

## 2.2 Können wir die Anzahl der Viren zählen?

Heute werden wir sehen einige der Verfahren verwendet, um die Anzahl der Viren in einem bestimmten Volumen bestimmen und somit ihre Konzentration zu etablieren. Dies nennt man "Quantifizierung". Virale Quantifizierung ist wesentlich in Forschung und Entwicklung, um Impfstoffe vorzubereiten, oder die Menge an Viren kennen, die wir der Gewebekultur hinzufügen. Sondern auch bei der Diagnose, um die Reaktion des Patienten auf die antivirale Therapie zu bewerten.

Verschiedene Methoden, um Viren zu quantifizieren sind beschrieben worden. Sie bewerten ihre Infektiosität, oder ihre Nukleinsäure oder ihre Proteine, oder sie auch direkt die Anzahl der Partikel. In diesem Video werden wir über einige von ihnen sprechen.

### Plaque-assays

Eines der am häufigsten verwendeten Methoden zur Quantifizierung der Viren ist die Plaque-Assay, vor allem mit Viren, die die infizierten Zellen lysiert. Es besteht aus Gewebekulturen in Brunnen oder in Platten, mit Verdünnungen des Probe-Virus zu infizieren. In einem ersten Schritt soll das Kulturmedium Erleichterung optimalen Kontakt zwischen den Viren und den Zellen zu entfernen. Nach einer kurzen Inkubationszeit werden die Kulturen mit halbfesten Agar abgedeckt. Dies soll verhindern, dass die Viren frei, damit sie nur angrenzend an die bereits infizierten Zellen infizieren werden. Nach ein paar Tagen werden wir transparente Kreisflächen entwickelt sehen, ein Zeichen, dass die Viren die Zellen lysiert haben. Dies sind die so genannten „Plaques“. Die Zahl der Plaketten hängt von der Anzahl der Virionen in das Inokulum ab, und es wird davon ausgegangen, dass jede Plakette aus einer viralen Partikel in der Probe gebildet wurde. Sie sind manuell gezählt, in der Regel mit dem bloßen Auge. Es ist einfacher, sie zu sehen, nach dem Entfernen der halbfesten Agar und der Zellen färben, z. B. mit Kristallviolett. Das Ergebnis wird als Plaque bildende Einheiten, oder PFU pro ml, angegeben. Um diesen Wert zu berechnen ist das beste, die virale Aussetzung in dreifacher Ausfertigung hinzufügen und den Durchschnitt der drei Werte zu machen. Schließlich müssen wir nur noch diesen Wert durch die Verdünnung verwendet und das Volumen hinzugefügt, um die Platte zu teilen, wie Sie im Beispiel des Bildes sehen können.

### Fokus-bildende Einheiten

Sie werden sich Fragen, wie dieser Test zu machen, wenn Viren keine Lyse direkt verursachen? Der Trick ist spezifischen Antikörpern gegen virale Proteine, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Diese Art von Tests mit markierten Reagenzien sehen wir in dem video 4.2. Es ist eine schnellere Methode als die Plaque-Assay, da die Ergebnisse zwischen 24 und 72 Stunden nach der Infektion gesehen werden können. Aber es ist teurer, da wir mehr Reagenzien benötigen.

### Bestimmung der TCID50

Der TCID50 beziffert die Menge an Viren die zerstören oder jede andere Art von zytopathischen Effekt in 50 % der Zellen infizierten Kulturen verursachen musste. Es ist genauer als die vorherigen Methoden betrachtet, da Konzentrationen, die 100 % Wirkung produziert, stark variieren können, und der Wert von 50 % ist die genaueste. Eine mathematische Formel wird angewendet, die wir im video 4.1 werden, die für viele andere Messungen benutzt wird, wie z. B. dient zur Ermittlung der Infektionsdosis 50 usw., diskutieren. Der TCID50 Wert unterscheidet sich vom Wert der Plaque-Assays, und statistisch gesehen eine TCID50 Einheit entspricht 0,69 PFU Einheiten.

### Protein-assays

Die virale Konzentration kann auch quantifiziert werden, bestimmen die Menge des Proteins, sowohl insgesamt als auch spezifische, eines Virus. Dies kann durch Abwehrvorgänge Techniken, der Western-Blot, Immunoassays oder ELISA erfolgen. Wir berichten über die meisten dieser Techniken in anderen Videos.

Einige Labors verwenden andere Techniken, wie die folgenden.

Viren durch Durchflusszytometrie zu quantifizieren (die wir im video 4.4 reden) zwei verschiedene Fluorochromes werden verwendet: eine virale Proteine und eine andere, die virale Nukleinsäure zu markieren. Quantitative PCR, die wir in dem video 3.3 sehen werden, misst die RNA, beides im Zusammenhang zu den Virionen und frei. Zu guter Letzt können wir auch die Menge an Viren quantifizieren verwenden mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskop, das wir im vorherigen Video gesehen haben.

Mit jedem dieser Systeme können wir etwa die Anzahl der Virionen pro Milliliter quantifizieren. Ein weiteres interessantes Konzept ist, dass des Innenministeriums, die Multiplizität der Infektion bedeutet. Dies ist die Anzahl der Virionen pro Zelle während der Infektion hinzugefügt werden. Also, wenn wir 1 Million Viren 1 Million Zellen hinzufügen, gehört das MOI.

Wie Sie sehen können, können verschiedene Strategien verfolgt werden, zur Quantifizierung der Viren. Hier haben wir ein paar wenigen, aber es gibt viele mehr gesprochen.

Ich danke Ihnen sehr für Ihre Aufmerksamkeit.