا يمكن تناول معدلات الانتشار على الرغم أن تركيز المتفاعل يجب أن يضبط أحياناً قبل أن تصبح خطوط الترسيب ظاهرة. السبب في هذا أنه في حالة زيادة أحد المتفاعلات عن الآخر، قد يحدث تفاعل الترسيب داخل الحفرة التي بها تركيز أقل والتي تعطي نتائج سلبية ظاهرة. بالإضافة لاكتشاف الأجسام المضادة في المصل، يمكن أن يستخدم اختبار الانتشار المناعي لاكتشاف الأجسام المضادة في المح. يخفف المح مع أجزاء متساوية من محلول الملح الفسيولوجي أو يرج أو يخلط على خلاط هزاز لمدة ٣٠ - ٤٠ ثانية، ويعاد طرده مركزياً عند ١٠٠٠ إكس جي لمدة ٣٠ دقيقة. يستخدم الرائق الشفاف الأصفر في الاختبار.

يمكن قراءة نتائج اختبار الانتشار المناعي بعد عدة ساعات أو أيام عديدة، اعتماداً على تركيزات الأنتيجين والجسم المضاد. أفضل ما تشاهد خطوط الترسيب يكون على خلفية داكنة مع إضاءة الهلام بميل من القاع. مصادر الإضاءة عادة تصنع يدوياً (15) لكنها أيضاً متوفرة تجارياً. نموذج ٦٢٣ المجهر المضيء (American Optical, Leica, Inc. Deerfield, Ill.) يفي جداً بهذا الغرض.

تسجل النتيجة إيجابية نوعية عندما يكون الخط المرسب بين حفرتي الضابط الإيجابي المعلوم متصلاً مع الخط بين الأنتيجين وحفرة الاختبار. من الضروري أن كل حفرة اختبار توضع مجاورة لحفرة الضابط الموجب. تلاحظ تفاعلات خفيفة عندما ينحني خط الترسيب عند نهاية حفرة الاختبار ويلاحظ التشابه الجزئي. يكون تداخل الخطوط المتقاطعة كمصل اختبار غير متشابه مع الأجسام المضادة في حفرة الضابط الموجب. توفر طريقة الانتشار المناعي عدة مميزات، لكنها تفتقر إلى مستوى الحساسية المتوافر باختبارات أخرى متعددة وإذا لم يستخدم اختبار الانتشار المناعي القطري، تفتقر الطريقة إلى القدرة على تحديد مستويات الجسم المضاد.

اختبار تعادل الفيروس Virus-Neutralization Test (VN)

هي اختبارات مصلية تستخدم تعادل الفيروس للقياس الكمي للجسم المضاد وتستخدم غالباً في معامل التشخيص والبحوث. تستخدم مع مضادات الأمصال المعلومة وتكون مفيدة جداً في تعريف الفيروسات المجهولة والتفريق بين الفيروسات. الاختبار له جزئين، في جزء التعادل، تخلط الفيروسات (عند التخفيف الصحيح) مع

المصل (أيضاً عند التخفيف الصحيح) في أنبوبة اختبار. يخلط الفيروس مع المصل ويحضنان معاً على درجة حرارة قياسية حسب الزمن المحدد. في الجزء الثاني، يقيم الفيروس المتبقي غير المتعادل في نظام استدلال مناسب (انظر الفصل الخامس والأربعون على معايرة المعلقات البيولوجية). تكون الطريقة العامة للاختبار كالتالي (التحويرات تعطى عند الضرورة لأنظمة العائل المختلفة).

الأمصال Sera

يجب أن تكون معقمة (قد ترشح بالمرشح الغشائي) وخالية من أي حوافظ كيميائية (فينول، وفورمالين، وهكذا)، وتسخن عند ٥٦°م لمدة ٣٠ دقيقة لتكسير المواد غير النوعية المثبطة للفيروس التي تتأثر بالحرارة. لكي تستخدم مضادات الأمصال كقياسية أو لتعريف الفيروسات المجهولة يجب أن تنتج في دجاج خالٍ من الممرضات النوعية من مزرعة فيروس منتقاة بطريقة البقع. يجب أن تحفظ أمصال طبيعية من طيور خالية من الممرضات النوعية لتكون متوفرة كمصل ضابط أثناء طرق الاختبار.

الفيروس Virus

يجب أن تكون عترات الفيروس المستخدمة لاختبارات التعادل عالية التركيز، ولا تحتوي على تجمعات الفيروس وتكون متأقلمة لنظام العائل المستخدم. يجب أن تكون عترات الفيروس في مزارع نقية ويفضل أن تنقى بالاستنساخ وخالية من البكتيريا والفطريات أو الميكوبلازما. يفضل حفظ كميات الفيروسات في عبوات بغطاء قلاووظ أو عبوات بلاستيكية تجميدية تخزن عند –٦٠°م أو أقل.

المخففات Diluents

المخفف المستخدم يمكن أن يكون وسط مزرعة الخلية أو مخففات أخرى معروفة متوافقة مع كلٍ من الفيروس ونظام العائل المستخدم.

طريقة تعادل بيتا (β) (فيروس ثابت–مصل مخفف)
β-Neutralization Procedure (Constant-Virus Diluted-Serum)

في هذه الطريقة، تختبر التخفيفات المتسلسلة للمصل ضد جرعة قياسية من الفيروس، ولهذه التقنية مميزات محددة في أنها تستخدم كميات صغيرة من المصل، ويفضل الاختبار للفيروسات قليلة التركيز، وأكثر فائدة لإظهار الفروق المعنوية في الأجسام المضادة المعادلة بين عينات المصل من الحالات الحادة والناقهة المأخوذة من قطعان مشتبه فيها.

الاستجابة الكمية في مزرعة خلية تنمو في أطباق فردية ٣٠ مل أو أطباق تحتوي حتى ٩٦ حفرة مزرعة تختار كنظام استدلالي في المثال التالي. يمكن أن يستخدم نظام مزرعة الخلية ٩٦ حفرة بنفس نظام التوزيع المستخدم في اختبارات منع تلازن الدم. على الرغم أن الأساسيات هي ذاتها لكل الأنظمة، إلا أن أحجام الكاشف تختلف بين الأنظمة والطرق.

١) في جزء التعادل من الاختبار تجرى تخفيفات مصل متسلسلة ثنائية أو رباعية في وسط مزرعة الخلية في أطباق اختبار دقيقة أو في سلسلة من الأنابيب.

٢) يخفف الفيروس في نفس الوسط ليحتوي على جرعة معدية متوسطة ($TCID_{50}$) في ٠,١ مل (١٠٠ $TCID_{50}$ هو المستخدم غالباً). يحدد تخفيف الفيروس من المعايرة السابقة للفيروس بنفس الطريقة (الاستجابة الكمية في مزرعة الخلية) وتجهز كمية مناسبة وتترك في حمام ثلج بكمية كافية لكل تخفيف من المصل وللضوابط ولبعض المزيد. إنه من المعتاد المعايرة الراجعة أو العكسية للفيروس مع كل اختبار تعادل للتأكد أن ١٠٠ جرعة متوسطة قد استخدمت (انظر الفصل الخامس والأربعون).

٣) في سلسلة من الأنابيب أو في طبق اختبار دقيق، اخلط جيداً أحجاماً متساوية من كل من تخفيفات المصل مع تخفيف الفيروس المحتوي على ١٠٠ $TCID_{50}$ في ٠,١ مل. للفيروس الضابط، يخلط تخفيف الفيروس مع مصل طبيعي معلوم أو محلول ملح فسيولوجي. يجب أن يكون هناك خليط كافٍ لحقن تكرار مزارع الخلية ولبعض المتبقي الزائد، على سبيل المثال لخمس مزارع وحيدة الطبقة يستقبل كل منها ٠,٢ مل، حضر ١,٥ مل أو ٢ مل من الخليط. يمكن أن يتم المسح الأولي للأجسام المضادة بعمل تخفيفات مفردة للأمصال في أنابيب منفصلة وتنقل الأمصال المخففة إلى الطبق. عندما تعمل التخفيفات لتحديد مستويات الجسم المضاد، يمكن أن تعمل أيضاً في طبق معايرة دقيق، وكن حريصاً حتى لا تخدش الحفر. يضاف الفيروس عندئذ ويحضن ويضاف عند ذلك معلق مزرعة الخلية.

٤) حضن مجموعة الأنابيب وأنبوبة ضابط الفيروس لمدة ساعة عند ٢٥ °م، إذا لم يحدد وقت آخر أو درجة حرارة معينة.

٥) لقياس الفيروس المتبقي، احقن ٠,٢ مل من كل خليط المصل والفيروس إلى كل خمسة مزارع وحيدة الطبقة تحتوي على وسط حديث وحضنها عند ٣٧ °م. استخدم ماصات منفصلة لكل تخفيف أو احقن أولاً تخفيف المصل الأقل. في طريقة بيتا، هذا يكون ضرورياً لأن الفيروس النشط يكون في التركيز الأعلى عند أعلى تخفيف للمصل وقد يحمل بعد ذلك إلى التخفيف التالي الأقل للمصل في الماصة.

٦) افحص المزارع عند الزمن المناسب للفيروس المختبر وسجل التأثير المرضي الخلوي في المزرعة كموجب أو سالب. عندما يبنى النظام الكاشف على الاستجابة العددية في مزرعة الخلية أو الاستجابة الكمية في أجنة

الدجاج، فإن اختبارات التعادل (خطوات ١ — ٤) تكون متشابهة. يختلف قياس الفيروس المتبقي مع النظام والاستجابة لكنها سوف تكون مشابهة لتلك المستخدمة لتحديد مستوى الفيروس (انظر الفصل الخامس والأربعون عن معايرة المعلقات البيولوجية).

حساب المعيار المتعادل لطريقة بيتا

Calculating of Neutralizing Titer for β Method

عندما يقاس الفيروس المتبقي بالاستجابة الكمية، يحسب ٥٠٪ من نقطة نهاية التعادل بطريقة ريد ومونش (25) (الجدول رقم ٤٦,١) أو سبيرمان-كاربر (12) كما وُضح في الفصل الخامس والأربعون. يحسب المستوى المتعادل أو متوسط جرعة الحماية (PD_{50}) من نقطة النهاية هذه.

للاستجابة العددية، نقطة النهاية هي تخفيف المصل الذي يعادل ٥٠٪ (٨٠٪ أو ٩٠٪ في بعض الأنظمة) للفيروس. يمكن أن تقحم نقطة النهاية بنفس الطريقة التي تكافئ المسافة الناتجة. يمكن أيضاً أن يتم الإقحام كتابياً أو بطرق إحصائية أخرى.

الجدول رقم (٤٦,١). البيانات لحساب نقطة ‌ اية التعادل ٥٠٪ لاختبار تعادل الفيروس بطريقة ريد، مونش (25).

تخفيف المصل		نسبة	الاستجابة		القيم التراكمية (↑ / ↓)		نسبة المصاب/	نسبة
الرقمي	لوغاريتم	الإصابة[A]	المصابة	غير المصابة	المصابة ↑	غير المصابة ↓	الكلي	المصاب
١ : ٤	$١٠^{-٠,٦}$	٥/٥	٥	صفر	١١	صفر	١١/١١	١٠٠
١ : ١٦	$١٠^{-١,٢}$	٥/٤	٤	١	٦	١	٧/٦	٨٦
١ : ٦٤	$١٠^{-١,٨}$	٥/٢	٢	٣	٢	٤	٦/٢	٣٣
١ : ٢٥٦	$١٠^{-٢,٤}$	صفر/٥	صفر	٥	صفر	٩	صفر/٩	صفر

[A] العدد المصاب/العدد المحقون (رقم تجريبي).

طريقة تعادل ألفا α (مصل ثابت-فيروس مخفف)

α-Neutralization Procedure (Constant-Serum Diluted-Virus)

في هذه الطريقة، تخلط تخفيفات متسلسلة للفيروس مع التخفيف القياسي للمصل (نمطياً، يستخدم المصل غير المخفف). يحضن خليط المصل والفيروس ويقاس الفيروس المتبقي كما سبق في أي عائل، عادة بواسطة الاستجابة الكمية.

تختار الاستجابة الكمية في أجنة الدجاج كنظام استكشافي في المثال التالي.

١) لجزء التعادل، جهز تخفيفات عشرية للفيروس ورتبها في حامل كما هو موضح في الجدول رقم (٤٦،٢) صف ١.

٢) حضر صفوف أنابيب اختبار معقمة صغيرة للأمصال الضابطة السالبة (صف ٢) والإيجابية (صف ٣) وصف لكل مصل مجهول (صفوف ٤ و ٥).

٣) أضف ٠،٤ مل إلى كل الأنابيب في صف ٢ وأضف ٠،٤ مل من مصل معقم معروف أنه خالٍ من الأجسام المضادة ضد العامل المراد دراسته. في غياب مثل هذا المصل، يمكن استخدام مخفف معقم. هذا الصف سوف يخدم كمصل سالب أو فيروس ضابط. أضف إلى كل الأنابيب في صف ٣ كمية ٠،٤ مل من مصل معقم معروف احتوائه على أجسام مضادة للعامل المراد دراسته. سوف يخدم هذا الصف كضابط إيجابي. أضف لكل الأنابيب في الصفوف الأخرى ٠،٤ مللي من المصل المراد اختباره.

٤) انقل ٠،٤ مل من تخفيف الفيروس من صف ١ أنبوبة ٨ إلى الأنبوبة الثامنة في صفوف ٢ و ٣ و ٤ و ٥ واستبعد أي فيروس باقي في الماصة. بنفس الماصة انقل ٠،٤ مل من تخفيف الفيروس من الصف ١ وأنبوبة ٧ إلى الأنبوبة السابعة في الصفوف الأخرى. استمر حتى تحتوي كل الأنابيب على الفيروس. عند معرفة مستوى الفيروس، ثلاثة إلى خمس تخفيفات في المجموعة الضابطة عادة تفي بالغرض لتحديد نقطة النهاية في الاختبارات التالية. غالباً، يجب أن يختبر المصل المجهول مع مدى واسع من تخفيفات الفيروس لتأكيد اكتشاف نقطة النهاية.

٥) اخلط الفيروس والمصل جيداً بهز كل أنبوبة فردياً أو بهز حامل الأنابيب بشدة. اترك الخليط عند ٢٥°م لمدة ساعة إذا لم يحدد وقت آخر.

٦) لمعايرة الفيروس المتبقي، ابدأ حقن أدنى تخفيف للفيروس في مجموعة المصل المجهول واحقن كل ٥ بيضات أجنة على الأقل بكمية ٠،١ مل بالطريقة الأمثل. استكمل إلى التخفيف التالي مستخدماً نفس الإبرة والمحقن. كرر هذا حتى يتم حقن كل خليط الفيروس والمصل. في حالة اختبار أكثر من مصل، استعمل إبراً ومحاقن منفصلة لكل مصل، واحقن كل هذه المخاليط كالسابق. يجب أن يحقن خليط الفيروس الضابط مؤخراً باستعمال إبرة ومحقن منفصلين. للعمل الحرج جداً استعمل محقن وإبرة منفصلين لكل مخلوط مصل وفيروس.

٧) اقفل البيض بالوسيلة المناسبة وأعده إلى الحضان للوقت المحدد للفيروس المستخدم. افحص البيض بعد ١٨ — ٢٤ ساعة واستبعد كل البيض المحتوي على أجنة نافقة. افحص البيض يومياً والأجنة النافقة لوجود الآفات عند اللزوم. عند نهاية زمن التجربة، يمكن أن يفحص البيض الحي المتبقي للآفات عند اللزوم وسجل النتائج.

الجدول رقم (٤٦,٢). طريقة الاختبار باستخدام مصل ثابت–فيروس مخفف (ألفا).

رقم الصنف	المحتويات	رقم الأنبوبة							
		١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨
١	تخفيف للفيروس	$١٠^{-١}$	$١٠^{-٢}$	$١٠^{-٣}$	$١٠^{-٤}$	$١٠^{-٥}$	$١٠^{-٦}$	$١٠^{-٧}$	$١٠^{-٨}$
	الكمية (مل)	٢,٠	٢,٠	٢,٠	٢,٠	٢,٠	٢,٠	٢,٠	٢,٠
٢	مصل سالب (مل)	٠,٤[A]	٠,٤[A]	٠,٤[A]	٠,٤[A]	٠,٤	٠,٤	٠,٤	٠,٤
٣	مصل موجب (مل)	٠,٤	٠,٤	٠,٤	٠,٤	٠,٤[B]	٠,٤[B]	٠,٤[B]	٠,٤[B]
٤	مصل مجهول (مل)[C]	٠,٤	٠,٤	٠,٤	٠,٤	٠,٤	٠,٤	٠,٤	٠,٤
٥	مصل مجهول[C]								

[A] افتراض الفيروس له نقطة نهاية $١٠^{-٦}$ أو $١٠^{-٧}$، هذه يمكن أن تحذف للمحافظة على المصل والجنين.

[B] افتراض المصل يعادل ٤ لوغاريتم من الفيروس والفيروس له نقطة نهاية $١٠^{-٦}$ أو $١٠^{-٧}$ هذه يمكن أن تحذف لحفظ المصل والأجنة.

[C] مثال للمصل المجهول قد يكون حاداً أو مصل نقاهة.

يمكن حساب PD_{50} من المثال المعطى في الجدول رقم (٤٦,١) بالمعادلة التالية :

المسافة المتناسبة = (النسبة المصابة عند التخفيف التالي أكثر من ٥٠٪ − ٥٠٪) ÷ (النسبة المصابة عند التخفيف التالي أكثر من ٥٠٪ − النسبة المصابة عند التخفيف التالي أقل من ٥٠٪)

$$= \frac{٨٦ - ٥٠}{٨٦ - ٣٣} = \frac{٣٦}{٥٣} = ٠,٦٧$$

احسب لوغاريتم$_{١٠}$ لنقطة نهاية التعادل لـ ٥٠٪ أو المسافة المكافئة ٥٠٪ : مقلوب ٥٠٪ نقطة نهاية التعادل = المسافة المكافئة x لوغاريتم معامل التخفيف للمصل + لوغاريتم التخفيف الأقل المستخدم لحساب المسافة المكافئة

= (٠,٦٧ x ٠,٦) = (١,٢)

= ٠,٤ + ١,٢ = ١,٦

= ٤٠ (مضاد لوغاريتم $١٠^{١,٦}$)

٥٠٪ نقطة نهاية التعادل ٥٠٪ أو المسافة المكافئة ٥٠٪ = ١ : ٤٠

Obeikandl.com

حساب معامل التعادل لطريقة ألفا

Calculating of Neutralizing Titer for α Method

عند قياس الفيروس المتبقي بالاستجابة الكمية، يمكن حساب نقطة النهاية لكل مصل بطريقة ريد ومونش أو سبيرمان–كاربر. توضح نتائج الاختبار الفرضي في الجدول رقم (٤٦،٣). معمل التعادل (NI) للمصل هو الفرق بين لوغاريتم المعيار للفيروس الضابط (مصل سالب) ولوغاريتم١٠ لمخلوط المصل والفيروس. ليس له وحدات. لذلك في المثال الموضح في الجدول رقم (٤٦،٣):

معيار الفيروس الضابط (أو المصل السالب – خليط الفيروس) = ٦،٥ ،

معيار المصل الموجب – خليط الفيروس = ٢،٥ والفرق (معامل التعادل) = ٤،٠.

الجدول رقم (٤٦،٣). مثال نتائج تعادل للفيروس[A].

المصل	تخفيف للفيروس (لو١٠)[B]								لو١٠ ID50[C]	معامل التعادل (NI)
	١–	٢–	٣–	٤–	٥–	٦–	٧–	٨–		
مصل سالب (فيروس ضابط)					٥/٥[٢]	٥/٤	٥/١	٥/٠	٦،٥[C]	
مصل موجب	٥/٥	٥/٥	٥/٠						٢،٥	٤،٠
مصل مجهول			٥/٥	٥/٣	٥/٠	٥/٠			٤،٢	٢،٣
مصل مجهول			٥/٢	٥/٠	٥/٠	٥/٠			٢،٨>	٣،٧<
مصل مجهول			٥/٥	٥/٥	٥/٥	٥/٤			٦،٠<	٠،٥>

A اختصارات: ID50 = متوسط الجرعة المعدية، NI = معامل التعادل.

B القيم في الجدول هي العدد الميت/العدد المحقون.

C المستوى محسوب بطريقة ريد ومونش.

يعبر عن معامل التعادل حسابياً أحياناً (مثل في المثال السابق ١٠٠٠٠)، في هذا المثال يمثل معامل التعادل نسبة معيار نقطة النهاية الحسابية للفيروس الضابط والمصل الإيجابي–فيروس ضابط. من المهم جداً التفريق بين اللوغاريتم والأشكال الحسابية خاصة عندما يكون معامل التعادل منخفضاً.

من الشائع في المعامل استقبال عينات أمصال مجمعة لتقييم مضادات الأجسام التي تتكون من أجزاء متساوية من الأمصال من العديد من الدجاج. هذه العينات المجمعة تعطي نتائج غير حقيقية عن حالة المضاد الحيوي. في المثال السابق حيث كان معامل التعادل ٤ بافتراض أن العينة المجمعة من ١٠ دجاجات، من الممكن أن ٩ من ١٠ دجاجات ليس لها معيار مضاد حيوي، بينما ١ من ١٠ له معامل تعادل ٥. نتيجة التجمع ممكن أن تؤدي إلى معامل تعادل ٤ تقريباً. المعلومات المحدودة من العينات المجمعة يجب أن تُقيم مع الاختبار المعملي لكل مصل على حدة.

opeikandi.com

التلازن Agglutination

تجمع أو تلازن البكتيريا بالأجسام المضادة النوعية في الدم الكامل وفي المصل هو أحد أول الطرق المصلية التي استخدمت كثيراً في السيطرة على أمراض الدواجن.

تعتمد اختبارات التلازن على الأمراض مثل الزكام المعدي والإصابة بالسالمونيلا (شاملة بللورم وتيفويد الدواجن) والإصابة بالميكوبلازما. قد يجرى الاختبار على شريحة زجاجية أو أطباق بورسللين (اختبار المصل على الشريحة) وفي أنابيب اختبار (اختبار الأنبوبة) أو في حفر أطباق الاختبار الدقيق. ارجع إلى الفصل الخاص بالأمراض البكتيرية في هذا الكتاب لتفاصيل الطرق والأنتيجين المستخدم للاختبارات النوعية لمرض معين.

اختبار الشريحة يستخدم كثيراً كاختبار مسح أولي. إذا لزن المصل الأنتيجين الملون في اختبار الطبق، يخفف المصل تسلسلياً بعد ذلك ويختبر عند تركيزات متناقصة لقدرته على تلازن الأنتيجين في الأنابيب أو في الحفر الخاصة بأطباق الاختبار الدقيق. يعرف مستوى التلازن كمقلوب أعلى تخفيف للمصل الذي يحدث عنده تلازن كامل. للعدد الصغير من عينات المصل، أحياناً تخفف العينات وتختبر فقط بطريقة الشريحة. إن تطبيق طريقة الاختبار الدقيق لاختبار التلازن للسالمونيلا (35) وللميكوبلازما قللت بشدة التكاليف والوقت المرتبط مع اختبار التلازن.

الإليزا Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

أصبحت الإليزا الاختبار المصلي الأساسي المستخدم بواسطة معظم المعامل للاختبار المصلي. يعتمد على طريقة تحديد معيار الجسم المضاد لعينة منفردة Snyder and Marquardt (26 ,27 ,28). تسمح هذه الطريقة بتطوير أشكال القطيع إما من خلال إدماء مفرد أو اعتماداً على جمع العينات طوال الوقت. تطبيق الكمبيوتر الدقيق للتحكم في قارئ الطبق وإعداد البيانات يبسط معاملة المعلومات. تتوفر تجارياً الأطقم الجاهزة للاستعمال لمعظم ممرضات الطيور البكتيرية والفيروسية. تشمل هذه الفيروسات (لكنها غير محددة) نيوكاسيل والالتهاب الشعبي وجمبورو وريو وميكوبلازما جاليسيبتكم وميكوبلازما سينوفي وباستيريللا ملتوسيدا وفيروس التهاب المخ الطيري وأنتيجين والجسم المضاد الفيروسي لمرض ليكوسيس الليمفاوي وفيروس إنفلونزا الطيور وفيروس أنيميا الدجاج وفيروس الالتهاب المعوي النزفي وميكروب بوردتيللا الطيور وسالمونيلا إنترتيدس.

حساب المعيار Titer Calculation

يمكن أن يقوم ببساطة على قيمة الامتصاص المصححة حيث يطرح متوسط الضابط السالب من امتصاص عينة الاختبار. الطريقة الثانية هي أخذ الحسابات كخطوة إضافية في حساب نسبة العينة – الموجب (S/P). امتصاص

العينة ومتوسط امتصاص الضابط الموجب يصحح كلاً منهما للخلفية بطرح متوسط امتصاص الضابط السالب من كلٍّ منهما، ومن ثم:

S/P = (امتصاص العينة − متوسط امتصاص المصل الضابط السالب) / (متوسط امتصاص المصل الضابط الإيجابي − متوسط امتصاص المصل الضابط السالب)

$$S/P = \frac{\text{Sample absorbance} - \text{NC}\ \bar{x}}{\text{PC}\ \bar{x} - \text{NC}\ \bar{x}}$$

حيث

$\text{NC}\ \bar{x}$ = متوسط امتصاص المصل الضابط السالب

$\text{PC}\ \bar{x}$ = متوسط امتصاص المصل الضابط الموجب

أنظمة إليزا التجارية للفحص المصلي للدواجن نمطياً تأخذ حسابات المستوى إلى خطوة تالية باستعمال طريقة الانحدار المزدوج. الخطوة الثانية والنهائية في هذه الطريقة تكون بتطبيق معادلة الانحدار الخطية لحساب مستوى الإليزا باستخدام طريقة العينة المفردة علاوة على حساب المستوى معتمداً على التخفيف المتسلسل. تعرف معادلة الانحدار الخطي العلاقة بين لو.$_{١}$ لنسبة S/P لتخفيف المصل المفرد ولو.$_{١}$ لمستويات الجسم المضاد الملحوظة. يؤخذ هذا نمطياً:

مستوى لو.$_{١}$ = الانحدار x [لو.$_{١}$ (S/P)] + *y* intercept

المستوى = عكس لوغاريتم (الانحدار x [لو.$_{١}$ (S/P)] + *y* intercept).

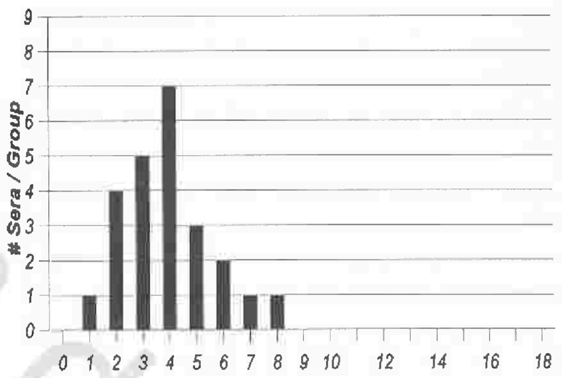
نسبة تكون S/P مركزية لهذا الحساب. القيم الفعلية المستخدمة للانحدار و *y* intercept هي قيمة متفردة للنظام المتخصص.

بمجرد حساب المستويات لعينات المصل المنفرد، توضع المستويات في مجموعتها تبعاً للمستويات المعينة، التي هي مستوى مجموعة صفر يمكن أن تكون كل المستويات بين صفر و١٥٠٠، وسوف يكون مستوى مجموعة ١ كل المستويات أو القيم بين ١٥٠١ و ٢٠٠٠ وهكذا. ينتج الرسم البياني اعتماداً على عدد الأمصال في كل مجموعة. يستعمل الرسم البياني لمشاهدة توزيع المستويات داخل مجموعة الأمصال المختبرة.

حجم العينة Sample Size

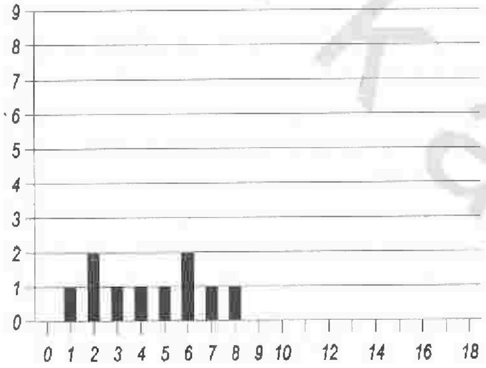
يزداد حجم العينة المطلوب لتمثيل الحالة المصلية لقطيع مع حجم القطيع ، إلا أن نقطة الفائدة المتضائلة لهذه الطريقة توجد عند اختبار قطعان التسمين. يجب أن يكون الحد الأدنى ٢٠ عينة لكل قطيع مختبر. يقترح ٣٠ عينة مصل لكل قطيع من قطعان الأمهات والبياض. حجم العينات أقل من ١٠ يكون غير مناسب لأن الرسم البياني سوف يفتقر لنقاط البيانات الضرورية للتمثيل والتقييم الحدي. يوضح هذا في الشكل رقم (٤٦،١). يمثل الشكل (١) مجموعة مختارة من ١٠ أمصال من مجموعة من ٣٠ مصل في الشكل (٢). صفات الشكل (١) تكون مختلفة جداً من تلك في الشكل (٢) حتى بالرغم من أن الأمصال من نفس القطيع.

صورة الإليزا لعدد ٢-٣٠



شكل (١) معيار مجموعة

صورة الإليزا لعدد ١-١٠



شكل (٢) معيار مجموعة

الشكل رقم (٤٦،١).

مصادر القلق Troubleshooting

عملية المص Pipetting

الإليزا اختبار حساس جداً وقابل لأخطاء المص. يكون أكبر الأخطاء الشائعة في المص نتيجة للامتلاء غير الصحيح بسبب عدم تثبيت أطراف الماصة. هذا يكون حقيقياً عند استخدام الماصات عديدة القنوات. إن ممارسة تحميل هذه الأطراف مباشرة من حامل الأطراف بدون التأكد من تثبيتها يمكن أن يسبب أخطاء مص حجمية ظاهرة. إضافة إلى ذلك يجب أن تضبط الماصات بصفة دورية للسحب الأمثل.

غسيل الطبق Plate Washing

غسيل الطبق غير الجيد يمكن أن يسبب اختلافاً يمكن أن يكون صعب الحكم عليه. تلوث الجزء الأعلى للأطباق التي قد لا تغسل بكفاءة يمكن أيضاً أن يؤدي إلى تفاوت في الاختبار. الانتباه بحرص للإضافة الأمثل وشفط أو سحب خامات الغسيل يكون أساسياً لثبات النتائج. افحص الماصات وجهاز غسل الأطباق الأوتوماتيكي بصفة

متكررة للحجم الأمثل ومعدل السحب والسحب الجيد للكواشف ومحاليل الغسيل. قلب الأطباق على نسيج ماص بعد كل خطوة غسيل يجرى بواسطة العديد من المعامل كوسائل إزالة أي محلول غسيل زائد. يوصى بعمل ٤ — ٥ مرات غسيل بعد كل سحب لكل كاشف. يوصى بعض المنتجين بخطوات نقع كجزء من طريقة الغسيل. يساعد هذا على إزالة الكواشف التي قد لا تغسل جيداً من النظام باستخدام مرات غسيل متتالية سريعة. يجب دائماً اتباع تعليمات وتوصيات المصنعين.

الفقاقيع وتلوث سطح الطبق **Bubbles and Plate Surface Contamination**

يمكن أن تسبب العملية أحياناً فقاقيع صغيرة يمكن أن تهمل بسهولة. كن متأكداً لفحص الحفر لوجود الفقاقيع وإزالتها قبل قراءة الأطباق. جفف قاع الطبق مع نسيج نظيف قبل القراءة. أي رطوبة أو تلوث لقاع الحفر سوف يؤثر على قيم الامتصاص.

الأطقم التجارية ومراقبة الجودة **Commercial Kit Reagent and Quality Control**

يجب أن تحفظ عند ٤ °م أو حسب توصية المصنع. اترك دائماً الكواشف لتدفأ في درجة حرارة الغرفة قبل الاستخدام. لغرض مراقبة الجودة حافظ على سجلات أرقام حصة الطقم وقيم الضابط السالب والموجب. لكل نوع اختبار. بالإضافة يجب تطوير ضوابط موجبة في المعمل وتستعمل لتعطي قياساً آخر لضبط الجودة. إنه من الجيد أيضاً لمراقبة الجودة إرسال مجموعة من أمصال سابقة المعايرة خلال المعمل لرصد أدائها العام. وهذا يمكن أن يساعد خاصة عند تدريب فنيين جدد.

الارتباط باختبارات منع تلازن الدم وتعادل الفيروس
Correlation with HI and VN Tests

يمكن أن يؤدي الارتباط المصلي للإليزا باختبارات منع التلازن للدم وتعادل الفيروس مع عينات كافية مقارنةً بالمتوسط الهندسي لمعيار إليزا مع مثيلاتها في اختباري منع التلازن والتعادل. هذا يكون فقيراً جداً في حالة بناء الارتباط على مقارنة عينة مفردة.

تعليمات عامة **General Comments**

يجب أن يكون الحكم على مستويات الإليزا فقط على أسس القطيع مع أحجام العينة على الأقل من ٢٠ مصل لكل قطيع لاحم. يفضل ٣٠ عينة من القطيع في حالة قطعان الأمهات والبياض (30). يجب أن تستعمل اختبارات الإليزا للميكوبلازما للمسح ويجب أن تؤكد النتائج أو تنفى بواسطة اختبار منع التلازن المصلي أو المزرعة أو اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل.

References المراجع

1. Alexander, D. J., W. H. Allan, P. M. Biggs, C. D. Bracewell, J. H. Darbyshire, P. S. Dawson, A. H. Harris, F. T. W. Jordan, I. MacPherson, J. B. McFerran, C. J. Randall, J. C. Stuart, O. Swarbrick, and G. P. Wilding. A standard technique for hemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. Vet. Rec. 113:64. 1983.
2. Allan, W. H., and R. E. Gough. A standard hemagglutination inhibition test for Newcastle disease. 1. A comparison of macro and micro methods. Vet. Rec. 95:120-123. 1974.
3. Alien, W. H., J. E. Lancaster, and B. Toth. Newcastle disease vaccines. Their production and use, FAO Animal Production and Health Series, No. 10. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 1978.
4. Anonymous. Methods for examining poultry biologies and for identifying and quantifying avian pathogens. National Academy of Sciences, Washington, D.C. pp. 83-87. 1971.
5. Beard, C. W. Demonstration of type-specific influenza antibody in mammalian and avian sera by immuno-diffusion. Bull. W.H.O. 42:779-785. 1970.
6. Beard, C. W., S. R. Hopkins, and J. Hammond. Preparation of Newcastle disease virus hemagglutination-inhibition test antigen. Avian Dis. 19:692-699. 1975.
7. Beard, C. W., and W. J. Wilkes. A simple and rapid Micro-test procedure for determining Newcastle hemagglutination-inhibition (HI) antibody liters. In: Proceedings of the 77th Annual Meeting U.S. Animal Health Association, St. Louis, Mo. pp. 596-600. 1973.
8. Beard, C. W., and W. J. Wilkes. A comparison of Newcastle disease hemagglutination-inhibition test results from diagnostic laboratories in the southeastern United States. Avian Dis. 29:1048-1056. 1985.
9. Brugh, M. A., Jr. A simple method for recording and analyzing serological data. Avian Dis. 22:362-365. 1978.
10. Brugh, M. A., Jr., and C. W. Beard. Collection and processing of blood samples dried on paper for microassay of Newcastle disease virus and avian influenza virus antibodies. Am. J. Vet. Res. 41:1495-1498. 1980.
11. Brugh, M. A., Jr., C. W. Beard, and W. J. Wilkes. The influence of test conditions on Newcastle disease hemagglutination-inhibition titers. Avian Dis. 22:320-328. 1978.
12. Cottral, G. E., ed. Serology. In: Manual of standardized methods for veterinary microbiology. Comell University Press, Ithaca, N.Y. pp. 60-93. 1978.
13. Crowie, A. J. Immunodiffusion. Academic Press, New York. 1973.
14. Gelb, J., Jr., and C. G. Cianci. Detergent-treated Newcastle disease virus as an agar gel precipitin test antigen. Poult. Sci. 66:845-853. 1987.
15. Glazier, R. M. A simple apparatus for dark ground illumination of precipitin lines. J. Biol. Photogr. Assoc. 34:51-52. 1966.
16. Hirai, K., S. Shimakura, and M. Hirose. Immunodiffusion reaction to avian infectious bursal virus. Avian Dis. 16:961-964. 1972.
17. Jordan, F. T. W., and R. Chubb. The agar gel diffusion technique in the diagnosis of infectious laryngotracheitis (ILT) and its differentiation from fowl pox. Res. Vet. Sci. 3:245-255. 1962.
18. Kabat, E. A., and M. M. Mayer. Experimental immunochemistry. Charles C. Thomas, Springfield, 111. 1964.
19. King, D. J. A comparison of infectious bronchitis virus hemagglutination-inhibition test procedures. Avian Dis. 32:335-341. 1988.
20. Lukert, P. D., and R. B. Davis. An antigen used in the agar-gel precipitin reaction to detect avian encephalomyelitis virus antibodies. Avian Dis. 15:935-938. 1971.
21. McFerran, J. B., B. Adair, and T. J. Connor. Adenoviral antigens (CELO, QBV, GAL). Am. J. Vet. Res. 36(2):527-529. 1975.
22. Nonomura, I., and H. W. Yoder, Jr. Identification of avian mycoplasma isolates by the agar-gel precipitin test. Avian Dis. 21:370-381. 1977.
23. Olson, N. O., and R. Weiss. Similarity between artniritis virus and Fahey-Crawley virus. Avian Dis. 16:535-540. 1972.
24. Ranck, F. M., Jr. An easy method for making cutters to use in the agar-gel diffusion technique. Avian Dis. 17:870-873. 1973.

25. Reed, L. J., and H. Muench. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27:493-497. 1938.
26. Snyder, D. B., W. W. Marquardt, and E. Russek. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. II. Comparison of computational methods for measuring antibody titer in a single serum dilution. Avian Dis. 27:474-484. 1983.
27. Snyder, D. B., W. W. Marquardt, E. T. Mallinson, and E. Russek. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. I. Measurement of antibody activity titer against Newcastle disease virus in a single serum dilution. Avian Dis. 27:161-170. 1983.
28. Snyder, D. B., W. W. Marquardt, E. T. Mallinson, P. K. Savage, and D. C. Alien. Rapid serological profiling using enzyme-linked immunosorbent assay. III. Simultaneous measurements of antibody titers to infectious bronchitis, infectious bursal disease, and Newcastle disease viruses in a single serum dilution. Avian Dis. 28:12-24. 1984.
29. Stone, H. A., and E. A. Holly. Reliability of the agar-gel precipitin test in Marek's disease studies. Avian Dis. 15:939-945. 1971.
30. Thayer, S. G., P. Villegas, and O. J. Fletcher. Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays and conventional methods for avian serology. Avian Dis. 31:120-124. 1987.
31. Whittemore, A. D., and J. E. Williams. Microsystem for collecting and shipping diagnostic sera. Appl. Microbiol. 24:671-672. 1972.
32. Williams, C. A., and M. W. Chase. Methods in immunology and immunochemistry. Academic Press, New York. 3:103-374. 1971.
33. Williams, J. E. Collection of avian blood samples in microtest plates. Avian Dis. 17:445-449. 1973.
34. Williams, J. E. Microtest methodology. In: Isolation and identification of avian pathogens, 2nd ed. S. B. Hitchner, C. H. Domermuth, H. G. Purchase, and J. E. Williams, eds. American Association of Avian Pathologists, College Station, Tex. pp. 136-140. 1980.
35. Williams, J. E., and A. D. Whittemore. Serological diagnosis of pullorum disease with the microagglutination system. Appl. Microbiol. 21:394-399. 1971.
36. Witter, R. L. The diagnosis of infectious bronchitis of chickens by the agar gel precipitin test. Avian Dis. 6:478-492. 1962.
37. Woemie, H. The use of the agar gel diffusion technique in the identification of certain avian virus diseases. Veterinarian 4:17-28. 1966.