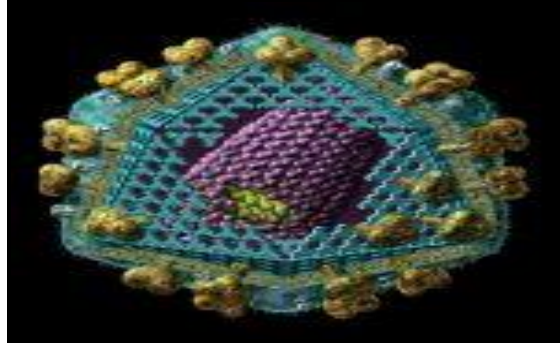


ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ

VETERİNER FAKÜLTESİ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

GENEL VİROLOJİ UYGULAMA NOTLARI



YAZARLAR

PROF.DR. ZAFER YAZICI

PROF.DR. SEMRA GÜMÜŞOVA

PROF.DR. HARUN ALBAYRAK

DR.ÖĞR. ÜYESİ CÜNEYT TAMER

SAMSUN

2021

İÇİNDEKİLER

1. VİRAL İNFEKSİYONLARDA ŞÜPHELİ MATERYAL (MARAZİ MADDE)

- 1.1. Şüpheli Materyalin Seçimi ve Materyal Toplanma Zamanı
- 1.2. Şüpheli Materyalin Toplanması, Nakledilmesi ve Viral Teşhis İçin Hazırlanması
 - 1.2.1. Organ materyallerinin işlenmesi
 - 1.2.2. Gaita materyalinin işlenmesi
 - 1.2.3. Kan materyalinin işlenmesi
 - 1.2.4. Beyin-Omurilik sıvısını (BOS) işlenmesi
 - 1.2.5. İdrarın işlenmesi
 - 1.2.6. Vezikül sıvısı ve lezyon alınması ve işlenmesi
 - 1.2.7. Göz, burun ve vagen akıntısı

2. VİRUS İZOLASYONU

- 2.1. Virusların üretilmelerinde kullanılan in vivo sistemler
 - 2.1.1. Deneme hayvanlarında virus izolasyonu
 - 2.1.2. Embriyolu tavuk yumurtasında virus izolasyonu
 - 2.1.3. Hücre kültürlerinde virus izolasyonu
 - 2.1.3.1. Hücre kültürlerinin tipleri
 - 2.1.3.2. Primer hücre kültürü hazırlanması ve subkültür yapılması
 - 2.1.3.3. Hücre kültürlerin saklanması
 - 2.1.3.4. Dondurulan hücrelerin çözülmesi ve başka bir yere nakledilmesi
 - 2.1.3.5. Hücre kültürlerine ekim metotları
 - 2.1.3.6. Doku kültürlerinde virus üremesinin saptanması
 - 2.1.3.7. İnfekte doku kültürlerinden viruslu materyalin elde edilmesi

3. VİRUSLARIN İNFEKSİYÖZİTE GÜCÜNÜN TESPİT EDİLMESİ

- 3.1. Titrasyon
 - 3.1.1. İn vivo titrasyon
 - 3.1.2. İn vitro titrasyon
- 3.2. Plak test

4. VİROLOJİDE KULLANILAN FİZİKSEL VE KİMYASAL İDENTİFİKASYON KRİTERLERİ

5. VİRAL İNFEKSİYONLARIN LABORATUVAR TANI YÖNTEMLERİ

- a. Direkt yöntemler
- b. İndirekt yöntemler

1. VİRAL İNFEKSİYONLARDA ŞÜPHELİ MATERYAL

1.1. Şüpheli Materyalin Seçimi ve Materyal Toplanma Zamanı

Viral infeksiyonların laboratuvar tanısının yapılabilmesi için öncelikle doğru materyalin seçilerek toplanması önemlidir. Materyal toplanmasında şüphe edilen viral infeksiyonun patogenezi mutlaka göz önüne alınmalıdır. Örneğin, birçok virus solunum sistemi infeksiyonu oluşturabilir. Bu vakalarda farinks ve burundan sürüntü örnekleri almak önemlidir. Yine sindirim sisteminde oluşan bir infeksiyonda uygun koşullarda gaita örneklerinin alınması teşhis için önem taşır. Ayrıca hastalık menejit, nedeni belirsiz kızarıklar, nedeni bilinmeyen yüksek ateş ya da konjenital infeksiyonlar gibi semptomlar gösteriyor ise, vücudun birçok yerinden numune alınmalıdır (Tablo 1). Genel olarak viral bir infeksiyonda şüpheli materyal hastalığın akut döneminde toplanmalıdır. Enfeksiyon sırasındaki virus saçılması ya da viremi devresi genellikle klinik semptomlar görülmeye başladıktan 1-3 gün sonra görülür, ancak bazı virüslerde virus saçılması daha uzun sürebilir. Bununla birlikte virüsün saçılma süresi virüsün sistemik yayılması ve tipine görede değişir. Örneğin *respiratorik sinsityal virus* genellikle 3-7 gün arasında saçılmaya devam eder. Akut ve iyileşme dönemlerinde numunelerin alınmada zamanlamaya mutlaka dikkat edilmelidir.

1.2. Şüpheli Materyalin Toplanması, Nakledilmesi, ve Viral Teşhis İçin Hazırlanması

Viral hastalıklardan şüpheli materyal olarak infeksiyonun seyrine ve patogeneze göre kan, gaita, burun çalkantı sıvısı/sürüntü örnekleri, rektal ve vaginal sürüntü örnekleri, vezikül sıvıları alınabilir. Şüpheli materyalin nakledilmesinde kullanılan ve belirli özellikler içeren vasata **transport (taşıma) vasatı** denir. En çok kullanılan transport vasatlarına *Hanks'in dengeli tuz solusyonu* (HBSS) ya da %50 gliserin içeren *dengeli fosfat tuz solusyonu* (PBS) örnek verilebilir.

Transport vasatta bulunması gereken özellikler:

- Nötral pH içeren dengeli tuz solusyonu şeklinde olmalı
- Virusu stabilize etmek amacıyla jelatin, sığır serum albumini veya fetal serum içermeli
- Bakteriyel ve/veya mantarlardan oluşabilecek kontaminasyonun önüne geçmek için mutlaka yüksek oranda (10 kat konsantre antibiyotik) solusyonu içermelidir.

Tanı amacı ile toplanan şüpheli materyaller mutlaka en kısa sürede yakında bulunan bir tanı laboratuvarına iletilmelidir. Materyal alınması sırasında dikkat edilecek önemli kriterler ise;

- Şüpheli infeksiyonun patogenezi ve klinik seyrine uygun materyal toplanmalıdır.
- Şüpheli materyalin alınacağı transport sıvısı steril olmalı ve mutlaka antibiyotik solusyonu içermelidir.
- Şüpheli materyalin alınımında kullanılacak aletler (makas, bistüri, enjektör, gaita kabı, idrar kabı, svap vb.) mutlaka steril olmalıdır.

- d. Materyalin alındığı kabın üzerine materyalin alım tarihi, saati, materyalin alındığı bölge mutlaka yazılmalı ve kap mutlaka sıkı bir şekilde kapatılıp bantlanmalıdır.
- e. Alınan materyalle birlikte yollanacak belgede hangi hastalıktan şüphe ediliyorsa bildirilmeli, hastalığın anamnezi ve hastanın eşgali (yaşı, cinsiyeti, adresi) yazılmalıdır. Materyali alan hekim belgeyi mutlaka imzalamalıdır.
- f. Şüpheli materyal ile bu işlemler bittikten sonra mutlaka soğuk zincir ile en kısa sürede uygun laboratuvara iletilmelidir.

Tablo 1. Çeşitli enfeksiyonlar için alınması gereken numune çeşitleri (Fenner's Veterinary Virology kitabından alınmış ve değiştirilmiştir).

Hastalık	Canlı Hayvanlar	Otopsi
Solunum ve okuler sistem hastalıkları	Burun ve konjunktivadan alınan sürüntü örnekleri, kan numuneleri	Etkilenen sistemlerden doku parçacıkları ve lenf yumruları
Deri hastalıkları, mukoz membran lezyonları	Etkilenen bölgelerden kazıntı örnekleri, svap örnekleri, kan numunesi	Etkilenen sistemlerden doku parçacıkları ve lenf yumruları
Sindirim sistemi	Gaita ve kan	Etkilenen sistemlerden doku parçaları, lenf nodulleri, intestinal içerik
Sistemik hastalıklar	Kan, burun ve ürogenital sistem sürüntüleri	Etkilenen sistemlerden doku parçaları, lenf nodulleri, intestinal içerik
Merkezi sinir sistemi hastalıkları	Kan beyin-omurilik sıvısı, gaita burun ve ürogenital sistem sürüntüleri	Etkilenen sistemlerden doku parçacıkları ve lenf yumruları
Ürogenital sistem	Ürogenital sürüntü örnekleri, idrar ve kan	Etkilenen sistemlerden doku parçacıkları ve lenf yumruları
Abortlar	Dişiden kan, vaginal mukuz	Plesenta ve fütüsten doku örnekleri, fütal kalpten kan, intestinal içerik

Viral bir hastalıktan şüpheli canlı ya da ölü hayvandan alınan materyaller tanı laboratuvarlarında işlenerek virus izolasyonu çalışması için hazır hale getirilir. Virus izolasyonu ve identifikasyonu için işlenerek hazır hale getirilen şüpheli materyal **inokulum** olarak tanımlanır. Viral hastalıkların tanısında toplanabilecek şüpheli materyaller ve virus izolasyonu için işleme metotları aşağıda verilmiştir

1.2.1. Organ materyallerinin işlenmesi

Viral enfeksiyonun seyrine göre çeşitli organlardan virus izolasyonu gerekebilir. Inokulum hazırlanmasında kullanılan organ veya gaita materyallerinin mutlaka taze olması gerekir. Organ ve doku materyalleri alındıktan sonra aşağıdaki adımlar takip edilerek işlenir (Şekil 1).

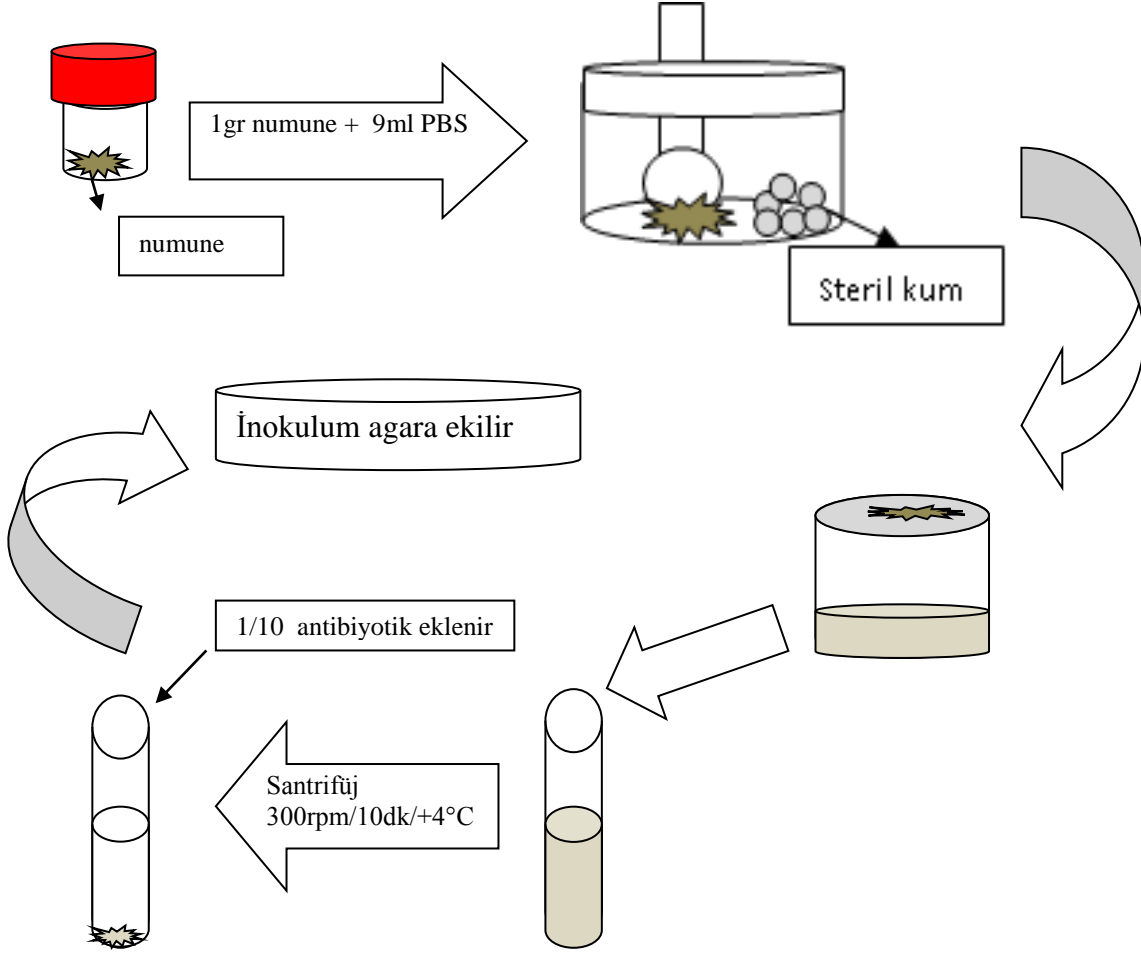
- a. Materyallerin işlenmesinde kullanılacak tüm alet ve gereçler steril olmalıdır.
- b. İnokulum hazırlanması düşünülen organ materyallerinin dış yüzeyi alkol ile silinerek dezenfekte edilir.

- c. Yaklaşık 1 gram organ numunesi steril pens ve bistüri vasıtasıyla alınır ve konsantre antibiyotik içeren PBS içine okunur.
- d. Havan ya da homojenizatör vasıtasıyla iyice ezilerek parçalanır. Eğer işlem havanda yapılıyorsa, havanın içine mutlaka steril kum ilavesi yapılmalıdır. Bu organ parçasının daha rahat ezilmesini sağlayacaktır.
- e. Parçalama ve ezme işlemi bittikten sonra ağızlarına tülbent gerilmiş steril kaplara süzülür. Böylece kaba partiküller tülbentte kalacak sıvı kısım kabın içinde birikecektir. Bu sıvı daha sonra tüplere aktarılır.
- f. 4 ° C’de 3000 devirde 30 dakikada santrifuj edilir.
- g. Santrifuj sonunda üsteki sıvı kısım alınır. İçine % 10 oranında konsantre antibiyotik ilave edilir. Antibiyotiğin etki etmesi için 1 saat süre ile 4 °C de bekletilir.
- h. Daha sonra bakteriyel bir kontaminasyon olup olmadığını kontrol için bu inokulumdan agara ekim yapılır. 24-48 saat sonrası agarda bakteri üremesi olmayan şüpheli organ numuneleri izolasyon için hazırdır. Çalışma yapılana kadar -80 °C’de saklanır. Bakteriyel kontaminasyon görülen inokulumları sterilite için bakterilerin geçemeyeceği filtre sistemlerinde süzülür.

1.2.2. Gaita materyalinin işlenmesi

İnsanlarda ve hayvanlarda infeksiyon oluşturan *adenovirus*, *rotavirus*, *coronavirus*, *enterovirus* gaitadan izole edilebilen virusların başında gelmektedir. Lipid zarla çevrili viruslar gaita numunelerinde aktif formda bulunmayabilir. Bu amaçla 2-4 gram gaita numunesi steril kaplara alınmalıdır. Alınan gaita numuneleri mutlaka dondurulmalı ve soğuk zincir altında nakledilmelidir. Laboratuvara gelen numuneleri aşağıdaki metotla işleyebiliriz.

- a. Gaitadan alınan 1 gramlık miktar konsantre antibiyotik (10X) içeren PBS solusyonu ile sulandırılır. Bir havan içinde ya da tüp içinde homojen hale getirilir. Homojenizasyon işlemi havanda yapılıyorsa havan içine mutlaka bir miktar steril kum ilave edilmelidir.
- b. Daha sonra bu homojenizat üzerinde steril tülbent bulunan steril bir kaba süzülür. Böylece homojenizat kaba partiküllerden arındırılır. Süzülen kısım santrifüj tüplerine aktarılır.
- c. 4 ° C’de, 3000 devirde, 30 dakika santrifüj edilir.
- d. Santrifüj sonrası tüpün dibine katı partiküller çöker. Üstte kalan sıvı kısım alınıp. İçine %10 oranında antibiyotik katılır. Daha sonra bakteriyel bir kontaminasyon olup olmadığını kontrol için bu inokulumdan agara ekim yapılır. 24-48 saat sonrası agarda bakteri üremesi olmayan gaita numuneleri izolasyon için hazırdır. Çalışma yapılana kadar -20 °C’de saklanır.
- e. Eğer yapılan ekimler sonucu herhangi bir bakteriyel kontaminasyon görülürse gaita inokulumları sterilitelerinin sağlanması amacıyla bakterilerin geçemeyeceği filtre sistemlerinden süzülür.



Şekil 1. Organ ya da gaita materyalinden inokulum hazırlanması

1.2.3. Kan materyalinin işlenmesi

Viral infeksiyonlarının tanısında kan materyalleri virus izolasyonu ve serolojik tanı amacıyla kullanılabilir. Kan materyallerinden virus izolasyonu, akut faz infeksiyonu belirtisidir. Bu amaçla kanın lökosit fraksiyonları kullanılır. Ayrıca birçok viral hastalığın tanısında kanın serum fraksiyonundan yararlanılır ve bu amaçla serum antikorlarının tespiti yapılır. Özellikle serumda IgM tipi antikorların tespit edilmesi hastalığın akut fazında olduğunu, IgG tespiti ise hastalığın geçirildiğini ya da immunizasyon uygulaması yapıldığını ortaya koymaktadır.

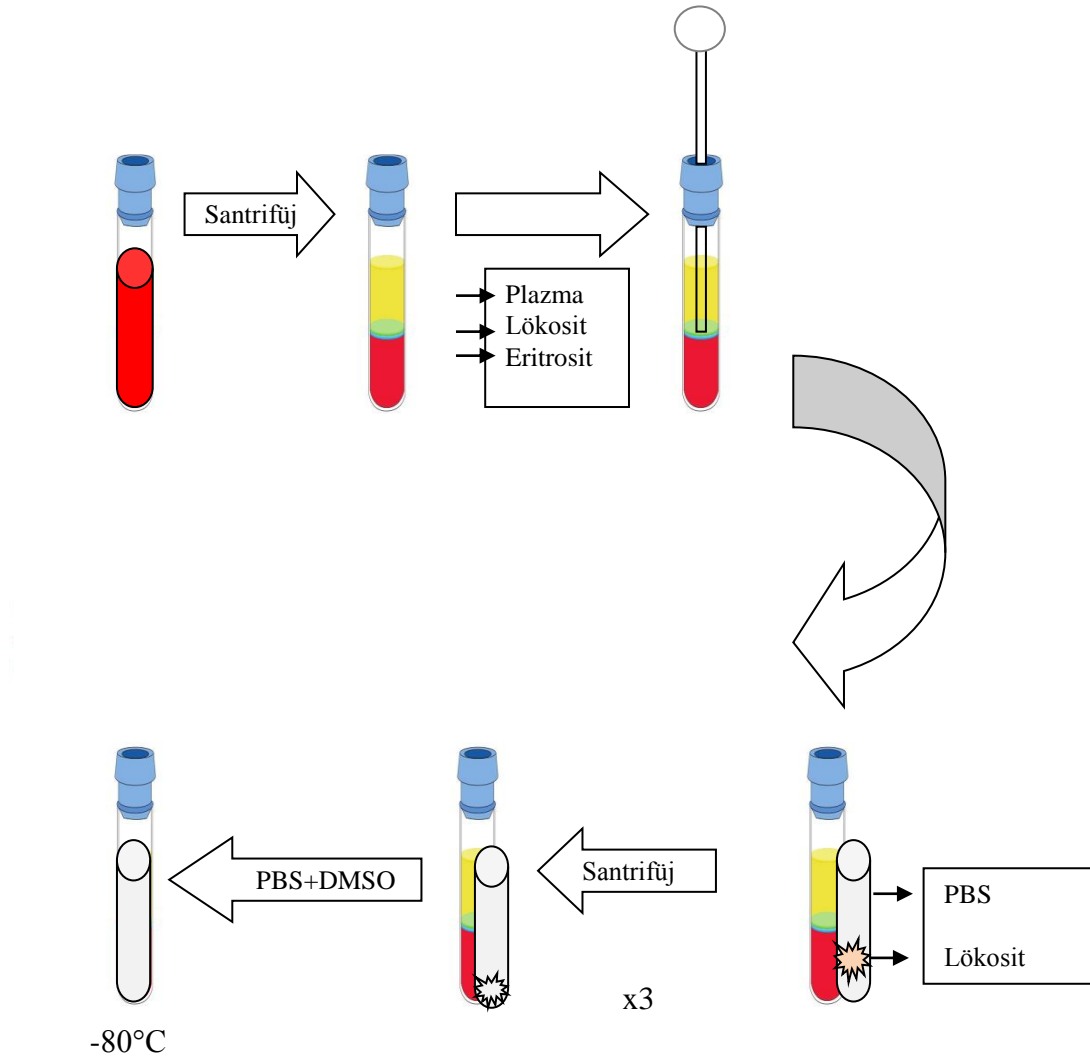
A. Virus izolasyonu yapmak amacıyla kan numunesi alınması ve izolasyon için hazır hale getirilmesi

Kan numuneleri antikoagulan madde (EDTA, heparin, sodyum sitrat, vb.) içeren tüplere, hayvandan direkt olarak alınmalı ve mutlaka soğuk zincir içinde (4 °C) ilgili laboratuvara iletilmelidir.

Kan alınması sırasında sterilizasyon işlemine ve her hayvan için ayrı iğne kullanılmasına özellikle dikkat edilmeli ve böylece iatrojen bir yolla bulaşmanın önüne geçilmelidir.

Kan numunelerinden lökosit izole edebilmek için aşağıdaki işlemler uygulanır (Şekil 2).

1. 4 °C'de 2000 devirde 5-10 dakikada santrifüj edilir.
2. Santrifüj sonunda kanın şekilli elementleri tüpün dibine çökerken, üste plazma kısmı kalır. Bu iki katman arasında ise ince bir tabaka şeklinde lökositler bulunur.
3. Steril bir pastör pipeti yardımıyla dikkatlice plazma tabakası geçilerek lökositler alınarak içinde 2-3 ml PBS solusyonu bulunan tüplere aktarılır.
4. Daha sonra tekrar 2000 devirde 5-10 dakikada santrifüj edilir. Bu bir nevi yıkama işlemidir ve iki üç kez yapılır.
5. Son yıkama işleminden sonra alınan lökositler 1 ml içinde PBS solusyonu bulunan tüplere aktarılır. İzolasyon çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'ye kaldırılır.

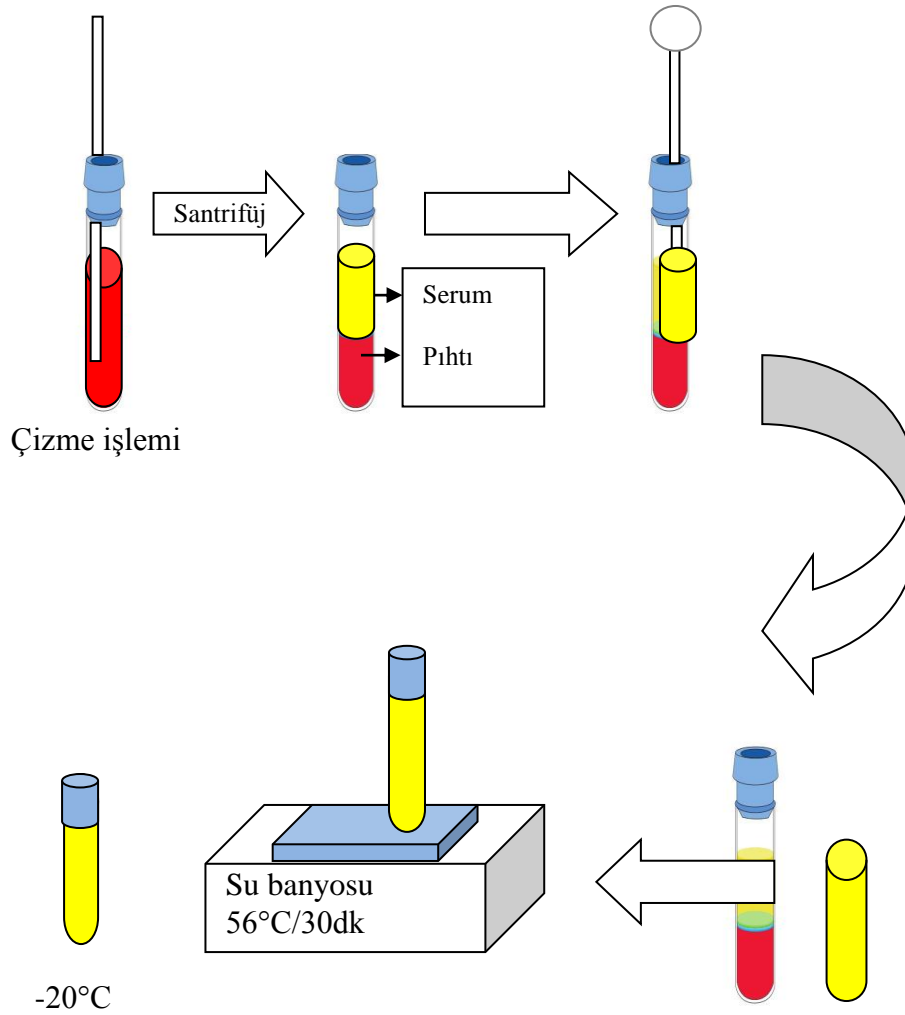


Şekil 2. Kan numunelerinin işlenmesi (Lökosit elde edilmesi)

B. Kan serumunda antikor tayini yapmak amacıyla kan numunesi alınması ve hazırlanması

Bu amaçla kan numuneleri antikoagulan içermeyen tüplere ya da kaolinli serum tüplerine alınır. Antikoagulan içermeyen tüplerde serumlar pıhtılaşacaktır. Laboratuvar soğuk zincir içinde nakledilen kanlar aşağıdaki işlemlere tabi tutulur (Şekil 3).

1. Pıhtılaşan kan ince bir tel ile teli tüp cidarına yaslayacak şekilde dik olarak çizilir. Daha sonra oda ısısında birkaç saat ya da 4 °C'de ise bir gece bekletilir.
2. Daha sonra serumun daha iyi çıkması için 3000 devirde 10-20 dakika santrifuj edilir.
3. Serum bir tüpe alınarak 56 °C'de 30 dakika su banyosunda inaktivasyon işlemine tutulur. Bu işlem sonrası serolojik testlerde kullanılmak üzere -20 °C'ye kaldırılır.



Şekil 3. Kan numunelerinin işlenmesi (Serum elde edilmesi)

1.2.4. Beyin-Omurilik sıvısını (BOS) işlenmesi

Özellikle insan viruslarından non-polioenterovirus ve kabakulak virusu (mumpsvirus), hayvanlarda Kuduz, Herpes viruslar ve Batı nil ateşi virusları BOS sıvısından izole edilebilir. BOS sıvısından genellikle virus izolasyon oranı düşüktür. Hasta hayvandan BOS numunesi en az 1 ml olacak şekilde alınmalı ve çok çabuk bir şekilde laboratuvara nakledilecekse transport vasatına konulmadan laboratuvara getirilmelidir.

Daha sonra;

1. Laboratuvara getirilen BOS numunesi +4 °C'de 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilir.
2. Santrifüj sonrası üstteki sıvıdan 1 ml alınır. BOS numuneleri steril enjektörle ve steril bir kaba alındığında sterilite kontrolüne gerek yoktur ve inokulum olarak çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de saklanır.

1.2.5. İdrarın işlenmesi

Birçok virus oluşturdıkları hastalığın inkubasyon periyodu boyunca idrarla saçılabilir. Özellikle, *cytomegalovirus* (CMV), *adenovirus* gibi birçok virus idrardan izole edilebilirler. Bu amaçla 10-50 ml idrar taze olarak steril kaplara alınmalı ve direkt olarak laboratuvara iletilmelidir. Daha sonra aşağıdaki prosedüre göre işlenir.

- 1- Laboratuvara getirilen idrar numunesi +4°C' de 3000 devirde 10 dakika santrifüj edilir.
- 2- Santrifüj sonrası üstteki sıvıdan 1 ml alınır 1/10 oranında konsantre antibiyotik (x10) içeren PBS ile sulandırılır.
- 3- Daha sonra bakterilerden arındırılmak üzere filtre sistemlerinden geçirilir. Sterilite kontrolü için agarlara ekim yapılır. Elde edilen inokulum çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de saklanır.

1.2.6. Vezikül sıvısı ya da lezyon alınması ve işlenmesi

Vezikül sıvısından örnekleme yapmak için önce vezikülün üzeri %70'lik alkol ile silinir. Tüberkülin iğnesi ile vezikül sıvısı alınır. Alınan bu sıvı 3-4 ml 10 katı konsantre edilmiş antibiyotik içeren transport vasatına aktarılır. Oluşmuş lezyonlardan ise steril svaplar kullanılarak örnek alınır. Bu svaplar 3-4 ml konsantre antibiyotik içeren transport vasatı içeren tüplere konur. PBS içine alınan vezikül sıvısı filtre sistemlerinden geçirilerek bakteri riskiden arındırılarak çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de saklanır.

Lezyonlardan PBS içine alınan steril svaplar 30 dakika oda ısısında bekletilir. Daha sonra aşağıdaki işlemler uygulanır.

- a. Svaplar iyice sıkılarak lezyonlarda var olduğu düşünülen virusun tüpte bulunan transport vasata geçmesi sağlanır.
- b. Tüp içeriği +4 °C'de 3000 devirde 30 dakika santrifüj edilir.
- c. Santrifüj sonrası üstteki sıvıdan 2 ml alınır 1/10 oranında konsantre antibiyotik (10X) ilave edilir. 1 saat süre ile +4 °C'de antibiyotiğin etkisi beklenir.
- d. Daha sonra agara ekim yapılarak sterilite kontrolü yapılan inokulum çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de saklanır.

1.2.7. Göz, burun akıntısı ve vajina sıvısı

Göz, burun veya vajinadan sıvı örnekleri steril svaplar ile alınır ve daha sonra 3-4 ml konsantre antibiyotik (10X) içeren transport vasatı bulunan kapaklı tüplere konularak laboratuvara soğuk zincir altında nakledilir. Daha sonra aşağıdaki işlemler uygulanarak işlenir.

- Svaplar önce iyice sıkılarak lezyonlarda var olduğu düşünülen virusun tüpte bulunan transport vasatına geçmesi sağlanır.
- Tüp içeriği +4 °C'de 3000 devirde 30 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrası üstteki sıvıdan 2 ml alınır 1/10 oranında konsantre antibiyotik ilave edilir ve 1 saat süre ile +4 °C'de antibiyotiğin etkisi beklenir.
- Daha sonra agara ekim yapılarak sterilite kontrolü yapılan inokulum çalışmalarda kullanılmak üzere -80 °C'de saklanır.

Yukarıda verilen şüpheli materyallerden inokulum elde edilmesi kadar, inokulumların çalışma yapılana kadar doğru saklanması da önemlidir. Virusların labil olmasından dolayı, en iyi inokulasyon yöntemi toplandıktan sonra hemen işlenerek inokulum haline getirilerek, virus izolasyon için *in vivo* ve *in vitro* sistemlere inokusyonlarının yapılmasıdır. Eğer gelen şüpheli materyalleri hemen ekim şansımız yoksa 24 saat içinde ekilmeli, bunun içinde şüpheli materyaller 4 °C'de saklanmalıdır. Şüpheli materyallerden hazırlanan inokulumlar daha uzun bir periyotta ekilecek ise infektivitenin korunması için saklama ısı derecesi -80 °C olmalıdır. Bazı viruslar için şüpheli materyalin -20 ya da -25 °C'de saklanması da yeterli olabilir. Respiratuar sinsisyal virus (RSV) ya da Sitomegalovirus (CMV) şüpheli materyal ise kesinlikle dondurulmamalıdır.

2. VİRUS İZOLASYONU

Viruslar hücre içi parazitlerdir ve çoğalmaları için mutlaka canlı ortamlara ihtiyaç duyarlar. Virusların izolasyonunda kullanılan canlı ortamları *in vivo sistemler* ve *in vitro sistemler* olarak ikiye ayrılır. *In vivo* sistemler embriyolu tavuk yumurtası (ETY) ve deney hayvanlarını *in vitro* sistemler ise hücre kültürlerini kapsar.

2.1. VİRUSLARIN ÜRETİLMELERİNDE KULLANILAN *İN VİVO* SİSTEMLER

2.1.1. Deneme Hayvanlarında Virus İzolasyonu

Bu yöntem diğer virus izolasyon metodlarına göre daha pahalı ve riskli bir yöntemdir. Virusların üretilmelerinde gerekli izinler alınmak koşulu ile fare başta olmak üzere rat, tavşan ve civciv gibi küçük deneme hayvanları ile dana, koyun, gibi büyük hayvanlarda kullanılabilir. Deneme hayvanlarından ayrıca pozitif serum, negatif serum, tip spesifik serum elde etmek amacıyla da yararlanılır. Viral izolasyon çalışmalarında en çok kullanılan deneme hayvanı farelerdir. Özellikle yeni doğan fareler bir çok virus türlerinin izolasyonu için oldukça duyarlıdır. Doğumdan 24- 48 saat sonra yavru farelere inokulasyon yapılabilir. Yaşlı fareler bazı viruslar için daha duyarlı olabilir.

Virus izolasyon çalışmalarında kullanılan deneme hayvanlarını üç kategoride toplayabiliriz.

a.Konvansiyonel Hayvanlar

Üretilmeleri ve yaşamaları için normal bakım ve besleme koşulları yeterli hayvanlardır. Genel olarak sağlıklı hayvan gruplarıdır. Klinik olarak hastalık belirtisi göstermeyen hayvanlardan seçilirler. Deri, ağız mukozası solunum sistemi ve ürogenital sistemde patojen ve apatojen mikroorganizmalardan oluşan değişmeyen bir mikrofloraları vardır. Bu yüzden de bu hayvanlarla yapılan deneysel enfeksiyon çalışmaları güvenli olmayabilir. Bu hayvanlar genellikle tanı testlerinde kullanılacak eritrositin elde edilmesinde kan almak için kullanılırlar.

b. Özel bir patojenden ari hayvanlar (SPF; Spesific Pathogen Free)

Bünyesinde bazı özel mikroorganizmaları taşımayan deneme hayvan grubudur. Yani bütün mikroorganizmalardan arındırılmış değildirler. SPF hayvanlar tüm pnömokok, klebsiella, listeria, helmintler, protozoalar, ve fare viruslarından arındırılmış olmaları gerekmektedir. Yetiştirilmeleri için mutlaka eğitilmiş ve kalifiye elemanlara ihtiyaç vardır. Herhangi bir hayvan ya da hayvan grubunun doğal mikrobiyolojik durumu bilinmiyorsa bu hayvanlar konvansiyonel olarak kabul edilirler. Deneylerde kullanılan SPF hayvanlar ürünlerin güvenlik testleri ile infektif hayvanların performanslarının denendiği çalışmalarda konvansiyonel deney hayvanlarına nazaran daha güvenli kullanılır. Yetiştirilmeleri esnasında kullanılan yem ve suların mutlaka mikrobiyolojik olarak kontrolleri yapılmalıdır. Bu grupta yer alan hayvanların üretilmeleri ve yetiştirilmeleri özel yöntemler ve bakım şartları gerektirmediğinden kolaylıkla üretilebilirler. Bu nedenle genellikle kısa süreli deneysel çalışmalarda kullanılırlar.

c. Germ-Free (GF) hayvanlar

Kapalı teknikle yetiştirilmiş ve saptanabilen tüm mikroorganizmalardan arındırılmış hayvanlardır. GF hayvanlar mikroorganizmalar tarafından oluşturulacak enfeksiyonlara çok duyarlı oldukları için özel yetiştirme şartları ve yerleri gerekmektedir. Ancak üretimleri yetiştirilme şartları çok pahalı bir yöntemdir. Üretimleri ise iki metotla yapılır. Birinci metotta gebe anneye aseptik histerektomi uygulanır. Kapalı uterus asıl hayvandan alınarak aseptik olarak dezenfektan içeren bir daldırma tankı içinde steril bir izolatöre konur. İzolatör içinde uterus açılarak yavru doğurtulur. Diğer yöntem ise histerotomi yani sezaryendir. Yavru uterus açıldıktan hemen sonra izole edilir. Özellikle viral patogeneze çalışmalarında oldukça güvenli olarak kullanılır. Yetiştirilmeleri kalifiye ve eğitilmiş kişiler tarafından yapılmalıdır.

Virolojik çalışmalarda kullanılan deney hayvanlarının bazı özellikler taşıması ve çalışmada kullanılırken aşağıdaki noktalara dikkat edilmesi gerekir;

- a. Deney hayvanının türü, etkene duyarlılığı kolay ve ucuz olarak sağlanabilir olması gerekir.
- b. Hayvanlar sağlıklı olmalıdır.
- c. Deney hayvanlarına uygulanacak inokulumun usulüne uygun şartlarda hazırlanmış olması ve ayrıca uygun miktarlarda inokule edilmesi şarttır.
- d. Mutlaka kontrol grubu yapılmalıdır.

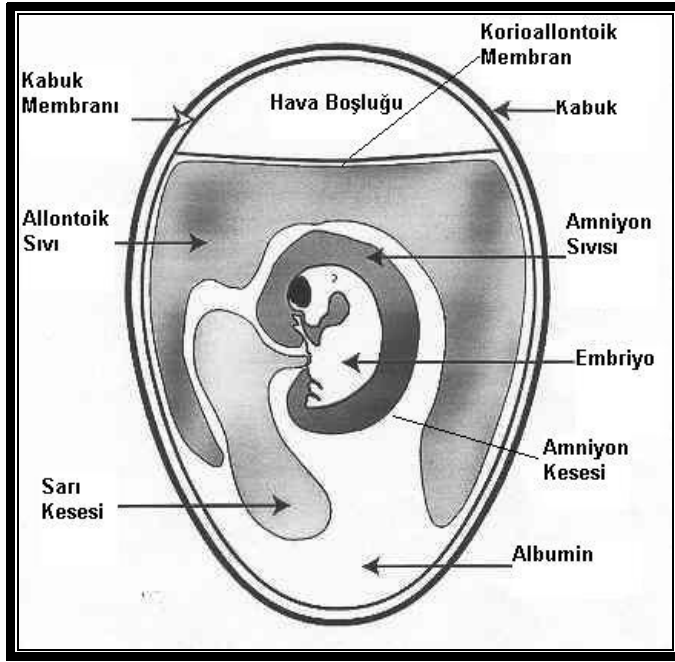
e. İnokulasyon en uygun yöntemle yapılmalıdır. Deney hayvanlarında kullanılan inokulasyon yöntemleri çeşitlidir. Bu inokulasyon yöntemlerine örnek olarak intradermal, intraperitoneal, subkutan, intraserebral, intravenöz inokulasyonlar örnek olarak verilebilir.

2.1.2. Embriyolu Tavuk Yumurtasında Virus İzolasyonu

Virus izolasyonlarında kullanılan bir diğer in vivo ortam embriyolu tavuk yumurtalarıdır (ETY). Diğer in vivo ortamlara göre daha kolay bulunabilen ve daha ucuz bir yöntemdir. Virüs izolasyon çalışmalarında genellikle hücre kültürü sistemleri kullanılıyor olsada günümüzde özellikle *influenza virus* başta olmak üzere *poxvirus* ve *reovirus* infeksiyonları, kanatlıların *New Castle hastalığı virusu* gibi birçok virusun üretilmesinde halen ETY kullanılmaktadır. Sağlıklı bir ETY' nin kısımları Şekil 4'de gösterilmiştir.

Virus izolasyonunda ya da aşı üretiminde kullanılacak ETY' larında olması gereken kriterler ise şunlardır;

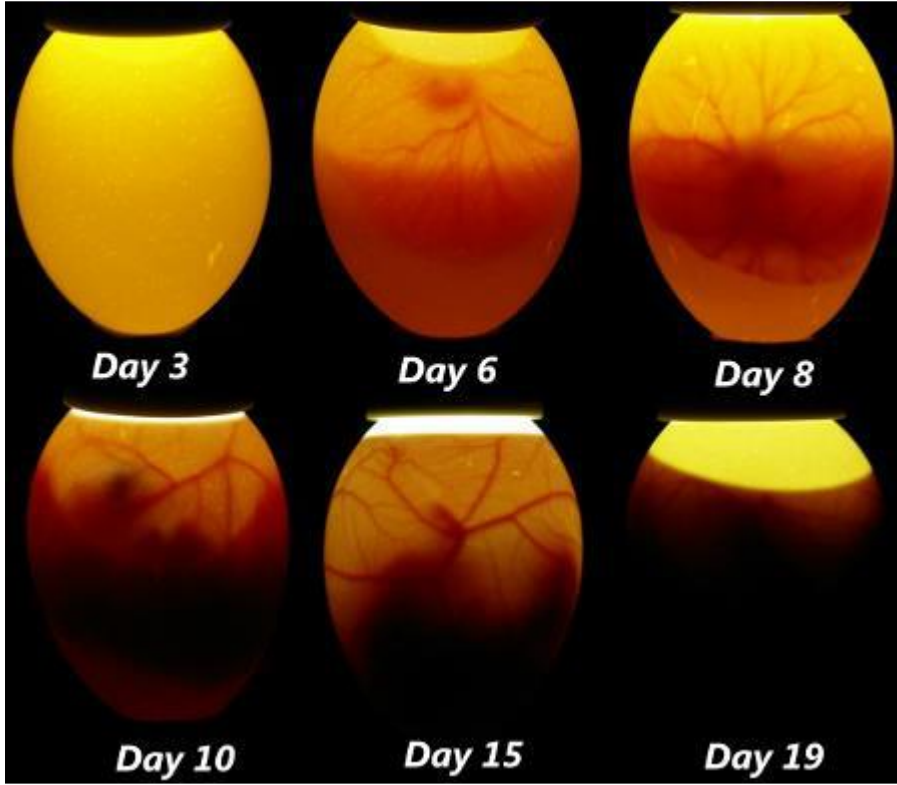
- ETY, kesinlikle hastalık içermeyen kümeslerden seçilmelidir.
- Canlılık kontrolü yapılmalı ve dömlü yumurtalar alınmalıdır .
- Kuluçka için kullanılacak vialler inkubatörlere hava boşluğu yukarı gelecek şekilde dik olarak yerleştirilmelidir.
- İnkubatörlerde %40-70 oranında nem ve 37 °C ısı bulunmalıdır.
- Yumurtalar günde üç kez elle ya da mekanik çevrilmelidir.



Şekil 4. Sağlıklı bir embriyolu tavuk yumurtasının kısımları

(Kaynak: <http://www.virology.ws/2009/12/10/influenza-virus-growth-in-eggs/>)

İnkubasyona alınan yumurtalar bir hafta sonra karanlık odada kuvvetli bir ışık altında canlılık kontrolüne alınırlar. Ekim için kullanılacak sağlıklı embriyo bulunan yumurtalarda, ışık kaynağı altında güçlü vaskularizasyon ve embriyonun hareketi görülür, embriyo bulunmayan yumurtalarda ise vaskularizasyon görülmez (Şekil 5).

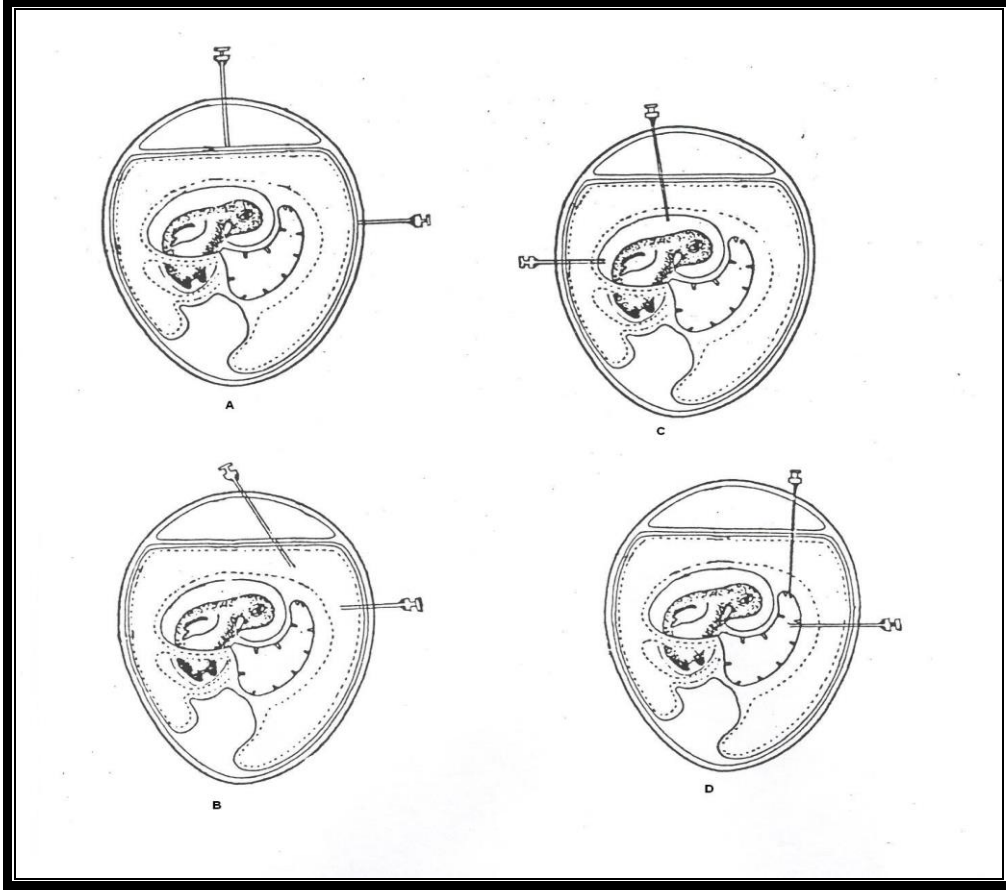


Şekil 5. Embriyolu tavuk yumurtasına ekimde kullanılacak yumurtaların günlere göre embriyo gelişimi (Kaynak: <http://incubatorwarehouse.com/egg-candling>)

Embriyolu tavuk yumurtalarına tüm ekim metodlarında uygulanan ön bir hazırlık safhası bulunur. Bu safhada ekim yapmadan önce yumurtanın hava kesesi bir ışık kaynağı altında mutlaka işaretlenmelidir. Daha sonra ise ekim tekniğinin uygulanacağı yumurta bölgesinde yumurta kabuğu %70'lik alkol veya tentürdiyot ile silinerek dezenfekte edilmeli, dezenfeksiyon işleminden sonra da bölgenin kuruması için biraz beklenmelidir. İnokulasyon yapılan yumurtalar kesinlikle döndürülmemelidir ve inokulasyon yapılan yumurtalar inokulasyon yapılmayan yumurtalardan farklı inkubatöre kaldırılmalıdır. Ayrıca inokulasyonda tercihen 6-12 günlük embriyolu tavuk yumurtaları kullanılmalıdır.

ETY' ye ekim 4 bölgeye yapılmaktadır (Şekil 6);

- a. Koriyoallontoik membrana ekim
- b. Koriyoallontoik boşluğa ekim
- c. Yumurta sarısına ekim
- d. Amniyotik keseye ekim



Şekil 6. Embriyolu tavuk yumurtasına ekim yöntemleri. A: Koryoallontoik membrana (CAM) ekim, B: Koryoallontoik Boşluğa Ekim, C: Amnion kesesine ekim, D: Yumurta Sarısına ekim (Kaynak: Burgu ve Akça'nın Genel Viroloji Teksiri)

Bu ekim yöntemleri dışında embriyoya intraserebral, intravenöz ya da subkutan olarak inokulasyon yöntemleride vardır ancak bu ekim metotlarının rutinde kullanılması çok zordur. EYT'ye ekim sonrası inokulasyon şekline göre ya embriyo ölene kadar ya da optimal virus üremesi şekillenene kadar inkubatörde bekletilir. Bazı viruslar düşük ısı derecelerinde 35 °C veya daha düşük ısı derecelerinde inkubasyona bırakılır. Bazı viruslarda ise embriyo ölmez, virüs üremesi patolojik bozukluklara bakarak ya da virolojik testlerle saptanır.

a. Koriyoallontoik membrana ekim

Koriyoallontoik membrana (CAM) ekim özellikle *herpesvirus* ve *poxvirus* gibi epiteliotrop karakterde olan virusların üretilmesinde duyarlı olan ancak günümüzde fazla sık kullanılmayan bir metottur. CAM'a ekim hava kesesi tarafından ve yan taraftan yapılmak üzere iki türlü yapılır. Ekimde kullanılacak embriyolu tavuk yumurtaları 9-12 günlük olmalıdır.

a.1. Hava kesesi tarafından ekim

- Karanlık odada ışık kaynağı altında yumurtada embriyonun bulunduğu yer ve hava kesesi işaretlenmelidir. Daha sonra hava kesesinin bulunduğu yer tentürdiyot ile dezenfekte edilir.
- Özel deliciler kullanılarak kabuk delinir. Delik steril bir makas yardımı ile genişletilir.

- c. Ekilecek virus süspansiyonundan 0,05 ml tüberkulin enjektörüne çekilerek CAM ın yüzeyinin çeşitli yerlerine damlatılır. Daha sonra enjektörün ucu ile membranın üzeri çizilir.
- d. Açılan pencere steril bir bantla kapatılır.
- e. Ekim yapılacak yumurtalar viallere dik olarak %40-70 oranında nem ve 37 °C ısı bulunan inkubatörlere kaldırılır (Şekil 6).



Şekil 7: ETY’de hava kesesinin açılması (Kaynak: Amie J Eisfeld, GabrieleNeumann,Yoshihiro Kawaoka, (2014) Nature Protocols 9, 2663-2681).

a.2. Yan tarafından ekim

- a- Karanlık odada ışık kaynağı yumurtada embriyonun bulunduğu yer ve hava kesesi işaretlenmelidir. Daha sonra hava kesesinin bulunduğu yer ile ekim yapılacak yan taraf tentürdiyot ile dezenfekte edilir.
 - b- Özel deliciler kullanılarak kabuk hava kesesi ve ekimin yapılacağı taraflarından delinir.
 - c- Bir lastik puar yardımı ile hava kesesi tarafındaki delikten hava çekilir. Oluşacak negatif basınçtan dolayı CAM membran kabuktan ayrılarak aşağıya doğru çekilir.
 - d- Steril bir makas yardımı ile ekim yapılacak taraftaki delik genişletilir.
 - e- Ekilecek virus süspansiyonundan 0.05 ml tüberkulin enjektörüne çekilerek CAM ın yüzeyinin çeşitli yerlerine damlatılır. Daha sonra enjektörün ucu ile membranın üzeri çizilir.
 - f- Açılan delikler steril bantlarla kapatılır.
 - g- Ekim yapılacak yumurtalar viallere dik olarak %40-70 oranında nem ve 37 °C ısı bulunan inkubatörlere kaldırılır. CAM’ a yapılan ekimlerde belli bir süre sonra değerlendirmeye gidilir. Burada ilk 48 saat içinde meydana gelen embriyo ölümleri teknik hatadan meydana geldiği varsayılarak değerlendirmeye alınmaz.
- Değerlendirme korioallontoik membranda meydana gelen morfojik değişikliklere göre yapılır. Bu amaçla daha önce açılan pencere genişletilerek CAM membran açığa çıkarılır ve buradan petri kutularına aktarılır. Petri kutularına alınan infekte CAM birkaç ml PBS solusyonu ile yıkanır. Daha sonra CAM membran petri kutusunun yüzeyine yayılır. Petri kutusu koyu bir zemin üzerine oturtularak oluşan nodüller kontrol olarak çıkarılan sağlıklı CAM ile karşılaştırılarak değerlendirilir.



Şekil 8: ETY' nin CAM' ında insan vaccinia -like virus lezyonları (Kaynak: Nagasse-Sugahara TK, Kisielius JJ, Ueda-ItoM, CurtiSP, Figueiredo CA, Cruz AS, Silva MM, Ramos CH, Silva MC, Sakurai T, Salles-Gomes LF (2004). Human vaccinia-like virüs outbreaks in SãoPauloand Goiás States, Brazil: virüs detection, isolation and identification. RevInstMedTropSaoPaulo.46(6):315-22).

b. Koriyoallontoik boşluğa (Chorioallontoic Cavity=CAC) ekim: Bu amaçla 9-11 günlük embriyolu tavuk yumurtaları ekim amaçlı kullanılır. Bu teknik günümüzde özellikle kanatlıların *New Castle hastalığı virusunun* üretilmesinde, infektivite titresinin tayin edilmesinde ve aşı üretiminde kullanılmaktadır.

b.1. Hava kesesi tarafından ekim

- a- Karanlık odada ışık kaynağı yumurtada embriyonun bulunduğu yer ve hava kesesi işaretlenmelidir. Daha sonra hava kesesinin bulunduğu yer tentürdiyot ile dezenfekte edilir.
- b- Özel deliciler kullanılarak kabuk delinir. Ucunda uzun bir iğne bulunan enjektöre 0.1 ya da 0.2 ml virus çekilir ve açılan delikten 45 derecelik açı ile girilir. İğne ucunun karşılaştığı ilk engel koriyoallontoik membran olacaktır. Bu membran iğne ile geçildikten sonra girilen boşluk allontoik boşluktur. Buraya virus inokulasyonu yapılır.
- c- Açılan pencere steril bir bantla kapatılır.
- d- Ekim yapılacak yumurtalar viallere dik olarak % 40-70 oranında nem ve 37 °C ısı bulunan inkubatörlere kaldırılır.

b.2. Yan tarafından ekim

- a- Karanlık odada ışık kaynağı yumurtada embriyonun bulunduğu yer ve hava kesesi işaretlenmelidir. Daha sonra hava kesesinin bulunduğu yer tentürdiyot ile dezenfekte edilir.
- b- Özel deliciler kullanılarak kabuk ekimin yapılacağı taraflardan delinir.
- c- Yapılacak inokulasyonda kısa uçlu bir enjektör kullanılır. Dik olarak delikten yaklaşık 0.5 cm girilir. 0.1-0.2 ml virus allontoik boşluğa ekilir.
- d- Açılan delikler steril bantlarla kapatılır.

Allontoik boşluğa yapılan ekim sonrası virusun cinsine bağlı olmak üzere 2-7 gün arası inkubasyonda beklendikten sonra değerlendirme yapılır. Bu arada ilk 48 saat içinde meydana gelen embriyo ölümleri teknik hatadan meydana geldiği varsayılarak değerlendirmeye alınmaz. Değerlendirme için ekim yapılan yumurtalar inkubasyondan sonra 4 °C'de 1 gece -20 °C ısıda 2-4 saat tutularak embriyonun ölümü sağlanır. Daha sonra yumurta kabuğu hava kesesi üzerinden açılır. Kabuk membranı ile CAM steril bir makasla kesilerek uzaklaştırılır.

Daha sonra allontoik boşluktaki sıvı bir enjektör aracılığı ile çekilir. Alınan bu sıvıya hemaglutinasyon testi uygulanarak sonuç değerlendirilir.

c. Amnion kesesine ekim: Amnion kesesine ekim özellikle Paramiksovirus virüs ile influenza virus için kullanılır. Paramiksovirus için 7-8 günlük, influenza virusu için ise 12-14 günlük embriyolu tavuk yumurtaları uygundur. Amnion boşluğuna ekim içinde iki yöntem kullanılır.

c.1. Hava kesesi tarafından ekim

a- Karanlık odada ışık kaynağı altındaki yumurtada embriyonun bulunduğu yer ve hava kesesi işaretlenmelidir. Daha sonra hava kesesinin bulunduğu yer tentürdiyot ile dezenfekte edilir.

b- Özel deliciler kullanılarak kabuk delinir. Ucunda uzun bir iğne bulunan enjektöre 0.1-0.2 ml virus çekilir ve açılan delikten embriyo hedef alınarak girilir. CAM ve allontoik boşluk geçilerek amnion kesesine ulaşılır. İğnenin ucu embriyoya ulaştığında bir hareket hissedilir. İğne biraz geri çekilir ve bu bölgeye virus inokulasyonu yapılır.

c- Açılan pencere steril bir bantla kapatılır.

d- Ekim yapılan yumurtalar viallere dik olarak %40-70 oranında nem ve 37 °C ısı bulunan inkubatorlere kaldırılır.

c.2. Yan tarafından ekim :

a- Karanlık odada ışık kaynağı altındaki yumurtada embriyonun bulunduğu yer ve hava kesesi işaretlenmelidir. Daha sonra hava kesesinin bulunduğu yer tentürdiyot ile dezenfekte edilir.

b- Özel deliciler kullanılarak kabuk ekimin yapılacağı taraflardan yani **embriyonun bulunduğu taraftan** yapılır.

c- Yapılacak inokulasyonda kısa uçlu bir enjektör kullanılır. Dik olarak delikten girilir. Buradan embriyoya olan mesafe daha kısa olacağından dikkatli olunmalıdır. Embriyonun hareketi hissedilince iğne biraz geri çekilir ve yaklaşık 0.1-0.2 ml virus amnion boşluğuna ekilir.

d- Ekim yapılacak yumurtalar viallere dik olarak %40-70 oranında nem ve 37 °C ısı bulunan inkubatorlere kaldırılır. Amniotik boşluğa yapılan ekim sonrası virusun cinsine bağlı olmak üzere 2-7 gün arası inkubasyonda beklendikten sonra değerlendirme yapılır. Paramiksovirus için 5-7 gün, influenza için 2-4 günlük bir inkubasyon süresi yeterlidir. Bu arada ilk 48 saat içinde meydana gelen embriyo ölümleri teknik hatadan meydana geldiği varsayılarak değerlendirmeye alınmaz.

Amniyon kesesine ekimde virus kısa zamanda embriyonun solunum ve sindirim sistemine geçer ve genellikle de embriyoyu öldürür. Ölmeyen embriyolar ise bizim tarafımızdan öldürülür. Ölen yada öldürülen embriyolu tavuk yumurtalarının içinden enjektörle amniyon sıvısı çekilir steril tüplere aktararak hemaglutinasyon testi yapılır.

d. Yumurta sarısına ekim: Embriyolu tavuk yumurtasının bu bölgesine yumurta sarısının en büyük olduğu 6-8 gün arasında ekim yapılır. Koyunların *mavi dil virusu* ile *kısarakların virusu abortusu* burada üretilebilir. İki metotla yapılır.

d.1. Hava kesesi tarafından ekim:

a- Karanlık odada ışık kaynağı altındaki yumurtada embriyonun bulunduğu yer ve hava kesesi işaretlenmelidir. Daha sonra hava kesesinin bulunduğu yer tentürdiyot ile dezenfekte edilir.

b- Özel deliciler kullanılarak hava kesesinin bulunduğu taraftan kabuk delinir. Ucunda uzun bir iğne bulunan enjektöre 0.1 ya da 0.2 ml virus çekilir ve açılan delikten yumurta sarısı

hedeflenerek girilir. Yumurta sarısına ulaşıldığında ise enjektör sağa sola oynatmadan inokulasyon yapılır. İğne dik olarak geri çekilir. Böylece yumurta sarısının dağılması önlenir.

c- Açılan pencere steril bir bantla kapatılır.

d- Ekim yapılacak yumurtalar viallere dik olarak %40-70 oranında nem ve 37 °C ısı bulunan inkubatörlere kaldırılır

d.2. Yan tarafından ekim:

a- Karanlık odada ışık kaynağı altında yumurtada embriyonun bulunduğu yer işaretlenir. Daha sonra bu bölge alkolle dezenfekte edilir.

b- Özel deliciler kullanılarak kabuk ekimin yapılacağı taraflardan yani embriyonun ters tarafından delinir.

c- Yapılacak inokulasyonda kısa uçlu bir enjektör kullanılır. Dik olarak delikten girilir ve 0.1-0.2 ml virus yumurta sarısına ekim yapılır.

d- Ekim yapılan yumurtalar viallere dik olarak %40-70 oranında nem ve 37 °C ısı bulunan inkubatörlere kaldırılır. Yumurta sarısına ekim sonrası virusun cinsine bağlı olmak üzere 2-3 gün arası inkubasyonda beklenildikten sonra değerlendirme yapılır. Bu arada ilk 48 saat içinde meydana gelen embriyo ölümleri teknik hatadan meydana geldiği varsayılarak değerlendirmeye alınmaz. Değerlendirme için ekim yapılan yumurtalar inkubasyondan sonra 4 °C'de 1 gece, -20 °C ısıda 2-4 saat tutularak embriyonun ölümü sağlanır. Daha sonra yumurta kabuğu hava kesesi üzerinden açılır. Kabuk membranı ile CAM, steril bir makasla kesilerek uzaklaştırılır. Daha sonra yumurta sarısı bir enjektör ile çekilir ve özel boyamalarla oluşan inklüzyon cisimciklerine bakılarak tanı konur.

2.2. VİRUSLARIN ÜRETİLMELERİNDE KULLANILAN İN VİTRO SİSTEMLER

HÜCRE KÜLTÜRLERİ :

İnsan ve hayvanlara ait hücrelerin izole edilip üretilmesinin tarihi oldukça eskidir. Hücre kültürlerinin temeli 1878 yılında Claudio Bernard tarafından ortaya atılan organların organizma dışındada canlılıklarını devam ettirebilmeleri düşüncesi ile atılmıştır. 1885 yılında Roux ilk kez bir organı kısa süreli olarak organizma dışında yaşatmayı başarmıştır. 1898 yılında Ljungren insan deri fragmentlerini asites sıvısı içinde 1 gün süre ile kültüre etmiştir. Hücre kültürü kavramı ile ilk karşılaşma 20. yüzyılın başında gerçekleşmiştir. 1907 yılında Harrison bir kurbağanın sinir hücrelerini koagule lenf, içinde 1 hafta süre ile kültüre etmiştir. 1911 yılında Lewis ve Lewis hücre kültürü vasatının bileşenlerini ortaya koymuşlardır. 1927 yılında hücre kültüründe ilk aşı geliştirilmiştir. Enders ve arkadaşları 1940'lı yılların son dönemlerinde poliovirusların memeli hücre kültürlerinde üretmesi virus izolasyonları için bir devrim olmuştur. Daha sonraları hayvan ve insan dokularından hazırlanan hücre kültürleri virus izolasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1950 yılında ilk sentetik vasat Morgan tarafından bulunmuştur ve bu vasat M-199 vasatı olarak adlandırılmıştır. 1952 yılında Dulbecco poliovirus için plak test geliştirmiştir. 1976 yılında ise Kohler ve Milstein in vitro monoklonal antikor üretmişlerdir.

Doku veya organ parçalarının genel özellik ve fonksiyonlarını bozmadan in vitro olarak üretilmeleri ve muhafaza edilmeleri “**doku veya organ kültürü**” olarak tanımlanmaktadır.

Bir doku veya organın hücrelerinin izole edilerek üretilmelerine “**hücre kültürü**” denir. Hücre kültürlerini **üretim şekillerine** ve **hücre orijinlerine** göre sınıflandırılabilir.

A- Üretim şekillerine göre hücre kültürlerinin sınıflandırılması

Hücre kültürleri, üretim şekillerine göre **adherent** (stationer) ve **süspansiyon hücre kültürleri** olarak iki gruba ayrılır. **Adherent (stationer) hücre kültürleri**, tek tabaka (monolayer) halde üretilen hücre kültürleridir. Sabit ya da döner şekilde yapılabilir. Stationer hücre kültüründe hücreler bulundukları hücre üretme şişelerinin bir yüzeyini tabaka şeklinde kaplayarak canlılıklarını devam ettirirler. **Süspansiyon hücre kültürleri** ise devamlı hareketli ortamda üreyen ve üretildikleri hücre kültürü şişelerinin yüzeylerine yapışmadan canlılıklarını devam ettirirler. Bu tip hücre kültürleri genellikle kan, dalak ve kemik iliğinden elde edilir.

Hücre kültürlerinin üretildikleri hücre üretme şişelerinden alınarak diğer bir hücre üretme şişesine aktarılarak üretilmelerine “**subkültür**” denir.

B- Orijinlerine göre hücre kültürlerinin sınıflandırılması

Hücre kültürleri orijinlerine göre 3 grupta kategorize edilir. Bunlar primer hücre kültürleri, diploid hücre kültürleri ve permanent hücre kültürleridir.

1. Primer hücre kültürleri: Direkt olarak doku ve organdan hücrelerin izole edilerek yapılan hücre kültürleridir. Çoğunlukla epitelyal karakterdedir ve orijin aldıkları dokular ile aynı kromozom sayısına sahiptirler. Yaşlı hayvanların doku ve organlarından izole edilen hücrelerin üretilmesi çok zordur ve üremeleri için yüksek serum konsantrasyonları ve çok sayıda büyüme faktörünü içeren vasatlara gereksinim duyulur. Bu nedenle primer hücre kültürleri genellikle embriyonik (fötal) dokular ile yeni doğmuş hayvanların organ ve dokularından yapılır. Bu hücre kültürlerine örnek olarak primer böbrek hücre kültürleri, primer maymun böbrek hücre kültürü verilebilir. Primer hücre kültürleri en fazla iki ya da üç kez subkültür yapılabilirler. Bazen primer kültürler bir veya iki endojen virus içeriyor olabilirler. Bu duruma sığır (non sitopatojen BVDV ile enfekte olabilir) orijinli hücre kültürlerinde sık rastlanır. Hücrede rastlanan bu virüs ikinci bir virus üremesini interfere edeceğinden izolasyon çalışmasında kullanılacak bu hücrelerin mutlaka kontrol edilmesi gerekmektedir.

2. Diploid hücre kültürleri: Primer hücrelerin subkültürlerinin yapılması ile elde edilirler. Karyotipleri orijin aldıkları hücrelere yaklaşık %85 oranında benzerdir. Genellikle subkültüre edilme sayıları 20-50 civarındadır ve bundan sonraki subkültürlerde hücre formlarında bozulma şekillenir.

3. Devamlı hücre kültürleri: Sonsuz sayıda subkültürleri yapılan hücre kültürleridir ve karyotipleri eteroploid karakterde olup orijin aldıkları dokulardan tamamen farklıdır. Primer kültürlerin 70-80 kez pasajlanması sonucu elde edilen kültürlerdir. Genellikle insan ve hayvan dokularından tümör oluşumlarından ya da normal dokuların spontan transformasyonu takiben elde edilir. Genellikle virus çalışmalarında hızlı ve çok miktarda virus üretimi amacıyla devamlı hücre kültürleri kullanılır.

4. Fibroblast hücre kültürleri: Embriyonal dokulardan hazırlanan primer hücre kültürleridir.

Primer Hücre Kültürü Hazırlanması

Primer hücre kültürleri direkt olarak organ ve dokulardan hazırlanan hücre kültürleridir. Primer hücre kültürü hazırlanmasında en çok böbrekler, testis ve akciğerler kullanılır. Primer hücre kültürü hazırlanmasında dikkat edilmesi gereken önemli kriterler şunlardır:

- 1- Dokular direkt olarak fötüstan ya da sağlıklı genç hayvanlardan alınmalıdır.
- 2- Dokular steril şartlarda, soğuk zincir altında alınmalı ve süratle laboratuvara iletilmelidir.
- 3- Hücre kültürleri hazırlanmada kullanılacak tüm materyal steril olmalı, hazırlayacak kişi steril çalışma kurallarını tamamen uygulamalıdır.
- 4- Eğer alınan organda nekrotik doku veya yağ dokusu varsa mutlaka uzaklaştırılmalıdır.
- 5- Doku ve organda parçalama az hasar meydana gelecek şekilde yapılmalıdır. Bunun içinde kullanılan ekipmanın mutlaka keskin olması şarttır.
- 6- Elde edilen hücrelerin sağlıklı üretilebilmesi için mutlaka uygun ve zengin besi yeri kullanılmalıdır.

Tablo 2. Virolojik çalışmalarda kullanılan bazı devamlı hücre kültürleri (Kaynak: <https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>)

Hücre tipi	Orijini
MDBK (Madin Darby Bovine Kidney)	Sığır Böbrek, Epitelyal
MDCK (Madin Darby Canine Kidney)	Köpek Böbrek, Epitelyal
Vero (African Green Monkey Kidney)	Maymun Böbrek, Epitelyal
BHK-21 (Syrian Hamster Kidney)	Hamster Böbrek , Epitelyal
HEp-2(Human larynx Carcinoma)	İnsan Larinks Kanseri hücresi, Epidermoid
HeLa (Human Cervix Carcinoma)	İnsan Serviks Kanseri hücresi, Epidermoid
CrFK (Crandell Felin Kidney)	Kedi Böbrek, Epitelyal
PK (Pig Kidney)	Domuz Böbrek Epitelyal

Primer hücre kültürü hazırlama basamakları

1. Steril bisturi, makas ve pens alkol dolu bir kaba konur. Çalışmaya başlamadan ateşten geçirilir ve soğuması beklenir.
2. Primer hücre kültürü yapılacak dokudan bir makas yardımı ile küçük parçalar kesilerek steril bir petri kutusuna aktarılır. Burada makasla ve daha sonra da çift bisturi yöntemi ile daha küçük parçalara ayrılır.
3. Küçük parçalara ayrılan doku parçaları steril bir kaşık ile erlene aktarılır ve konsantre antibiyotik içeren PBS solusyonu ile yıkanır. Bu yıkama işlemi berrak bir solusyon elde edilene kadar 4-5 kez yapılmalıdır.
4. Daha sonra dokular üzerine % 0.25 lik tripsin içeren çözelti eklenir. Erlen içerisine steril bir manyetik çubuk atılır ve manyetik karıştırıcı ile oda ısısında 20 dakika karıştırılır. Bu işleme “**ön tripsinizasyon**“ denir ve ölü hücreleri uzaklaştırmak için yapılır. İşlem sonunda bu hücreler atılır.

Tripsin bağ dokuyu eriten bir enzimdir. Tripsin ile hücre elde edilme işlemine “**tripsinizasyon**“ denir. Tripsinizasyon iki şekilde yapılır. Bunlardan ilki soğuk tripsinizasyondur ve 4 °C de 6-24 saat arası tek bir kez yapılır. Diğerisi ise sıcak tripsinizasyondur ve bu işlem 37 °C de 20 dakikalık periyotlar halinde yapılır. Ön

tripsinizasyon sonrası asıl tripsinizasyon işlemi başlar. Bu işlemde hücreler toplanmaya başlanır.

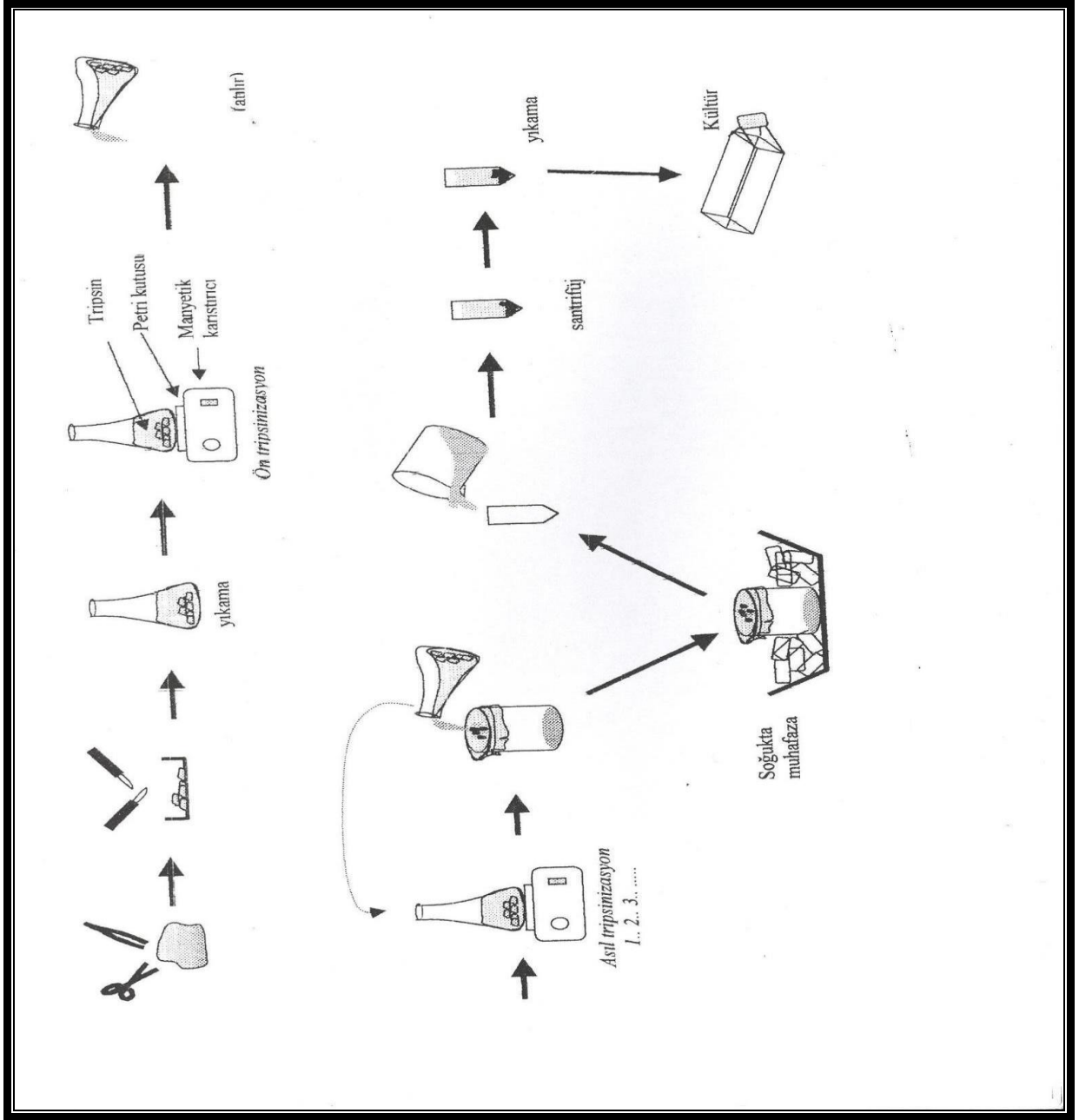
5. Ön tripsinizasyonu takiben dokular üzerine %0.25'lik tripsin içeren çözelti eklenir ve manyetik karıştırıcı ile oda ısısında 20 dakika karıştırılır. Bu süre sonunda steril tülbentle bir behere süzülür. Bu beher buzdolabına kaldırılır.

6. Dokular üzerine % 0.25'lik tripsin içeren çözelti tekrar eklenir ve manyetik karıştırıcı ile oda ısısında 20 dakika karıştırılır. Bu süre sonunda yeniden steril tülbentle bir behere süzülür. Yapılan bu tripsinizasyon işleminin sayısı dokunun ve elde edilen hücre süspansiyonunun yoğunluğuna göre belirlenir.

7. Son tripsinizasyon işlemini takiben beherde biriktirilen hücre süspansiyonları santrifüj tüplerine aktarılır. Soğutmalı santrifüj ile 4 °C'de 1000 devirde 10 dakika santrifüj edilir.

8. Hücreler dibe çöker ve üstte ise tripsin çözelti kalır. Bu çözelti atılır ve hücreler üzerine PBS solusyonu ilave edilir. Böylece hücre tekrar süspanse hale geçer. Bu işlemde amaç hücrelerin yıkanarak tripsinin hücrelerden uzaklaştırılmasıdır.

9. Soğutmalı santrifüj ile de 1200 devirde 10 dakika santrifüj tekrar edilir. Hücreler dibe çöker ve üstte kalan süpernatant atılır. Böylece santrifüj tüpünün üzerinde dipte tripsinden arındırılmış hücreler kalır. Bu hücreler üzerine hücre üretme vasatı ilave edilerek hücreler sayılır. Genelde hücre sayısı 1,000,000 hücre/ml olmalıdır. Bu oranda sulandırılmış hücreler hücre üretme şişelerine pay edilir ve üzerlerine şişe hacminin %10 oranında %20 dana serumu içeren hücre üretme vasatı konur. İhtiyaç fazlası olan hücreler dondurularak saklanır. Hücre kültürü şişeleri 37 °C ısı ihtiva eden etüvlere kaldırılır. 24 saat sonra vasatları %10 oranında dana serumu içeren hücre üretme vasatı ile değiştirilir (Şekil 9).



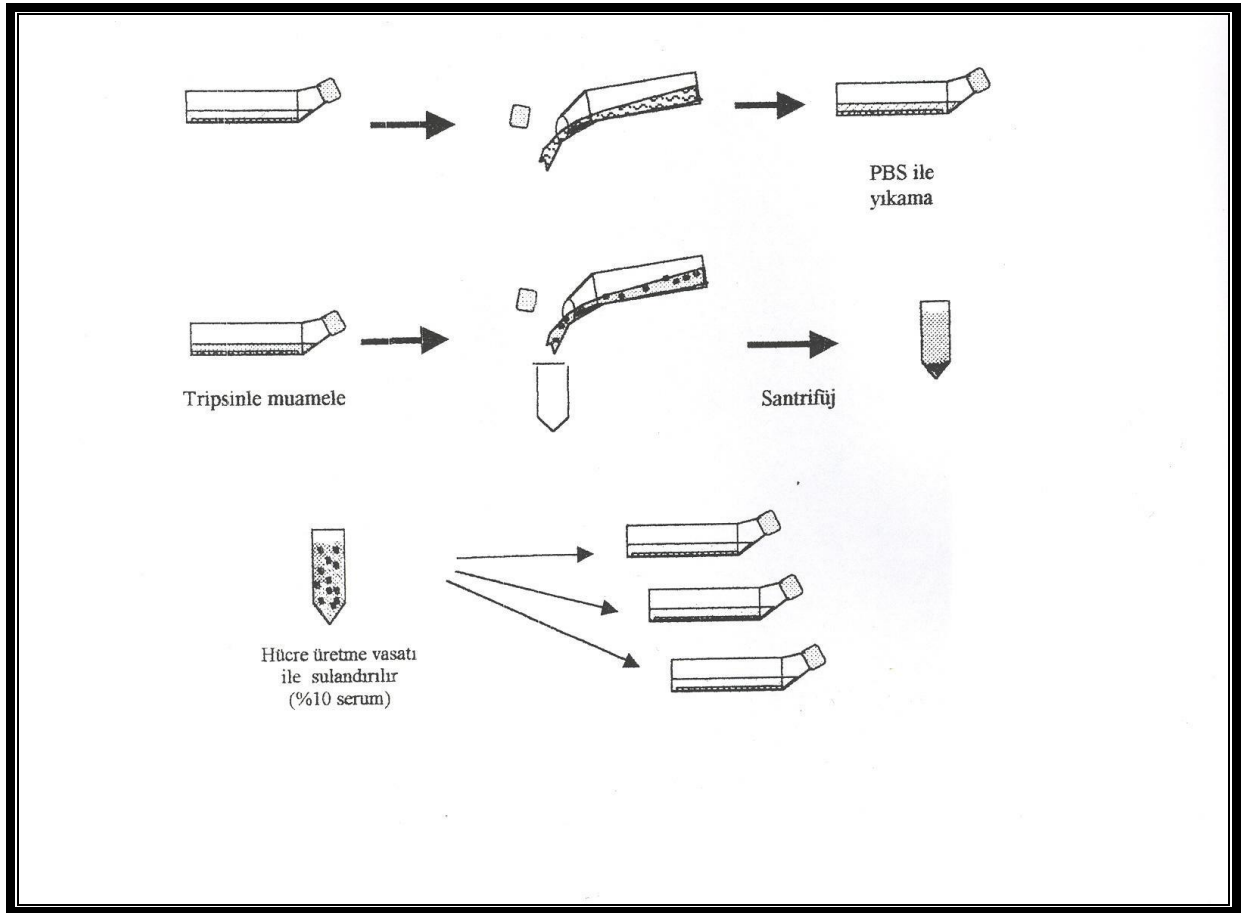
Şekil 9. Primer Hücre kültürü hazırlanması (Kaynak: Yeşilbaş K' in Viroloji Laboratuvar Uygulamaları Teksiri)

Subkültür yapılması

Tek bir tabaka (Monolayer) şeklinde hücre kültür şişelerinin zeminini kaplayan hücreler deforme olmadan subkültürleri yapılmalıdır. Böylece hücrelerin yaşlanması ve dejenerasyona uğrayarak ölmeleri engellenir. Ayrıca daha fazla hücre kültür şişesine aktararak miktarlarında bir artış sağlanır. Monolayer olarak üremiş olan hücrelerin hücre kültürü şişe yüzeylerinden ayrılması amacıyla tripsin, pankreatin, kollagen ve elastin gibi proteolitik enzimlere ihtiyaç vardır. Rutin çalışmalarda en fazla tripsin kullanılır. Hücre kültürlerinden subkültür yapılması basamakları şunlardır.

1. Öncelikle subkültür yapılmasında kullanılacak tüm vasatlar ve solusyonlar 37 °C ısıda olmalıdır.

2. Kùltür yapılacak şişenin üst tarafına tarih, hücre adı ve pasaj numarası yazılır.
3. Hücre kùltür şişesinin vasatı hücrelerin bulunmadığı yüzeyden dökülür ve hücre yüzeyi PBS ile yıkanır.
4. Hücre yüzeyini örtecek şekilde tripsin solusyonu ilave edilerek 37 °C'lik etüve kaldırılır ve 5-10 dakika beklenir. Bu süre içinde tripsin hücreler arası bağ dokuyu eritecek ve hücreler tripsin çözeltisi içinde serbest hale geçecektir. Bu hücreler santrifüj tüpüne aktarılır.
5. Soğutmalı santrifüj ile 4 °C'de 1000 devirde 10 dakika santrifüj edilir.
6. Üstte kalan süpernatant atılır. Dipteki hücreler bir miktar hücre vasat ile sulandırılır. Hücre sayma kamarasında sayılır (Thoma veya Neuber Sayma kamaraları). Hücre yoğunluğu 50-100,000 ml olacak şekilde son süspasasyon hazırlanır. Bu toplam sulandırma solusyonunun içine %10 oranında dana serumu ilave edilerek hücre üretme şişelerine bölünür. 37 °C'lik etüve kaldırılarak inkube edilir (Şekil 10).



Şekil 10. Subkùltür yapılması (Kaynak: Yeşilbağ K' in Viroloji Laboratuvar Uygulamaları Teksiri)

Hücre kùltürlerinin saklanması

Virus ile yapılan çalışmalarda kullanılan hücre kùltürleri gerek yapılması gerekse de idamesi sırasında kullanılan malzemeler açısından ekonomik olarak pahalı bir yöntemdir. Hücreler subkùltüre edildikçe miktarlarında artış olacağı için onların muhafaza edilmesinde kullanılacak serum, vasat ve ekipman miktarının artmasına neden olacaktır. Bu nedenle çalışmalarda kullanılan hücrelerden ihtiyaç fazlası olanlar dondurularak muhafaza edilirler.

Dondurularak muhafaza edilmede -70 °C ya da daha düşük ısı dereceleri kullanılır. Normalde dondurularak saklanan hücreler -70 °C'de yaklaşık 6 ay/1 yıl arası canlılıklarını muhafaza ederler. Daha uzun ve güvenli saklama ise -196 °C ısı veren sıvı azot içeren tanklarda olur. Bu amaçla dondurulan hücreler ilk olarak -70 °C'lik derin dondurucularda 1 gece saklandıktan sonra sıvı azot tanklarına kaldırılmalıdır. Dondurulma işlemi gerçekleştirilmeden mutlaka dondurulacak hücrelerin sterilite kontrolü yapılmalı ve bir kontaminasyon varsa o seri hücre atılmalıdır.

Hücreleri dondurularak saklanma metodu

Bu işlem için mutlaka gliserol veya dimetilsülfoksit (DMSO) gibi koruyucu maddeler kullanılmalıdır. En yaygın olarak kullanılan koruyucu madde DMSO'tir. Dondurma işlemi için şu basamaklar uygulanır.

1. Hücre kültür şişesinin vasatı hücrelerin bulunmadığı yüzeyden dökülür ve hücre yüzeyi PBS ile yıkanır.
2. Hücre yüzeyini örtecek şekilde tripsin solusyonu ilave edilerek 37 °C'lik etüve kaldırılır ve 5-10 dakika beklenir. Bu süre içinde tripsin hücreler arası bağ dokuyu eritecek ve hücreler tripsin çözeltisi içinde serbest hale geçecektir. Bu hücreler santrifüj tüpüne aktarılır.
3. Soğutmalı santrifüj ile 4 °C'de 1000 devirde 10 dakika santrifüj edilir.
4. Üstte kalan süpernatant atılır. Dipteki hücreler bir miktar hücre üretme vasatı ile sulandırılır ve hücre sayma kamerasında sayılır. En az 1,000,000 hücre/ml sayıda hücre olmalıdır. Son sulandırmada vasat içine %10 DMSO katılır ve 1-1.5ml porsiyonlar şeklinde küçük tüplere bölünür.
5. Küçük porsiyonlara bölünen hücre 4 °C ısıda, yani buzdolabından 1 saat tutulur. Daha sonra - 70 °C'lik derin dondurucularda muhafaza edilir.

Dondurulan hücrelerin çözülmesi ve başka bir yere nakledilmesi

Hücreler başka bir laboratuvara dondurulmuş halde nakledilecekse mutlaka sıvı azot içeren kaplar içinde nakledilmelidir. Diğer bir yöntem ise hücrenin üretildiği şişeyi tamamen vasat ile doldurularak nakletmedir. Böylece oluşabilecek herhangi bir sarsıntıda vasatın çalkalanarak hücreyi kaldırması önlenmiş olur.

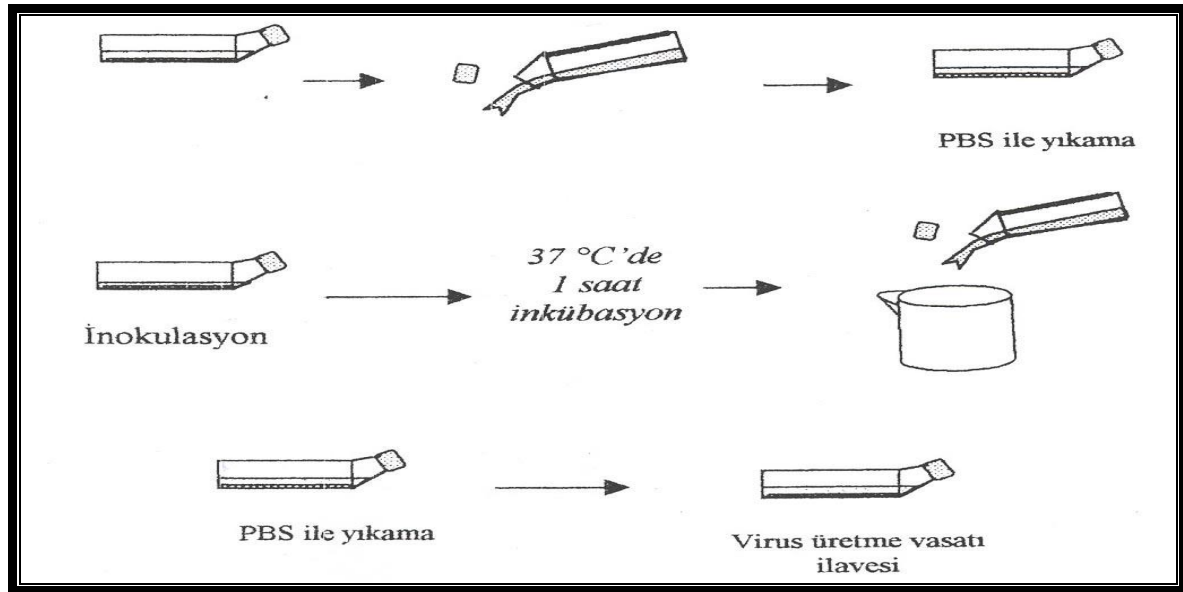
DOKU KÜLTÜRLERİNE EKİM YÖNTEMLERİ:

Genellikle klinik numunelerde süpheli materyal içinde olduğu varsayılan viruslar çeşitli tiplerdeki doku kültürlerine duyarlıdır. Virus izolasyonunda kullanılacak doku kültürleri, sağlıklı hücrelerden ve taze hazırlanmış olmalı ve tüm hücreler inokulasyondan önce doku kültürü mikroskobu altında kontrol edilmeli, %80-85'in üzerinde monolayer olmuş hücreler inokulasyonda kullanılmalıdır. İnokulasyonlarda mutlaka hücre kontrol kullanılmalıdır. Böylece inokule edilmiş hücre ile inokulasyon yapılmamış hücre karşılaştırılarak bir virus üremesi var ise hücrede neden olduğu sitopatolojik etkiyi (CPE) daha iyi gözlemlemek mümkün olacaktır. Ayrıca inokulasyon yapılacak hücrelerde bakteriyel kontaminasyon olmamalıdır. Yine ekim yapılacak hücrelerin endojen bazı viruslar (non sitopatojen BVDV) ile kontamine olmaması şarttır. Doku kültürlerine ekim yöntemleri **adsorbsiyona bağlı** ve **adsorbsiyona bağlı olmayan** ekim yöntemleri olmak üzere iki türlü yapılır.

1. Adsorbsiyona bağı ekim yöntemi:

Genelde infektivite gücü düşük virusların üretilmesi için kullanılan bir ekim yöntemidir. Bu yöntemin basamakları şunlardır:

- Kontrolü yapılacak her inokulum için iki hücre kültürü alınır. Bunlardan bir tanesi hücre kontrol için diğer hücre kültürü ise inokulum ya da virus ekmek için kullanılır. Alınan bu iki hücre kültürünün vasatları, şişelerin hücre olmayan kısımlarından dökülür. Her iki kültürdeki hücreler bir miktar PBS ile yıkanarak hücre üremesi esnasında oluşan metabolizma artıkları uzaklaştırılır.
- Kontrol için alınan hücre kültürüne hücre kültürü şişesinin hacminin %1'i oranında hücre üretme vasatı, virus ekimi için alınan hücre kültürlerine ise hücre kültürü şişesinin hacminin %1'i oranında virus inokule edilir (50 ml lik bir şişeye 0.5 ml virus).
- Her iki şişe de 37 °C'lik etüve kaldırılır. Burada 1 saat inkube edilir. Bu sırada 10-15 dakika aralıklarla şişeler hareket ettirilerek virusun hücre tabakasının her tarafına yayılmasına yardım edilir.
- İnokulasyon sonunda her iki şişedeki vasat ve inokulum atık kabına dökülür. Hücre yüzeyleri PBS ile yıkanır.
- Daha sonra hücre kontrol ve virus ektiğimiz kültür şişeleri üzerine şişe hacimlerinin %10' u kadar vasat ilave edilir. Bu vasat serumsuz olmalıdır.
- Her iki kültür şişesinde 37 °C'lik etüve kaldırılır. Her gün doku kültürü mikroskopunda CPE kontrolleri yapılır (Şekil 11).



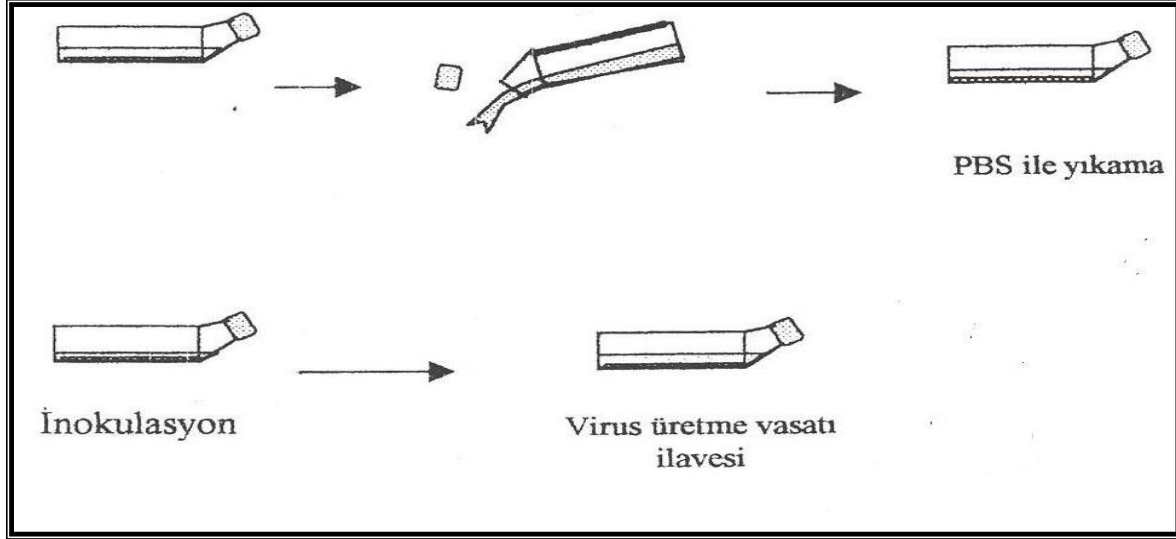
Şekil 11. Adsorbsiyona bağı ekim yöntemi (Kaynak: Yeşilbağ K' in Viroloji Laboratuvar Uygulamaları Teksiri)

2. Adsorbsiyona bağı olmayan ekim yöntemi:

Daha çok infektivitesi yüksek virusların üretilmesi içi kullanılır. Basamakları şunlardır

- Öncelikle her inokulum için iki hücre kültürü alınır. Bunlardan bir tanesi hücre kontrol için, diğer hücre kültürü ise inokulum ya da virus ekmek için kullanılır. Önce her iki hücre kültürünün vasatları, şişelerin hücre olmayan kısımlarından dökülür ve bir miktar PBS ile yıkanarak hücre üremesi esnasında oluşan metabolizma artıkları uzaklaştırılır.

- b. Kontrol için alınan hücre kültürlerine hücre kültür şişesi hacminin %1' i oranında hücre üretme vasatı, virus ekimi için alınan hücre kültürlerine ise hücre kültür şişesi hacminin % 1'i oranında virus inokule edilir.
- c. Daha sonra hücre kontrol ve virus ektiğimiz şişeler üzerine şişe hacminin %10' u kadar vasat ilave edilir. Bu vasat serumsuz olmalıdır.
- d. Her iki şişede 37 °C'lik etüve kaldırılır. Her gün doku kültürü mikroskopunda CPE kontrolleri yapılır (Şekil 12).



Şekil 12. Adsorbsiyona bağlı olmayan ekim yöntemi (Kaynak Yeşilbağ K' in Viroloji Laboratuvar Uygulamaları Teksiri)

Doku kültürlerinde virus üremesinin saptanması:

Bir çok virus inokule edildikleri hücre kültürlerinde karakteristik hücresel değişiklere neden olur. Virusun hücrenin form ve yapısında meydana getirdikleri değişikliklere **sitopatik etki (cytopathic effect=CPE)** denir. Virusların CPE oluşturma oranları ve bulguları, inokule edildiği hücre kültürü çeşidine, virusun konsantrasyonuna, virusun kimyasal özelliklerine, hücre kültürünün taze ve genç oluşuna ve kullanılan vasata göre değişir. Tüm bunların uygun şartlarda olması CPE oluşumunu pozitif etkiler. Uygun vasatın kullanılmaması, yüksek veya düşük ısıda inkube edilmesi, hücrenin uygun olmaması ve hücrelerin eski ya da yaşlı olması da CPE oluşumunu negatif etkiler.

Viruslar hücre kültürlerinde üreme oluşturmalarına göre **sitopatojen, proliferatif** ve **non-sitopatojen viruslar** olarak üç grupta toplanır.

1- Çoğalmaları sırasında sitopatik etki oluşturan (sitopatojen) viruslar: CPE oluşturarak üreyen viruslar hücrede sitoplazmada ve hücre çekirdeğinde çeşitli değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler şunlardır:

♦ **Hücre erimesi (lisis):** Hücre membran bütünlüğü kaybolur ve hücre dışındaki sıvıların adsorbsiyonuna izin verir. Böylece hücre şişip gerilerek açılır. Hücre lizisi hücre içindeki

infektif partiküllerinin salınmasına izin verir. Domuz vebası virusu bu tarzda bir enfeksiyon oluşturur.

♦ *Hücrelerin yuvarlaklaşması*: Monolayer hücreler birbirleri ile bağlıdır. Bir çok virus üremesinde bu hücrelerin şekli birbirlerinden ayrılır, büyümeler ya da küçülmeler şekillenir ve sonuçta hücrede yuvarlak görünüm ile karakterize bir CPE oluşur. Adenovirus, rhinovirus ve polioviruslar bu tarz CPE oluştururlar.

♦ *Granüllü oluşumu*: Bazı virusların üremeleri sırasında hücre sitoplazmasında granül oluşumu ile karakterize CPE oluşumu görülür. Enfeksiyonun erken dönemlerinde granülasyon oluşumunun yaygın olduğu daha sonra ise yavaşladığı bildirilmiştir. Bu granüller boyandıkları zaman mikroskopta koyu noktalar halinde görünürler. Adenovirus, parvovirus ve poxvirus enfeksiyonlarında bu tarz CPE oluşumuna sık rastlanır.

♦ *Vakuol oluşumu*: Enfekte hücrenin sitoplazmasında hücrelerin genişlemesi, köpüksü ve balonumsu görünen bir CPE oluşurmasıdır. Sitopatojen BVD virusu bu tarzda CPE oluşturur.

♦ *Sinsityum ve dev hücresi oluşumu*: Birçok virus hücre kültürlerinde ürerken hücre sitoplazmasında birçok hücre çekirdekçisini kapsayan bir hücre görüntüsü oluşturur. Bu çekirdekçik miktarları bazen sayı olarak yüzün üzerine çıkabilir ve **dev hücreleri** olarak isimlendirilirler. Sinsityumun virüs ile enfekte hücrelerin füzyon yolu ile enfekte olmamış hücrelerle birleşmesi sonucu olduğu düşünülmektedir. Enfekte olan ve olmayan hücre birleşirken aradaki hücre duvarı erir ve hücreler birleşir. Bu tarzda CPE oluşturan viruslara RSV örnek olarak verilebilir.

♦ *Inklüzyon cisimcikleri*: Hücrede virus komponentlerinin kümelenmesi sonucu şekillenen cisimciklerdir. Ya hücre sitoplazmasında (intrasitoplazmik) ya da çekirdek içinde (intranükleer) şekillenirler. İntranükleer inklüzyon cisimcikleri A, B, C tipi olmak üzere 3 kategoriye ayrılır. *Kuduz virusu, herpesvirus, adenovirus ve papovavirus* hücre kültürlerinde inklüzyon cisimciği oluşturan viruslara örnek verilebilir.

CPE oluşturarak üreyen viruslar aynı zamanda hücre çekirdeğinde de bir takım değişikliklere neden olabilir. Bu değişiklikler, çekirdek zarında hiperkromazi, çekirdeğin parçalanması, (piknoz), çekirdekçiğin büyümesi, kromatinde parçalanmaları içerir (Şekil 13).

Virusların neden olduğu CPE, bakteriler, mantarlar ile kontaminasyon sonucu ya da toksik etki sonucu oluşan non spesifik CPE'lerden mutlaka ayırt edilebilmelidir.



Şekil 13. Hücre kültürlerinde CPE oluşumları (Soldan sağa sırasıyla RSV tarafından sinsityum oluşumu (Kaynak: <http://virology-online.com/viruses/RSV6.htm>), Enterovirus tip 71 tarafından hücrelerde şişme balon oluşumu tarzında CPE, HSV tarafından oluşturulan CPE (Kaynak: <http://virology-online.com/viruses/RSV6.htm>)

2- Çoğalmaları sırasında proliferatif etki yapan viruslar: Virus üremesi esnasında hücrelerin tabakalar şeklinde üst üste kümelenmesine proliferatif etki denir. Bu hücre kültürünün belli bir kısmında olabileceği gibi yaygın olarak da şekillenir. Onkojen olmayan yani tümör oluşumuna sebep olmayan virus üremesi sonucu şekillenen proliferatif etki ve onkojen viruslar tarafından oluşturulan virus üremesi olmak üzere iki farklı proliferatif etki tarzında virus üremesi şekillenir. Onkojenik olmayan viruslar tarafından oluşturulan virus üremesi yuvarlak koyu görünümde ve iç yapıları kaybolmuştur. Proliferasyon sonucu üst üste gelerek toplanan hücreler diğerlerinden kolaylıkla ayırtedilebilir. *Variolavirus* bu tarzda etki oluşturur. Onkojen virusların oluşturduğu proliferasyon odakları ise daha düzensizdir. Adenovirus ve papovavirusları bu tarzda proliferasyon oluşturan viruslara örnek gösterebiliriz.

3- Sitopatik etki yapmadan çoğalan (nonsitopatojen) viruslar: Virusların birçoğu doku kültüründe morfolojik değişiklik yapmadan çoğalır. Bu viruslara **sitopatojenik olmayan viruslar veya nonsitopatojen viruslar** denir. Bu tür virusların hücre kültürlerinde oluşturdukları üreme mikroskopik olarak görülemez. Sitopatojen olmayan virusların tespit edilmesinde aşağıdaki yöntemler kullanılabilir:

A. Hemadsorbsiyon testi: *İnfluenzavirus* ve *Parainfluenzaviruslar* bazen hücre kültürlerinde CPE oluşturmadan üreyebilirler. Bu viruslar kırmızı kan hücrelerine yani eritrositlere karşı affinite gösteren hemaglutinin yüzey proteini taşıdıklarından hemadsorbsiyon testi ile tespit edilebilirler.

Hemadsorbsiyon testinin yapılışı:

a- İki adet hücre kültürü alınır. Bu hücre kültürlerinden biri kontrol olarak kullanılır diğerine ise virus ya da sitopatojen olmayan bir virus taşımasından şüphe duyulan inokulum ekilir ve 37 °C'de birkaç gün süre ile inkube edilir.

b- Süre sonunda hücre kültürlerinin vasatları dökülür ve PBS solusyonu ile hücre yüzeyi yıkanır. Daha sonra taze hazırlanmış %0.5-1 lik eritrosit süspansiyonundan kontrol ve virus ekilmiş hücrelerin üzerine konur. +4 °C'de 30 dakika ya da oda ısısında 5-10 dakika beklenir ve test sonucu değerlendirilir.

c- Eğer inokule ettiğimiz virus ya da inokulum hemaglutine etme özelliğine sahip ise eritrositler kümeler şeklinde toplanacaktır. Kontrol hücrede ise virus bulunmadığından her hangi bir kümeleşme olmayacaktır. Hemadsorbsiyon testi mutlaka +4 – 22 °C arasında bir ısı derecesinde yapılmalıdır. Çünkü 37 °C'de eritrositler elusyona uğrar.

B. İmmunfloresan testi: Non-sitopatojen virusların teşhis edilmesinde kullanılan önemli bir yöntemdir. Bu amaçla floresan boyalarla işaretlenmiş ve konjugat olarak tanımlanan antikorlar ile antijenlerin birleşmesi ve bu birleşme sonucu floresan ışımaların tespit edilmesi esasına dayanır. Bu amaçla sonuçları floresan mikroskopta değerlendirilir.

Testin yapılışı:

a- Özel doku kültürü lamellerinde üretilen hücre kültürlerine şüpheli inokulum ya da virus ekilir. 37 °C'de birkaç gün inkube edilir.

b- Daha sonra lameller üzerine titresi bilinen konjugattan ilave edilir.

c- Floresans mikroskop altında kontrol edilir. Eğer non sitopatojen virüs floresan ile işaretli antikör ile homolog ise, virus konjugatla birleşecek ve floresan nedeniyle yeşil renkte ışıma verecektir.

C-İnterferens: CPE oluşturmeyen bazı virusları içerdiği düşünülen şüpheli materyalden hazırlanmış inokulumda virus varlığını tespit etmek amacıyla sitopatojen olduğu bilinen ikinci bir virus, aynı hücre kültürüne inokule edilir. Bu durumda ilk virus ikinci virusun üremesini bloke edecek durduracaktır. Bu olay **interferens** olarak tanımlanır. Örneğin *Rubellavirus* Vero hücre kültürlerinde CPE göstermeden ürer. Bu virusun varlığını tespit etmek amacı ile rubellavirus inokule edilmiş hücre kültürünün üzerine CPE oluşturduğu bilinen *Echovirus tip 11* ilave edilir. Bu işlem sonucunda iki virus arasında oluşacak mücadele sonunda (challenge) *Rubellavirus*, *echovirusun* üremesini bloke edecek ve hücre kültürlerinde CPE oluşmayacaktır. İnterferens mekanizması için önemli diğer bir örnek ise sığırların BVD enfeksiyonu verilebilir. BVDV sitopatojen ve sitopatojen olmayan iki şuşa sahiptir. Sitopatojen olmayan BVDV şuşunu teşhis etmek amacı ile CPE oluşturduğu bilinen kanatlıların NCDV’u (NewCastle Disease Virus) kullanılır. Bu sitopatojen olmayan BVDV virus NCDV’nin CPE oluşturmaya engel olacaktır. İnterferens testin basamakları aşağıdadır:

a- Sitopatojen olmayan virus doku kültürlerine inokule edilir. 37 °C’de birkaç gün inkube edilir.

b- Daha sonra virus üretme vasatı dökülür. PBS ile hücre yüzeyi yıkanır.

c- Daha sonra sitopatojen olduğunu bildiğimiz ikinci bir virus aynı hücre kültürü şişesine ekilir. Üzerine virus üretme vasatı ilave edilir.

d- 37° C’ lik etüve kaldırılan şişeler her gün mikroskopla kontrol edilir. Eğer ilk virus nonsitopatojen bir virus ise ikinci virusun üremesini bloke edecektir.

Bu teknik özellikle *Rubellavirus*, *Influenzavirus*, ve *BVDV* teşhis edilmesinde çok kullanılan bir yöntemdir.

D- Elektron mikroskop: Bu yöntemle virusların temel morfolojik özelliklerini rahatlıkla ortaya koyabiliriz. Elektron mikroskobu tekniklerinin en büyük avantajı virusların görüntülenebilmesidir. Ancak elektron mikroskop cihazı pahalı olması nedeni ile her laboratuvarında bulunmaz bu nedenle kullanımı sınırlıdır.

E- İmmunperoksidaz testi: Prensipte olarak immünfloresans testine benzer. Eğer hücre kültürlerine inokule ettiğimiz şüpheli materyal ya da virus sitopatojen karakterde değil ise virusa spesifik peroksidaz enzimi ile işaretlenmiş konjugat ve kromajen madde substrat ile işaretlenir. Eğer hücrede CPE oluşturmeyen bir virus var ise hücreler kırmızı veya kahverengi renk alacaktır.

İnfekte doku kültürlerinden virus materyalinin elde edilmesi:

Doku kültürlerinde üreyen virus materyalinin elde edilmesi için şu basamaklar uygulanır.

1. Virus üreyen hücre kültürü şişeleri -20 °C’lik derin dondurucuya kaldırılarak dondurulur. En az iki saat süre ile beklenir.

2. Daha sonra 37 °C’lik su banyosunda hemen çözülür. Bu dondurma çözme işlemi iki kez daha yapılır. Böylece hücrelerin iyice parçalanarak virusun vasata karışması sağlanır.

3. Çözülen virus içeren vasat tüpe aktarılır. Soğutmalı santrifüj kullanılarak 4 °C'de 3000 devirde 30 dakika santrifüj edilir.
4. Üstte kalan süpernatant viruslu süspansiyondur ve küçük miktarlara bölünerek – 20 °C'de saklanır.

Kör pasaj ya da boş pasaj:

Laboratuarlara uygun koşullarda getirilerek hazırlanan inokulumlar hücre kültürlerine inokule edilerek virus izolasyonuna gidilir. Hücre kültürlerine inokule edilen bu şüpheli materyalin, doku kültürü mikroskobu ile her gün kontrolü yapılır. Bu işlem yaklaşık yedi gün devam eder. Bu süre sonunda CPE oluşsada oluşturmasada ekim yapılan hücre kültürü şişeleri – 20 °C'lik derin donduruculara kaldırılarak dondurulur ve çözülür. Daha sonra 3000 devirde 30 dakika santrifüj edilir. Süpernatant alınır ve taze hücre kültürlerine yeniden ekilerek pasajlanır. Bu işleme “**kör pasaj**” ya da “**boş pasaj**” denir. Bunun nedeni şüpheli materyalimizin virus taşıdığının kesin olarak bilinmemesidir. Kör pasaj üreme şekillenmese bile en az üç kez tekrarlanmalıdır. Bu pasajlar sonunda üreme görülmeyen hücreler negatif kabul edilir.

Kimyasal yöntemle infekte doku kültürlerinden viruslu materyalin elde edilmesi:

Kimyasal maddelerle hücre parçalanması genellikle alkali ekstrasyon metotları ile olur. Bu amaçla;

- ◆ Virus üretme vasatı steril bir kaba alınır
- ◆ Hücre yüzeyi PBS ile yıkanır
- ◆ Hücreler üzerine pH değeri 9.5 olan glisin buffer konur
- ◆ Oda ısısında 30 dakika inkubasyona bırakılır
- ◆ Inkubasyon sonrası, vasat tüplere alınarak +4 °C'de 3000 devirde 30 dakika santrifüj edilir
- ◆ Üstte kalan süpernatant viruslu süspansiyondur ve küçük miktarlara bölünerek – 20 °C'de saklanır

3- VİRUSLARDA İNFEKSİYÖZİTE GÜCÜNÜN TESPİT EDİLMESİ

3.1. Viruslarda Titrasyon

Virusların infektivite gücüne **titre**, virusun infektivite gücünün tespit edilmesine ise **titrasyon** denir. Virolojik çalışmalarda ya da çeşitli amaçlarda kullanılacak virusların infektivite gücü (titre) mutlaka hesaplanmalıdır. Viruslarda infeksiyözite gücünü tespiti *in vivo* ve *in vitro* sistemler kullanılarak yapılır.

İnfeksiyözite gücünün kantitatif olarak tayininde süspansiyonda bulunan virus partiküllerinin tümü değil daima infeksiyöz virus birimi tespit edilir. Titrasyon amacı ile çeşitli dilusyon sıvıları kullanılarak virus sulandırılır. Bu amaçla virus log₁₀ tabanına göre sulandırılır. Bu sulandırmalar *in vivo* ortamlarda embriyolu tavuk yumurtası, deneme hayvanları *in vitro* ortamlarda ise hücre kültürlerine inokule edilirler ve yapılan her bir dilusyon infekte ya da infekte değil olarak değerlendirilir. Değerlendirmede CPE oluşumu ya da ölüm göz önüne alınır. Viral titre olarak konakçıların %50'sini infekte eden değer hesaplanır. Eğer titrasyon deneme hayvanlarında yapılmışsa viral titre deneme hayvanlarının %50'sini öldüren doz yani **letal doz₅₀ (LD₅₀)**, doku kültürlerinde yapılan bir titrasyon ise, viral titre doku kültürlerinde en az %50 oranında CPE görülen değer olan **doku kültürü infektif doz₅₀ (DKID₅₀)** olarak

ifade edilir. İndikatör sistem olarak yumurtalar titrasyonda kullanılacaksa, bu değer **embriyolu yumurta infeksi doz₅₀ (EYID₅₀)**dir.

Titrasyon deneylerinin virolojide kullanım alanları ise şunlardır:

- 1- Nötralizasyon testinde kullanılan virusun standardizasyonunda
- 2- İnaktivasyon kinetiğinde
- 3- Aşı hazırlanmasında
- 4- Virus izolatlarının identifikasyon ve sınıflandırmasında.

A-İn vivo sistemlerde titrasyon

Bu amaçla deney hayvanları ve embriyolu tavuk yumurtaları kullanılmaktadır. Bu şekilde yapılan titrasyon testlerinde ise titre **LD₅₀** ve **EYID₅₀** olarak hesaplanır.

1- Deney hayvanlarında titrasyon: Bu amaçla kullanılacak hayvanlar ya çok genç olmalı ya da çok yaşlı hayvanlar olmalıdır. Çünkü bu yaş grubu hayvanlar infeksiyon hastalıklarına daha duyarlıdır. Seçilen hayvanlar sağlıklı olmalı, uygun inokulasyon yolu kullanılmalı ve uygun inokulum miktarı verilmelidir. İnokulasyon yolları olarak periton içi, damar içi, deri altı, kas içi ve ayak tabanı seçilebilir. Bu yöntemle titrasyon yaparken:

- a- Virus log₁₀ tabanına göre sulandırılır (10⁻¹ ile 10⁻¹⁰ arası).
- b- Her sulandırma basamağı için ve kontrol için dörder adet deney hayvanı seçilir. Bu deney hayvanlarına her sulandırma basamağından eşit miktarda inokulasyon yapılır. Kontrol hayvanlarına ise inokulasyon yapılmaz. Her sulandırma basamağı için seçilen hayvanlar ayrı kafeslere konur.
- c- Her gün kontrol edilirler.
- d- Sonuçta kontrol olarak ayrılan hayvanlarda ölüm olmayacaktır. Sulandırılmış virusun inokule edildiği hayvanlardan yarısının öldüğü değer bize virusun titresini **LD₅₀** olarak verir.

2-Embriyolu tavuk yumurtalarında titrasyon: Bu metotla yapılan titrasyon doku kültürlerinde ya da deneme hayvanlarında yapılan titrasyonlara benzer.

- a- Virus log₁₀ tabanına göre sulandırılır (10⁻¹ ile 10⁻¹⁰ arası)
- b- Her sulandırma basamağı için ve kontrol için dörder adet ETY seçilir. Bu yumurtalara her sulandırma basamağından eşit miktarda inokulasyon yapılır. Kontrol yumurtalarına ise inokulasyon yapılmaz.
- c- Titrasyonda kullanılan bu yumurtalar inkube edilirler ve her gün canlılık açısından kontrol edilirler.
- d- Sonuçta kontrol olarak ayrılan yumurtalarda ölüm olmayacaktır. Sulandırılmış virusun inokule edildiği ETY'nin yarısını öldüren değer bize virusun titresini **EYID₅₀** olarak verir.

B- İn vitro sistemlerde titrasyon

Hücre kültürleri kullanılarak yapılan titrasyondur. İn vitro sistemlerde titrasyon makrotitrasyon ve mikrotitrasyon olmak üzere ikiye ayrılır.

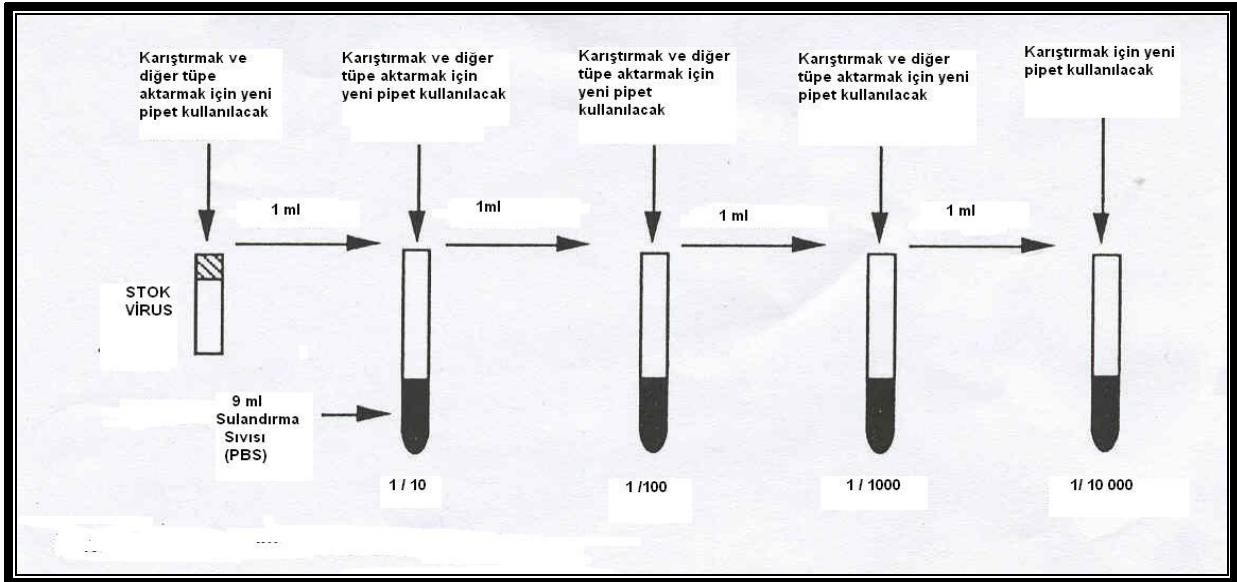
A- Makrotitrasyon

Testin yapılışı aşağıdaki basamakları içerir.

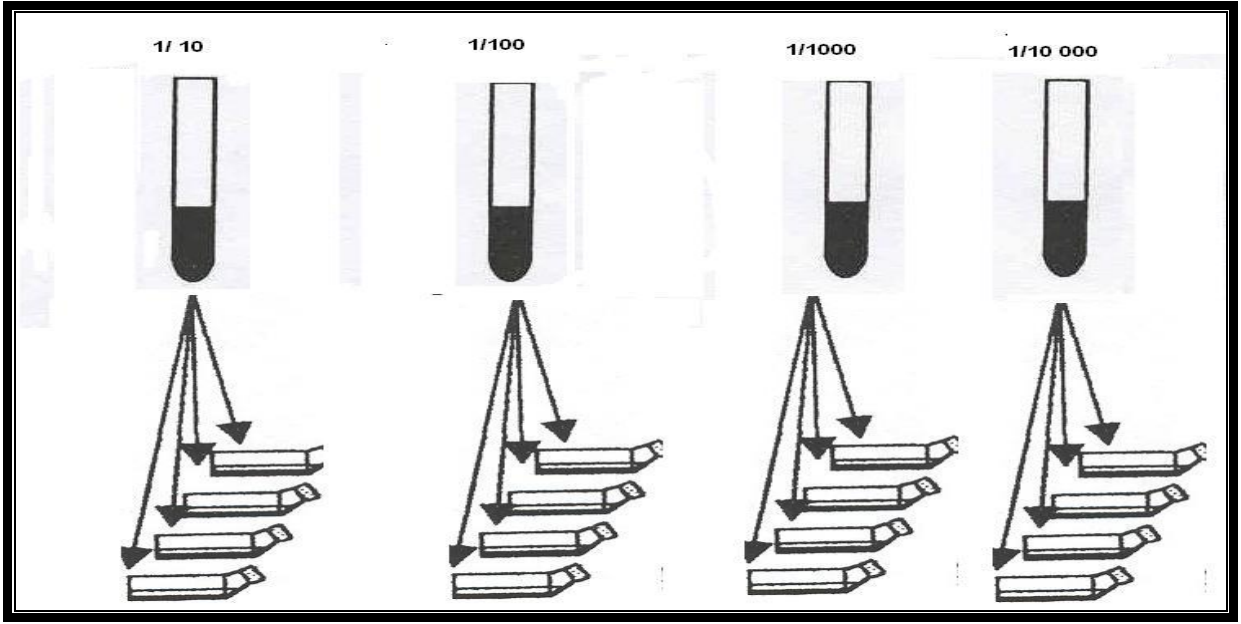
1- İlk olarak stok virusun \log_{10} tabanına göre bir seri sulandırılması yapılır (Şekil 14). Bu amaçla 5 adet steril deney tüpü alınır. Tüplerin içine 9 ml PBS solusyonu konur. Daha sonra stok virustan 1 ml alınır ve ilk tüpe konur. Daha sonra pipet değiştirilir ve yeni bir pipet ile ilk tüpe virus sulandırma sıvısının içine homojen dağılacak şekilde karıştırılır. Elde edilen sulandırma oranı 1/10 dur. Bu karışımdan 1 ml çekilir ikinci tüpe aktarılır ve pipet değiştirilerek ikinci tüpte pipetasyon işlemi yapılır. Bu tüpte elde edilen sulandırma oranı 1/100 dür. Bu işlem son tüpe kadar yapılır. Son tüpten 1 ml dışarı atılır.

2- Daha sonra her sulandırma basamağından daha önceden hazırlanmış dört adet doku kültürüne ekim yapılır (Şekil 15). Stok virustan sulandırma yapılmadan virus kontrol için dört doku kültürüne ekilir. Hücre kontrol için ayrılan doku kültürlerine ise sadece hücre üretme vasatı konur.

3- Doku kültürleri, 37° C ısıya sahip etüvlere kaldırılır. Her gün doku kültürü mikroskobu ile kontrol edilir. Sonuçlar Reed-Muech veya Spearman Kaerber metoduna göre değerlendirilir.



Şekil 14. Virus titrasyonu için sulandırma tekniği (Burleson GF'nin Virology, A laboratory Manual kitabından alınmış ve değiştirilmiştir).



Şekil 15. Makro Titrasyon (Burlson GF'nin Virology, A laboratory Manual kitabından alınmış ve değiştirilmiştir).

B-Mikrotitrasyon:

Testin yapılışı aşağıdaki basamakları içerir. Bu test için mikrotitrasyon tablaları kullanılır.

1- İlk olarak stok virus \log_{10} tabanına göre sulandırılır (Şekil 16) Bu amaçla 4 adet steril deney tüpü alınır. Tüplerin içine 9 ml PBS solusyonu konur. Daha sonra stok virustan 1 ml alınır ve ilk tüpe konur. Daha sonra pipet değiştirilir ve ilk tüpte virus sulandırma sıvısının içine homojen dağılacak şekilde pipete ederek karıştırılır; bu 1/10 oranında bir sulandırmadır. Bu karışımdan 1 ml çekilir ikinci tüpe aktarılır; Pipet değiştirilir. İkinci tüpte pipetasyon işlemi yapılır, bu 1/100 oranında virus sulandırması elde etmemizi sağlar. Bu işlem son tüpe kadar yapılır. Son tüpten 1 ml dışarı atılır.

2- Daha sonra her sulandırma basamağı için mikrotitrasyon tablasında 4 kuyucuk seçilir. Her sulandırma basamağından her göze 0.1 ml konur. Virus kontrol için seçilmiş gözlere stok virustan 0.05 ml ve 0.05 ml virus üretme vasatı konur. Hücre kontrol için seçilmiş gözlere ise 0.1'er ml hücre üretme vasatı konur (Şekil 16)

3- Bu işlemler sonunda tüm gözlerin üzerine 0.05 ml hücre süspansiyonu dropper ile damlatılır. Mikrotitrasyon tablasının üzeri şeffaf steril bantla kapatılır ve 37 °C ısıya sahip etüvlere kaldırılır.

4- Her gün doku kültürü mikroskobu ile kontrol edilir. Sonuçlar Reed-Muech veya Spearmann- Kaerber metoduna göre değerlendirilir.

Mikrotitrasyon kullanılan malzemede ve harcanan zaman açısından oldukça ekonomik bir testtir.

Virüs titre değerinin Spearmann- Kaerber metoduna göre değerlendirilmesi:

Bu metoda göre viral titre aşağıda ki formüle göre hesaplanır.

$$\log_{10} \text{DIKD}_{50} = - [X_0 - D/2 + D(R/N)]$$

Bu formülde sembollerin açılımları:

X₀: İnokulasyon yapılan tüm konakçılarda pozitiflik görülen en düşük sulandırma değeri

D: $\log_{10} 10 = 1$

R: X_0 ve daha düşük sulandırma değerlerinde tespit edilen pozitifliklerin toplamı

N: Her sulandırma için kullanılan konakçı sistemi

Dilasyon	CPE
10^{-1}	:4 / 4
10^{-2}	4 / 4
10^{-3}	4 / 4
10^{-4}	3 / 4
10^{-5}	1 / 4
10^{-6}	0 / 4

ÖRNEK: Elimizde bulunan stok virusun mikrotitrasyon değerlendirme sonuçları aşağıdadır.

Buna göre virusun titre değeri nedir?

X_0 : 3, D : 1, R: 8, N: 4

$$\log_{10} \text{DIKD}_{50} = - [3 - 1/2 + 1 (8/4)] = - [2,5 + 2] = -4,5$$

$$\log_{10} \text{DIKD}_{50} = -4,5 \quad \text{DIKD}_{50} = 10^{-4,5} / 0,1 \text{ ml}$$

Virüs titre değerinin Reed –Muech metoduna göre hesaplanması:

Bu metoda göre DIKD_{50} hesaplanması, titrasyon testinde kullanılan tüm tüp ya da kuyucuk adedinden pozitif olan tüp ya da kuyucuk adedini çıkarmakla elde edilir.

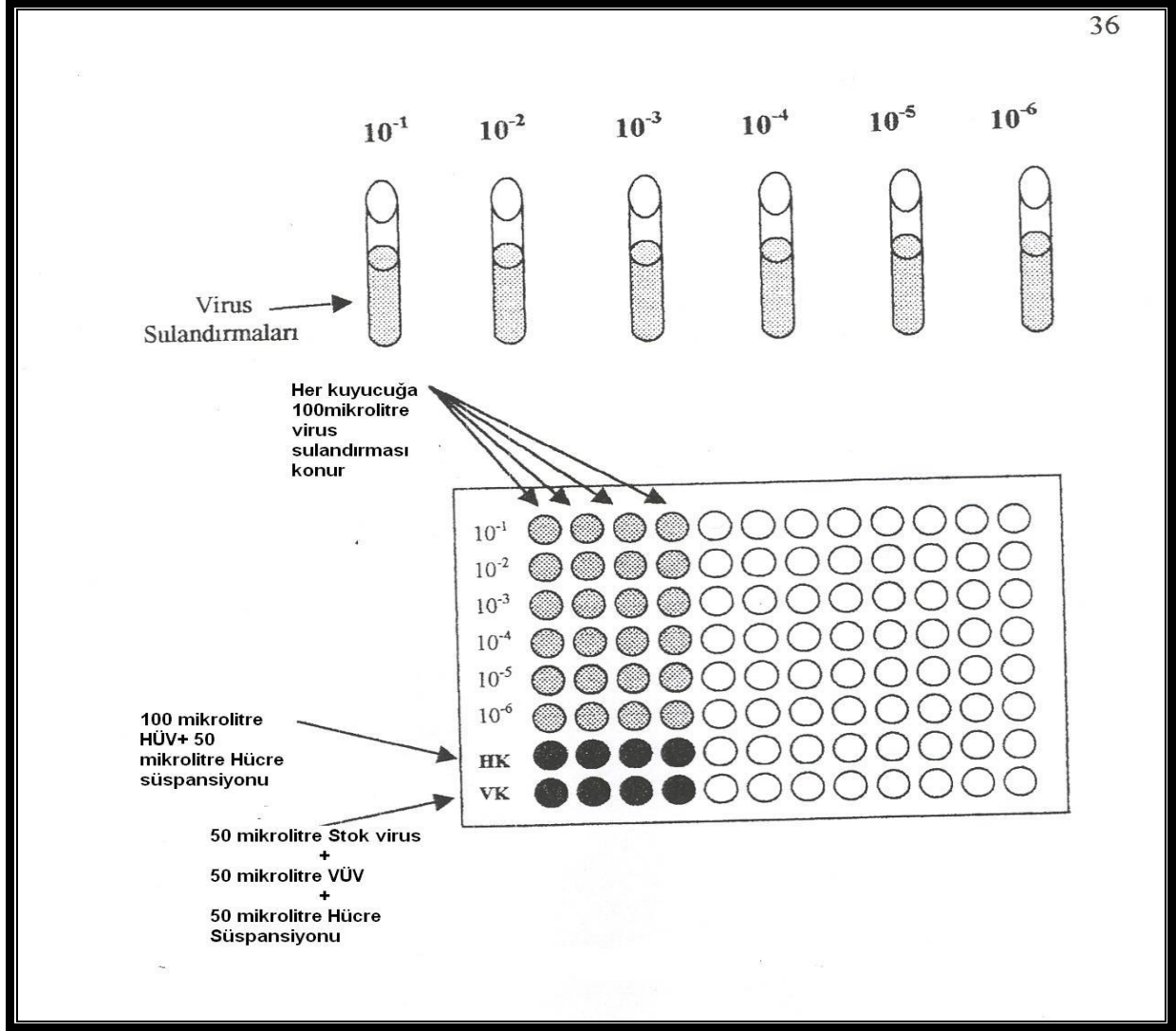
Formül:

$$\text{DKID}_{50} = \frac{\% 50 \text{ üzerinde CPE} - \% 50}{\% 50 > \text{CPE} - \% 50 < \text{CPE}}$$

ÖRNEK: Elimizde bulunan stok virusun mikrotitrasyon değerlendirme sonuçları aşağıdadır.

Buna göre virusun titre değeri nedir?

Virüs	<u>Hücre Kültür Sayısı</u>		<u>Toplam Hücre Kültür Sayısı</u>			
	CPE	CPE	CPE	CPE	CPE	CPE
CPE						
<u>Dilasyon</u>	<u>Görülen</u>	<u>görülmeyen</u>	<u>Görülen</u>	<u>görülmeyen</u>	<u>oranı</u>	<u>görülen</u>
<u>Kültür</u>						
10^{-3} : 4/4	4	0	9	0	9/9	100
10^{-4} : 3/4	3	1	5	1	5/6	83
10^{-5} : 2/4	2	2	2	3	2/5	40
10^{-6} : 0/4	0	4	0	7	0/7	0



Şekil 16. Mikrotitrasyon (Yeşilbağ K' in Viroloji Laboratuvar Uygulamaları teksirinden alınmış ve değiştirilmiştir).

$$DKID_{50} = \frac{\% 50 \text{ üzerinde CPE} - \% 50}{\% 50 > CPE - \% 50 < CPE} = \frac{83 - 50}{83 - 40} = \frac{33}{43} = 0,7$$

Bu değer bulunduktan sonra titre değerlerini okurken % 50 CPE oranının üzerinde yer alan sulandırma basamağı hangisi ise o değer alınır.

$$(-4) + (0,7 - x - 1,0) = -4 + -0,7 = -4,7 = DKID_{50} = 10^{-4,7}$$

3.2. Plak Test

Virusların çoğu in vitro sistemlerde CPE oluşturur. Bazı viruslar ise in vitro sistemlerde CPE oluşturmada ürerler ve sadece hücre kültürlerinde bulunan sıvı vasat içinde tespit edilebilir. Bu viruslar aynı zamanda agar, agaroz gibi katı vasatların kullanıldığı hücre kültürlerinde oluşturdıkları plaklar ile tespit edilir.

İnfekte hücre kültürlerinde virus üremesi nedeniyle oluşan sınırlı boşluklar **“plak”** olarak tanımlanır. Bu yöntemle virus süspansiyonu içinde yer alan infektif virus partikülü miktarını hesaplayabiliriz. Plak test, titrasyon amacıyla kullanıldığı gibi virus izolasyon ve saflaştırma amacı ile de kullanılabilir.

İnfekte hücre kültürlerinde viruslar **litik**, **dejenaratif** ve **proliferatif** olmak üzere üç çeşit plak oluşturur. Litik plaklar ortalarının boş olması, dejenaratif plaklar ortalarının dejenere olmuş hücrelerle dolu olması, proliferatif plaklar ise ortalarının yoğun hücre proliferasyonu ile dolmasıyla karakterizedir. Virusların oluşturdukları plaklar renksizdir ve vital boyaları almazlar. Plak testin başarı ile çalışabilmesi için önemli faktörler vardır. Bunlar:

- 1- Plak test amacı ile hazırlanan hücreler sağlıklı olmalı her hangi bir kontaminasyon bulunmamalıdır.
- 2- İnokulasyon yapılacak virusun plak oluşturma özelliği olmalıdır.
- 3- Plak sayısı virus dozu ile doğru orantılı olarak artmalıdır.
- 4- Plak oluşumu spesifik immun serumlarla durdurulabilmelidir.
- 5- Aynı virusla yapılan testler aynı sonucu vermelidir.
- 6- Plaklar her zaman agar döküldükten sonra kısa bir zaman diliminde oluşmayabilir. Bazen çok daha uzun süreli boyamalar gerekebilir.
- 7- Kullanılacak boyaların mutlaka konsantrasyonu iyi ayarlanmalıdır. Çok konsantre boyaların kullanılması plak görünümüne engel olabilir.

Testin yapılışı

Plak testin yapılması için hücreler genellikle steril petrilere üretilir. Testin yapılış basamakları aşağıda verilmiştir.

- 1- Virus Log₁₀ tabanına göre tüplerde sulandırılır.
- 2- Her sulandırma basamağı için 2 adet hücre üretilmiş petri seçilir ve işaretlenir.
- 3- Bu petrilere her sulandırma basamağından adsorbsiyona bağlı ekim tekniği kullanarak ekim yapılır ve ekim yapılan petrilere 37 °C 'lık etüvlere kaldırılır ve 1 saat inkube edilir.
- 4- Bu süre sonunda 2X Earlie + %1.8-2 Noble Agar karışımı virus üretme vasatı olarak hücrenin üzerine ince bir tabaka şeklinde yayılır.
- 5- Petrilere tekrar etüve kaldırılır. Plak oluşumları mikroskop altında gözlemlenir. Plakların daha iyi görünmesi için nötral red ile boyama yapılır. Sonuç plaklar sayılarak Plak formasyon Unite (PFU) olarak hesaplanır. Basit hesaplamada 10 plak oluşumu ve üzeri değerlendirilir.

Dilasyon	Plak Sayısı
10 ⁻¹	ÇOK
10 ⁻²	ÇOK
10 ⁻³	120
10 ⁻⁴	80
10 ⁻⁵	2
10 ⁻⁶	0

$$80 \times 1 / 10^{-4} \times 0,1 \text{ (ekilen virus miktarı)} : 8,0 \times 10^{-5} \text{ PFU}$$

4-VİROLOJİDE KULLANILAN FİZİKSEL VE KİMYASAL İDENTİFİKASYON KRİTERLERİ

Şüpheli bir materyalden virus izolasyonu yapıldığı zaman virusun tanımlanması gerekmektedir. Bunun içinde kullanılan bir çok kriter vardır. Bu kriterleri tek tek yerine getirilerek virusun identifikasyonu gerçekleştirilir. Bu amaçla izolasyonu yapılan virus üzerinde bir dizi test yapılır. Bu testler aşağıda belirtilmiştir.

1- Nükleik Asit tayini: Viruslar genom olarak nükleik asit olarak ya DNA ya da RNA içermektedirler. Bu nedenle izolasyonu yapılmış bir virusun identifikasyonunda ilk aşama taşıdığı nükleik asit tipini belirlemektir. Virusun taşıdığı nükleik asit tipi DNA sentezinin bloke edilmesi prensibine dayanan testler ile yapılır. Bu amaçla DNA içinde yer alan timidin bazının sentezini inhibe eden halojen preparatlar kullanılır. Bu preparatlar içinde en önemlileri **5'-iododesoxyuridine (5'-IUDR)**, **5' bromodesoxyuridine (5'-BUDR)** ya da **5' flouodesoxyuridin (5'-FUDR)** kullanılır. Bunlardan en etkili olanı IUDR preparatlarıdır fakat çok güç erimeleri dezavantaj teşkil etmektedir. Bu amaçla üç adet hücre kültürü alınır. Bunlardan birisi hücre kontrol olarak kullanılır. Bir hücre kültürüne nükleik asidi tayin edilecek virus inokule edilir ve üzerine yukarıda yazılı preparatlardan (5'-IUDR,5'-BUDR 5'-FUDR) biri bulunan virus üreme vasatı konur. Son hücre kültürüne ise yine nükleik asit tayini yapılacak virus inokule edilir ve üzerine normal virus üretme vasatı konur. Her gün üremeleri kontrol edilir. İçinde halojen preparatlar bulunan vasatı içeren hücre kültürlerinde **virus üremesi şekillenirse** nükleik asit tipi **RNA** olarak tespit edilir. Eğer **virus üremesi şekillenmezse** vasat içinde yer alan halojenlerin DNA sentezini bloke ettiği anlaşılır ve virusun **DNA** içerdiğine karar verilir.

2- Lipid eritici ajanlara karşı duyarlılığın tespiti: Özellikle zarf içeren virusların lipid eriticilerle muamele edilmesi o virusun infeksiyözite gücünün kaybolmasına neden olacaktır. Zarf içeren *Herpesviridae*, *Poxviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae*, *Coronaviridae* gibi virus familyalarında yer alan viruslar lipid eritici olan kloroform ya da özellikle eter ile muamele edildiklerinde infeksiyözite güçlerini kaybedeceklerdir.

3- pH hassasiyet testi: Virusların asit ya da alkali ortamlara duyarlılıklarını tespit etmek amacıyla pH hassasiyet testlerine yapılır. Bu testin yapılabilmesi amacı ile pH değerleri değişik vasatlar hazırlanır ve izolasyonu yapılan virus bu vasatlarla muamele edilerek infeksiyözite gücünün bloke edildiği pH değeri bulunur.

4- Virusların ısıya duyarlılığının saptanması: Virusların değişik ısı değerlerine karşı duyarlılığını saptamak amacıyla -60, -20, 4, 22, 37 ve 56 °C'lerde 30-60 dakika bekletilir. Daha sonra titrasyon testi ile infeksiyözite güçleri tespit edilir.

5- Filtrasyon tekniği kullanarak virusun büyüklüğünün tespiti: Virusun büyüklüğünün tespitinde ve bakterilerden ayırt edilmesinde kullanılır. Bu amaçla enjektör ya da porselen filitreler kullanılarak izole edilen virus süzülür ve hücre kültürlerine ekilir. Bu amaçla 220 nm lik filtre sistemleri kullanılır.

6- Çift değerli katyonlarla muamele edilme: Bu amaçla en çok 2M MgCl₂ kullanılır. Virus bu katyonla muamele edildiğinde infeksiyözitelerini korumaları ya da kaybetmeleri identifikasyon için önemli bir kriterdir.

Bunun dışında virusların identifikasyonunda tripsine olan duyarlılığının tespiti, elektron mikroskobu ve hemaglutinasyon testleride kullanılır.

5- VİRAL İNFEKSİYONLARIN LABORATUVAR TANISI

Bazı viral infeksiyonlarda klinik semptomlar ışığında tanı yapılabilir. Bu yolla tanıda epidemiyolojik kriterler, mevsim, yaş, cinsiyet önemli yer tutar. Örneğin kızamık ve alman kızamığı çocuklar için spesifik infeksiyonlardır. Grip ve nezle gibi respiratorik sistemin viral infeksiyonları ise daha çok kış mevsiminde oluşmaktadır. Bununla birlikte bir çok viral infeksiyona laboratuvar yöntemleri kullanılarak tanı konur. Bazen aynı klinik semptomlar birden fazla virus tarafından oluşturulabilir. Bu yüzden laboratuvar tanısı ile ayırıcı bir tanıya gerek vardır. Örneğin viral nedenli hepatitiser HAV, HBV, HCV, HDV, HEV tarafından oluşturulabildiği gibi herpesviridae familyasında olan *EpsteinBarrvirus* ve *Sitomegalovirus* tarafından da oluşturulabilir. Ayrıca farklı klinik semptomlarda tek bir virus tarafından oluşturulabilir. Sığırlarda infeksiyon oluşturan BHV-1 hem solunum sisteminde hem de genital sistemde infeksiyon oluşturabilir. Tüm bunların ışığı altında viral infeksiyonların laboratuvar tanısı:

- 1-Klinik semptomlar yoluyla tanı yapılamadığında
- 2- Benzer klinik semptomları gösteren viral infeksiyonların ayırt edilmesinde
- 3- Kronik infeksiyonların prognozunu takip edilmesinde
- 4- Viral tedavinin takip edilmesi
- 5- Viral infeksiyonların epidemiyolojik bulgularının tespiti için gereklidir.

Laboratuvar tanı yöntemleri

A- Direkt tanı

B- İndirekt tanı yöntemleri olarak iki ana grupta toplanır.

A- Direkt laboratuvar tanı yöntemleri

İnfeksiyona neden olan şüpheli materyalden virüsü direkt olarak tespit etmektir. Direkt tanı metotlarında şüpheli materyalden viral antijen;

- 1- in vitro sistemlerde üretilerek
- 2- in vitro sistemlerden üretilmeden tespit edilir.

Şüpheli materyalden viral antijeni üretmeden elektroforez, PCR, ELISA ve immunfloresans gibi çeşitli yöntemlerle yapılabilirdiği gibi, şüpheli materyalden viral antijenin üretilerek direkt teşhise de gidilebilir. Genel anlamda direkt tanı yöntemleri aşağıda özetlenmiştir.

1- Viral antijenin tespiti: Direkt tanıda viral antijen şüpheli materyali üreterek ya da üretmeden direkt olarak tespit edilebilir. Viral antijenin hücre kültürlerinde, deneme hayvanlarında ve embriyolu tavuk yumurtalarında üretilerek tanısı ve izolasyonu yapılabilir. Embriyolu tavuk yumurtaları virus izolasyonu amacıyla *Influenzavirus*, *Measlesvirusu*, *Mumpsvirus* *Rubellavirus*, kanatlıların New Castle enfeksiyonu (NCDV), koyunların mavidil hastalığı etkeni olan *bluetonguevirus vb.* için viral antijeni üretmede kullanılmaktadır. Deney hayvanları olarak virus izolasyon çalışmalarında yeni doğmuş fareler, gine domuzu, maymun kullanılmaktadır. Şüpheli virusun çeşitli yollardan inokulasyondan sonra hayvanda şekillenen klinik semptomlara göre ya da bu hayvanlardan elde edilen örnek ve dokuların çeşitli teşhis metotları ile test edilmesi ile izolasyon yapılabilir. Virus izolasyon çalışmalarında antijenin üretilmesinde en fazla hücre kültürleri kullanılır. Geleneksel olan ve altın standart olarak bilinen bu yöntem uzun zaman alması ve zahmetli nedeni ile rutin tanı laboratuvarları için uygun değildir. Ancak identifikasyon çalışmaları, birden fazla etiyolojik ajan içeren

epidemiyolojik çalışmalarda, eradikasyon çalışmalarında ve serolojik olarak identifikasyonu yapılamayan infeksiyonlarda etkenin izolasyonuna başvurulmaktadır.

Günümüzde birçok geliştirilen tanı yöntemleri sayesinde direkt olarak şüpheli materyalden üretme yoluna gitmeden viral antijenin varlığı tespit edilerek tanı yapılabilmektedir. Bu amaçla elektron mikroskopi, elektroforez, PCR, ELISA ve immunofloresans kullanılan en önemli tanı yöntemlerini oluşturmaktadır. Bunun dışında bir çok tanı laboratuvarında hemaglutinasyon-hemaglutinasyon inhibisyon testleri, komplement fiksasyon testleri de günümüzde konvensiyonel tanı metotları olarak kullanılmaktadır.

2- Viral inklüzyon cisimciklerinin tespiti: Viral hastalıkların tanısında kullanılan bir histolojik tanı yöntemidir. Bazı viruslar, inklüzyon cisimcikleri oluşturarak ürerler. Oluşturdukları inklüzyon cisimcikleri, Giemsa, Papanicolaou, Wright, Sellers metodları kullanılarak histolojik boyalarla boyanır ve ışık mikroskopunda görülür. Günümüzde özellikle kuduz hastalığının teşhisinde inklüzyon cisimciklerinin tespiti tanı açısından önemli bir göstergedir.

3- Viral partiküllerin tespiti: Elektron mikroskop (EM) yolu ile viral partiküller gösterilir. Viral hastalıkların tanısında EM kullanımı pahalı ve rutin laboratuvarları için kullanışlı bir yöntem değildir. Genellikle hücre kültürlerinde kolaylıkla üretilmeyen virusların tespit edilmesinde (*Rotavirus, Norwalkvirus, Hepatitis A ve Hepatitis B virusları vb.*) ve virus partiküllerin ultrastrüktürel olarak incelenmesinde kullanılır. Numunelerden ince kesitler hazırlanır ve ağır metal tuzları varlığında (fosfotungstik asit) negatif boyama yapılarak EM 'de bakılır. Numuneler en az 10^6 virus partikülü içermelidir.

4- Viral nükleik asitin tespiti: Viral nükleik asit moleküler teknikler kullanılarak tespit edilebilir. Bu moleküler teknikler arasında nükleik asit hibridizasyon (Southern blotting, Northern blotting, elektroforez v.b) ,ve amplifikasyon (polimeraz zincir reaksiyonu - PCR ve nükleik asit sekans amplifikasyon – NASBA v.b) yer almaktadır. Günümüzde özellikle PCR rutin laboratuvarlarda en çok kullanılan teknikler arasında yer almaktadır. PCR çok duyarlı ve spesifik bir tanı yöntemi olmasına rağmen kontaminasyona bağlı hatalı pozitif sonuçlarının da görülebilmesi önemli bir dezavantajdır.

B- İndirekt laboratuvar tanı yöntemleri

Bir çok laboratuvarında viral hastalıkların tanısında virusa karşı spesifik antikorların tespit edildiği serolojik testler kullanılmaktadır. Serolojik teşhiste infeksiyonun başlangıcında ilk olarak virusa spesifik IgM tespit edilebilir; daha sonra da IgG tipi antikorlar tespit edilir. IgM tipi antikorlar serumda varlığını 3-6 ay arası sürdürürken, IgG tipi antikorlar ömür boyu persistans gösterebilir. Virusla infekte konakçının serolojik profilini aşağıdaki gibi özetleyebiliriz.

- 1- Eğer virus-spesifik IgG (-) ve IgM ise (+) : Primer yeni, yani akut fazda bir infeksiyondur.
- 2- Eğer virus-spesifik IgG (+) ve IgM ise (-): Geçirilmiş bir infeksiyondur; immunité kazanılmıştır.
- 3- Eğer virus-spesifik IgG (+) ve IgM (+) : Bu tarzda bir veri ile karşılaştığımızda infeksiyonun primer veya sekonder bir infeksiyon olup olmadığı mutlaka ayırt edilmelidir. Antikor açısından IgM pozitifliği akut bir infeksiyon göstergesi olmasına rağmen, her zaman tek bir akut infeksiyon olduğunu göstermez. Yani IgM tipi antikorlar akut bir infeksiyon için duyarlıdır ancak spesifik değildirler. Primer infeksiyonla sekonder infeksiyonu birbirinden ayırmak için IgG avidite testleri kullanılmaktadır. Primer infeksiyonlarda IgM antikorlar

yönünden pozitiflik varken, virusa spesifik Ig G antikorların avidite miktarı düşüktür. Sekonder ya da geçirilmiş bir enfeksiyonda ise IgM antikor pozitifliği yanı sıra IgG antikorların aviditesi de yüksektir.

İndirekt laboratuvar tanı yöntemlerini iki grupta toplayabiliriz.

1- Klasik serolojik tanı yöntemleri: Bu grupta yer alan testler zamana bağlı testlerdir. Virusa spesifik toplam antikor miktarının tespit edilmesine izin verir. Toplam antikor miktarının serolojik yönden tanı değerinin olabilmesi için enfeksiyon başladıktan hemen sonra bir serum numunesi ve 10-14 gün sonra ikinci serum numunesi alınarak akut ve konvelesan serumlarda antikor titrelerini karşılaştırmak gerekir.

- Nötralizasyon
- Hemaglutinasyon (HA) ve hemaglutinasyon İnhibisyon (HI)
- Komplemanı bağlama reaksiyonu (Complement Fixation test)
- Agar jel immunodifüzyon testi
- Single-radiyal hemoliz testi
- Hemadsorbsiyon testi

Yukarıda yazılı bu testler, izole edilmiş virusların tiplendirmesinde ve serepidemiyolojik çalışmalarda rahatlıkla kullanılmaktadır.

2-Hızlı serolojik tanı yöntemleri: Son yıllarda aşağıda belirtilmiş olan hızlı ve daha güvenilir olan tanı yöntemleri viral enfeksiyonların serolojik tanısında kullanılmaktadır.

- Elisa,
- İmmunfloresans
- RIA (radioimmunassay)

Özellikle ELISA ve immunfloresans teknikleri rutin laboratuvarlarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu testler ile konakçıda primer, sekonder ya da geçirilmiş bir viral enfeksiyon, IgM ve IgG antikor seviyelerine bakılarak rahatlıkla ve hızlı olarak yapılmaktadır.

NÖTRALİZASYON TESTİ

İn vivo veya *in vitro* sistemlerde infektif bir virusun spesifik antikorlar ile birleşerek enfeksiyon gücünün azaltılarak inhibe edilmesine “**nötralizasyon**” denir. Nötralizasyon testi virolojide serolojik tanıda diğer testlere nazaran daha sık kullanılır ve bu test izolasyonu yapılmış bir virusu tanımlama ya da konakçıda o virusa karşı oluşan antikor yanıtı ölçmek amacıyla kullanılan önemli bir serolojik tanı yöntemidir. Test, prensibi olarak antijen ve antikorların spesifik konakçı sistemlerinde karşılaştırılıp belli bir inkubasyon süresinden sonra antikor antijen reaksiyonunun saptanması esasına dayanır. Nötralizasyon testi az miktardaki antikor varlığını saptayacak kadar hassas ve virus türlerinin serotiplerini tayin edecek kadar spesifiktir.

Nötralizasyon aranan şüpheli materyale göre iki kategoride yapılır..

1- Virus nötralizasyon testi (VNT): Bilinen virus varlığında, şüpheli serum numunesinde virusa karşı oluşan nötralizan antikorların tespit edildiği yöntemidir.

2- Serum nötralizasyon testi (SNT): Bilinen serum varlığında, şüpheli virusa karşı oluşacak spesifik nötralizan antikorların saptanmasıdır.

Nötralizasyon testi kullanılan konakçı ortamına göre 2 sınıfa ayrılır.

1- *In vivo* nötralizasyon: Konakçı sistemi olarak deneme hayvanları ve embriyolu tavuk yumurtası kullanılır.

2- *In vitro* nötralizasyon: Konakçı sistemi olarak hücre kültürleri kullanılır. *In vitro* nötralizasyon ikiye ayrılır.

- Makronötralizasyon
- Mikronötralizasyon

Nötralizasyon testinde kullanılan materyallerin standardizasyonu

Nötralizasyon testine başlamadan test için kullanılacak olan virus, serum ve konakçı sistemlerinin standardize edilmesi gerekir.

1- İster şüpheli virus izolatu olsun isterse de bilinen stok virus olsun teste başlamadan önce mutlaka titrasyonu yapılarak infektivite gücü (DKID₅₀, LD₅₀ veya YID₅₀) hesaplanmalıdır. Bilinen serum kullanılıyorsa mutlaka serum SN₅₀ oranında sulandırılmalıdır.

2-Nötralizasyon testinde kullanılan virus titresinden 100 kat (100 DKID₅₀, 100 LD₅₀ veya 100YID₅₀) daha konsantre olmalıdır.

3-Nötralizasyon testi için kullanılması gereken konakçı sistemleri olarak deneme hayvanlarını, embriyolu tavuk yumurtası ve hücre kültürleri kullanılmalıdır. Nötralizasyon testi için kullanılan konakçı sistemleri içinde en önemlisi hücre kültürleridir ve virusun bu kültürlerle duyarlı olması çok önemlidir.

4- Nötralizasyon testinde kullanılan serumların mutlaka 56 °C'de, 30 dakika süreyle mutlaka inaktivasyonu yapılmalıdır. Kullanılacak serumlarda herhangi bir kontaminasyon olmaması, hemolitik olmaması ve çok fazla dondurulma çözülme işlemine maruz kalmaması gerekir.

Nötralizasyon testi monolayer yani tek katman halinde üretilmiş ya da süspansiyon yani hareketli hücre kültürlerinde olmak üzere iki adet hücre kültürü kullanılır. Süspansiyon kültürlerde yapılan nötralizasyon testinde virusla infekte hücreler vasat içinde hareketli olarak üretilirler. Virus hücreler içinde replike olduktan sonra, progeni virus vasat içine salınır ve nötralize olmamış virus vasatın pH derecesinin değişmesiyle ya da hemadsorbsiyon testi ile tespit edilir. Monolayer yani tek katman halinde üreme gösteren hücrelerle yapılan nötralizasyonda ise CPE oluşup oluşmamasına göre nötralizasyon testi değerlendirilir.

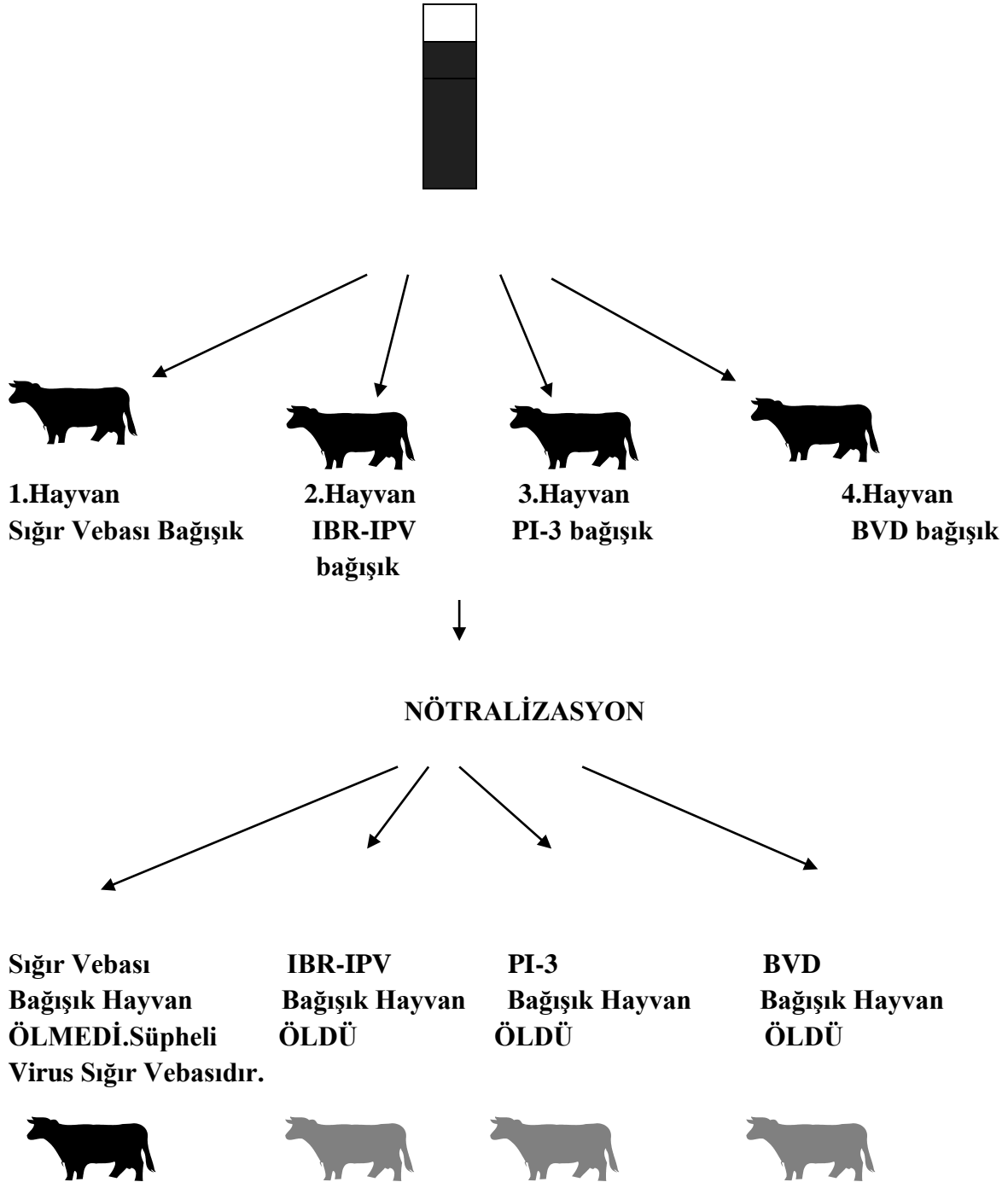
NÖTRALİZASYON TESTİNİN KULLANIM ALANLARI

- 1- Serolojik olarak tiplendirme yapmak amacıyla
- 2- Tek bir hayvandan sürüden alınan kan örneklerinde antikor tespit edilmesinde
- 3- Epidemiyolojik çalışmalarda
- 4- Aşılama sonrası antikor düzeyinin tespitinde
- 5- Aşı antijenin tespit edilmesinde
- 6- Serolojik seleksiyon amacıyla
- 7- Çift katlı antikor seviyesinin tespitinde

1- *İN VİVO* SİSTEMLERDE NÖTRALİZASYON TESTİ

Bu amaçla deneme hayvanları ve embriyolu tavuk yumurtaları kullanılır. *In vivo* olarak deneme hayvanlarında yapılan nötralizasyonu klasik bir örnekle açıklanabilir. Viral bir hastalıktan şüpheli hayvandan aldığımız örneklerden elde edilen izolatu inokule etmek amacıyla dört adet deneme hayvanı seçilir. Bu hayvanlarıda Sığır vebası, IBR-IPV, PI-3 ve BVD hastalıklarına karşı bağışık hale getirilir. Daha sonra izolatu bu deneme hayvanlarına inokule edilir. Sonuçta Sığır vebasına karşı bağışık hale getirilen deneme hayvanı sağ kalıp diğer hayvanlar ölüm şekillenirse elde edilen şüpheli izolatu sığır vebası virusu olduğuna

karar verebilir. Çünkü Sığır vebasına karşı bağışık hale getirilen hayvanların taşıdığı antikorlar bu virusa spesifik olduğundan nötralizasyon işlemi gerçekleşecek ve virus hayvanda etkisini oluşturmamacaktır. (Bkz. Şekil 17)



Şekil 17. İn vivo sistemlerde nötralizasyon

2- İN VİTRO SİSTEMLERDE NÖTRALİZASYON TESTİ

Hücre kültürlerini kullanarak yapılan nötralizasyon testidir ve makronötralizasyon ve mikronötralizasyon olmak üzere iki yöntemle yapılır.

A- MAKRONÖTRALİZASYON TESTİ

1- Virus sulandırma metodu (Bilinen serum - şüpheli virus) ile makronötralizasyon testi

Testin basamakları aşağıda verilmiştir.

- a- 100DKID₅₀ oranında sulandırılmış şüpheli virustan steril bir tüpe 1 ml alınır.
- b- SN₅₀ değeri oranında sulandırılmış bilinen serumdan üzerine 1 ml ilave edilir.
- c- Şüpheli virus + bilinen serum karışımı 37 °C'de 1 saat süreyle inkube edilir.
- d- İnkubasyon sonrası karışımdan 4 adet hücre kültürüne inokulasyon yapılır.
- e- Her gün sonuçlar CPE yönünden kontrol edilir. Eğer bilinen serum şüpheli virusa spesifik ise onun hücre kültürü sistemlerinde infeksiyon oluşturmamasını inhibe edecek ve CPE gözükmeyecektir.

2- Serum sulandırma metodu (Bilinen virus -şüpheli serum) ile makronötralizasyon yöntemi

- a- Şüpheli serum log₂ tabanına göre sulandırılır. Bu amaçla şüpheli serumdan 1 ml steril bir tüpe alınır ve üzerine 1 ml PBS konur. Üzerine 2 ml 100 DKID₅₀ oranında sulandırılmış bilinen virus konur.
- b- Şüpheli serum + bilinen virus karışımı 37 °C'de 1 saat süreyle inkube edilir
- c- İnkubasyon sonrası karışımdan 4 adet konakçı sistemine inokulasyon yapılır.
- d- Her gün CPE yönünden kontrol edilir. Eğer bilinen virus şüpheli serumu spesifik ise onun hücre kültürü sistemlerinde infeksiyon oluşturmamasını inhibe edecek ve CPE gözükmeyecektir.

3- Pozitif serumlarda nötralizan antikor seviyesinin (SN₅₀ değeri) makronötralizasyon testi ile tespiti

%100 oranında infeksiyon oluşturma yeteneğine sahip olan virus sulandırmasının infekte ettiği konakçı sistemlerinin en az yarısında infeksiyonu durduran serum sulandırma oranına “SN₅₀” değeri denir.

- a- .Antikor taşıdığı saptanan serum log₂ tabanına göre çeşitli oranlarda sulandırılır. (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32...1/512 gibi) .Her sulandırma basamağı üzerine eşit oranda 100 DKID₅₀ oranında sulandırılmış bilinen virus konur.
- b- Şüpheli serum + bilinen virus karışımı 37 °C'de 1 saat süreyle inkube edilir.
- c- İnkubasyon sonrası her sulandırma basamağı 4 adet konakçı sistemine inokulasyon yapılır.
- d- Her gün sonuçlar kontrol edilir. Konakçı sistemlerinin hücre kültürleri olduğunu kabul edersek kontrol CPE yönünden yapılacaktır. Seçilen sulandırmaların en az yarısında nötralizasyon oluşturan değer SN₅₀ değeri olarak hesaplanır.

MİKRONÖTRALİZASYON TESTİ

1- Virus sulandırma metodu (Bilinen serum -şüpheli virus) ile mikronötralizasyon testi

Testin basamakları aşağıda verilmiştir.

- a- 100DKID₅₀ oranında sulandırılmış şüpheli virusun 1/2'lik sulandırmasından mikrotitrasyon tablasında 4 kuyucuğa 0.5 ml konur.
- b- SN₅₀ değeri oranında sulandırılmış bilinen serumdan üzerine 0.05 ml üzerine ilave edilir.
- c- Hücre kontrol ve virus kontrol içinde 4'er adet kuyucuk seçilir. Hücre kontrol için seçilen gözlere 0.1 ml hücreler üretme vasatı kontrol için seçilen gözlere 0.05 ml şüpheli virus ve 0.05 ml de virus üretme vasatı konur.
- c- Şüpheli virus + bilinen serum karışımı 37 °C'de 1 saat süreyle inkube edilir

d- İnkubasyon sonrası tüm kuyucukların üzerine virusa duyarlı olarak seçilmiş hücre kültürü süspansiyonundan 0.05 ml konur. Mikrotitrasyon tablasının üzeri şeffaf bantla ile kapatılarak 37 °C'lik etüve kaldırılır.

e- Her gün sonuçlar doku kültürü mikroskobu ile kontrol edilir.

2- Serum sulandırma metodu (Bilinen virus -şüpheli serum) ile mikronötralizasyon yöntemi

Testin basamakları aşağıda verilmiştir.

a- Şüpheli serum izolatu bir tüpte PBS ile 1/2 oranında sulandırılır. Mikrotitrasyon tablasında dört kuyucuk seçilerek bu karışımdan 0.05 ml konur.

b- 100 DKID₅₀ oranında sulandırılmış bilinen virustan 0,05 ml üzerine ilave edilir.

c- Hücre kontrol ve virus kontrol içinde 4' er adet kuyucuk seçilir. Hücre kontrol için seçilen gözlere 0,1 ml hücre üretme vasatı, virus kontrol için seçilen gözlere de 0.05 ml 100 DKID₅₀ oranında sulandırılmış bilinen virus ve 0.05 ml de virus üretme vasatı konur.

c- Şüpheli serum + bilinen virus karışımı 37 °C'de 1 saat süreyle inkube edilir

d- İnkubasyon sonrası tüm kuyucukların üzerine virusa duyarlı olarak seçilmiş hücre kültürü süspansiyonundan 0.05 ml konur. Mikrotitrasyon tablasının üzeri şeffaf bant ile kapatılarak 37 °C'lik etüve kaldırılır.

e- Her gün sonuçlar doku kültürü mikroskobu ile kontrol edilir.

Her iki metotta da sonuç değerlendirmesi şöyledir.

CPE (-) ise nötralizasyon testi (+) olarak değerlendirilir: Antijen ve antikor birbirine spesifik özellik göstererek bağlanmış ve infeksiyon inhibe edilmiştir.

CPE (+) ise nötralizasyon testi (-) olarak değerlendirilir: Antijen ve antikor birbirine spesifik olmadığından dolayı infeksiyon inhibe olmamış ve nötralizasyon gerçekleşmemiştir.

AGAR JEL İMMUNODİFÜZYON TESTİ

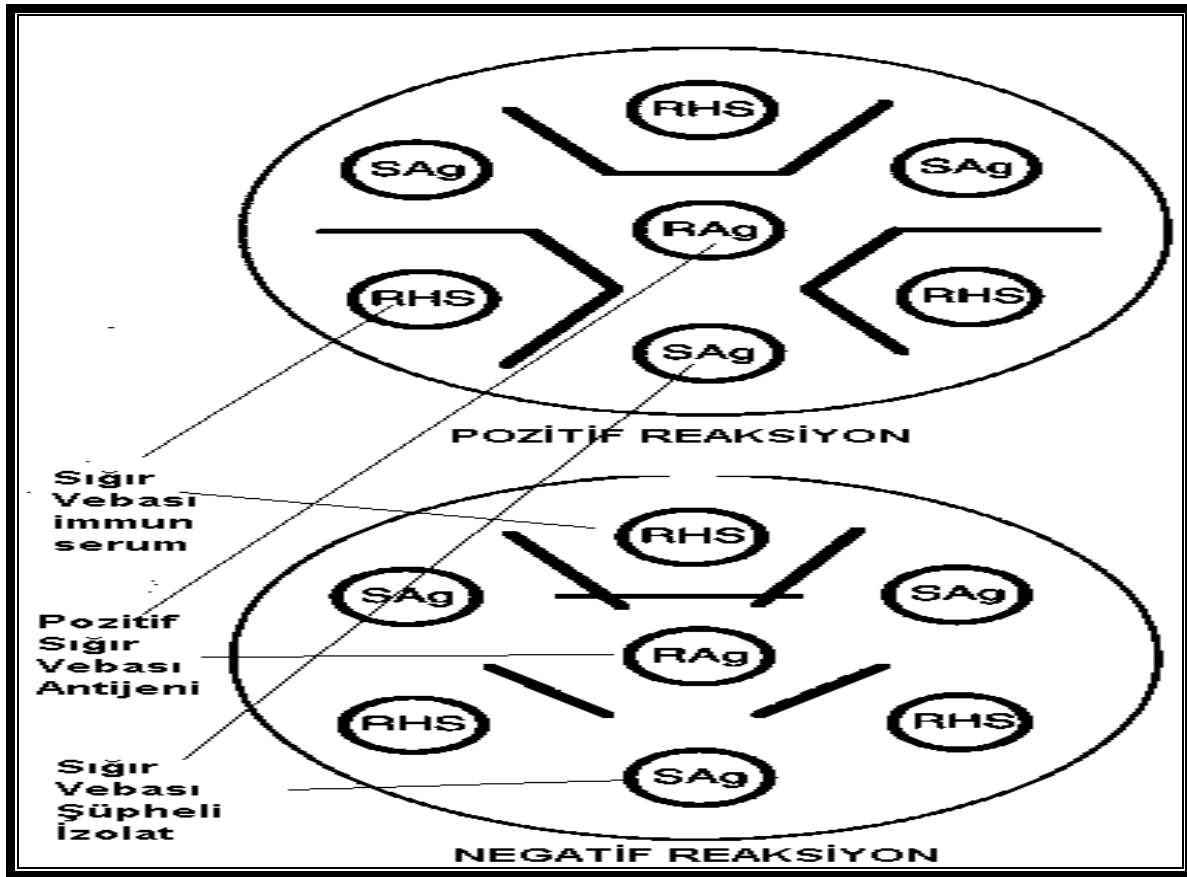
Test, agar içerisinde hazırlanan kuyucuklara konulan antikorlar ve antijenin yarı katı ortamda karşılaşması ve optimum reaksiyonun olduğu bölgelerde presipitasyon olması esasına dayanır. Daha çok şüpheli serumlarda antikor aranmasında kullanılsa da pozitif serum yardımıyla virusların identifikasyonunda da kullanılabilir. Testin maliyetinin ucuz olması ve kolay uygulanabilir olması ile avantaj olsa da, sonuçlarının gözle değerlendirilmesi nedeniyle analitik duyarlılık düşüktür. Pratikte sığır löykozu, visna-maedi, CAEV gibi *lentivirus* infeksiyonların teşhisinde kullanılır. Testte kullanılan antikor **presipitin**, antijen **presipitinojen** ve antijen-antikor kompleksi ise **presipitat** olarak adlandırılır. Testin yapılışı kısaca şöyledir;

-Petri kutularına dökülen %1'lik agaroz özel delicisiyle delinir.

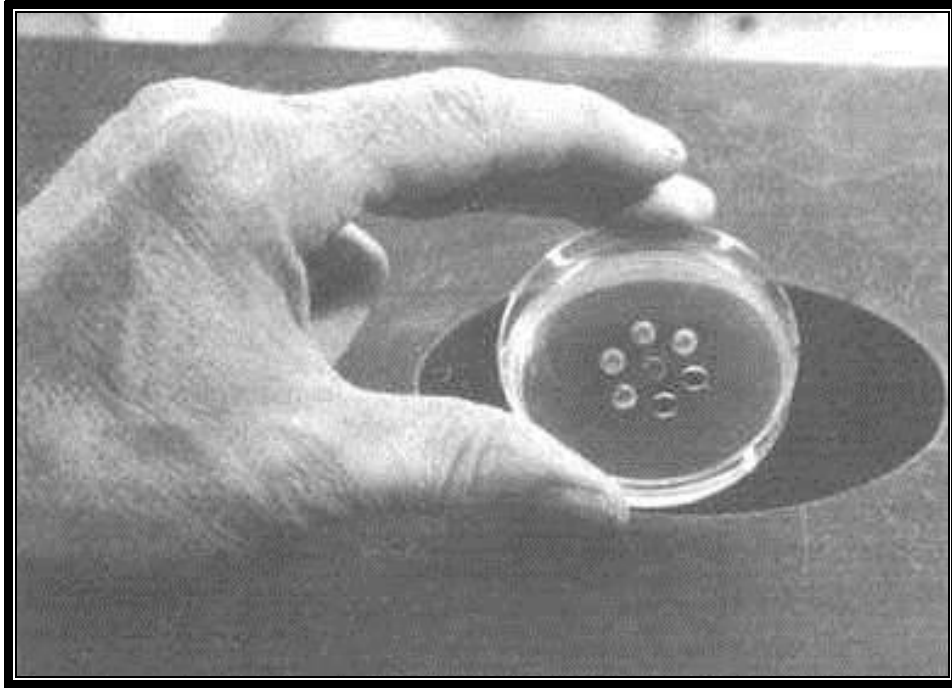
- Merkezdeki deliğe presipitinojen (Bilinen virus), periferdeki deliklere ise test edilecek serum örnekleri, pozitif ve negatif serumlar konulur.

- Petri kutuları nemli ortamda 3 gün inkube edilir.

Pozitiflikler şekil 18'e göre değerlendirilir.



Şekil 18. Agar Jel presipitasyon testi ve agar dizilimi



Resim 19. Agar Jel Presipitasyon testi sonuç değerlendirme

Günümüzde sığırların enzootik lökoz hastalığı, atların infeksiyöz anemi hastalığı, koyunların maedi ve visna infeksiyonu, keçilerin CAEV infeksiyonu, kanatlıların marek hastalığında kullanılmaktadır.

KOMPLEMANI BAĞLAMA REAKSİYONU (Komplement fikzasyon testi –KFT)

Kompleman, memelilerin normal taze serumlarında bulunan globulin yapısındaki 20 serum proteinden oluşan, genel olarak ısıya dirençsiz olan, 56 °C de 30 dakikada inaktive olan, antikorla ilişkisi olmayan bir sistemdir. Komplemanın antijen-antikor kompleksi ile bağlanma özelliği vardır. Bir antijen kendisine spesifik antikorla birleştikten sonra ortama katılan kompleman ile de birleşerek onunla bağlanır. Kompleman antijen antikor kompleksi ile reaksiyona girmediği sürece inaktiftir.

Kompleman fikzasyon testinde daha stabil olması nedeniyle kobay komplemanı kullanılır. İmmun serumlarda virusları nötralize eden antikorların yanı sıra komplemeti tespit eden antikorlar da taşır. Bunlar komplemetin önünde homolog virus ile bağlanan ve bu bağlanma esnasında komplemanı tüketen antikorlardır. Komplemanın tüketilmesi ise hemolitik sistemin hemoliz oluşturma yeteneğini inhibe eder ve hemoliz oluşmaz. Bu durum antijen ve antikor arasında reaksiyon sırasında komplemanın tüketildiğini gösterir.

Komplement Fikzasyon Testinin yapılabilmesi için gerekli 5 temel unsura ihtiyaç duyulur.

- c. Antijen (Bilinen ya da şüpheli bir virus)
- d. Antikor (Bilinen ya da şüpheli bir serum)
- e. Kompleman (Taze kobay serumu)
- f. Amboseptör (Tavşan kulak venasına koyun eritrositi verilerek elde edilen anti-koyun eritrositi serumu)
- g. Koyun eritrositi

Amboseptör ve koyun eritrositinin ikisine birden “**hemolitik sistem**” denir.

Kompleman fikzasyon testinin temel esaslarını üç madde altında toplayabiliriz.

- **Antijen +Kompleman:** Antijen kompleman ile bağlanmaz
- **Antikor +Kompleman:** Antikor kompleman ile bağlanmaz.
- **Antijen+Antikor +Kompleman:** Kompleman antijen ile antikor birbiri ile bağlandığı zaman reaksiyona girer.

KFT testi için kullanılan materyallerin mutlaka belli bir standardizasyonu olmalıdır.

- 1- Testte kullanılacak serum numunelerinin kontamine olmaması gerekir.
- 2- Serumun içinde bulunan komplemanın sitolitik etkisinin giderilmesi içinde 56 °C de 30 dakikada inaktive edilmelidir.
- 3- Kompleman oda ısısında etkisini kaybedeceği için mutlaka 4 ila 10 °C arasında saklanmalıdır.
- 4- Hemolitik sistem + komplemanın birlikte titrasyonu yapılmalıdır ve komplemanın yarısında hemoliz oluşturan değer yani hemolitik doz %50 (HD₅₀) hesaplanmalıdır. Kompleman fikzasyon titresi olarak 4 HD₅₀ hesaplanmalıdır.

Komplement fikzasyon testi iki yöntemle yapılır.

- 1- Şüpheli virus izolatu ile komplement fikzasyon testi
- 2- Şüpheli serum ile komplement fikzasyon testi

1- Şüpheli virus izolatu ile komplement fikzasyon testi

- A- Virustan şüpheli izolattan bit tüpe 1 ml konur.
- B- Üzerine 1 ml bilinen serum ve 1 ml kompleman konur.
- C- 37 °C'de 1 saat inkubasyona bırakılır.
- D- Inkubasyon sonrası karışım üzerine 2 ml hemolitik sistem (1ml amboseptör+ 1ml koyun eritrositi) eklenir.
- E- Tekrar 37 °C'de 1 saat inkubasyona bırakılır ve sonra sonuçlar değerlendirilir. Eğer elimizde şüpheli izolat ile bilinen serum homolog ise kompleman eşliğinde birleşirler ve reaksiyonda kompleman tamamen harcanır. İkinci bir reaksiyonda oluşamayacağından hemoliz olmayacaktır.

Hemoliz (+) ise KFT (-)

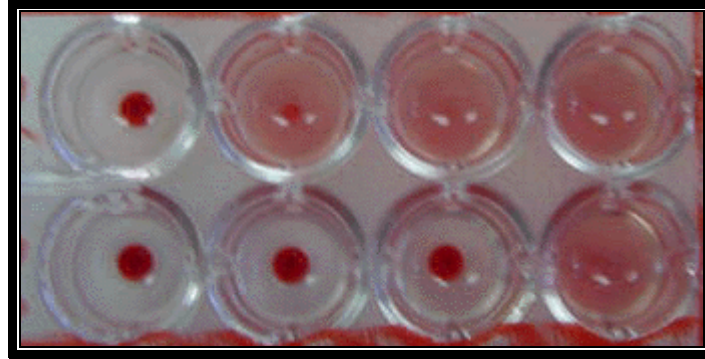
Hemoliz (-) ise KFT (+)

2- Şüpheli serum ile komplement fikzasyon testi

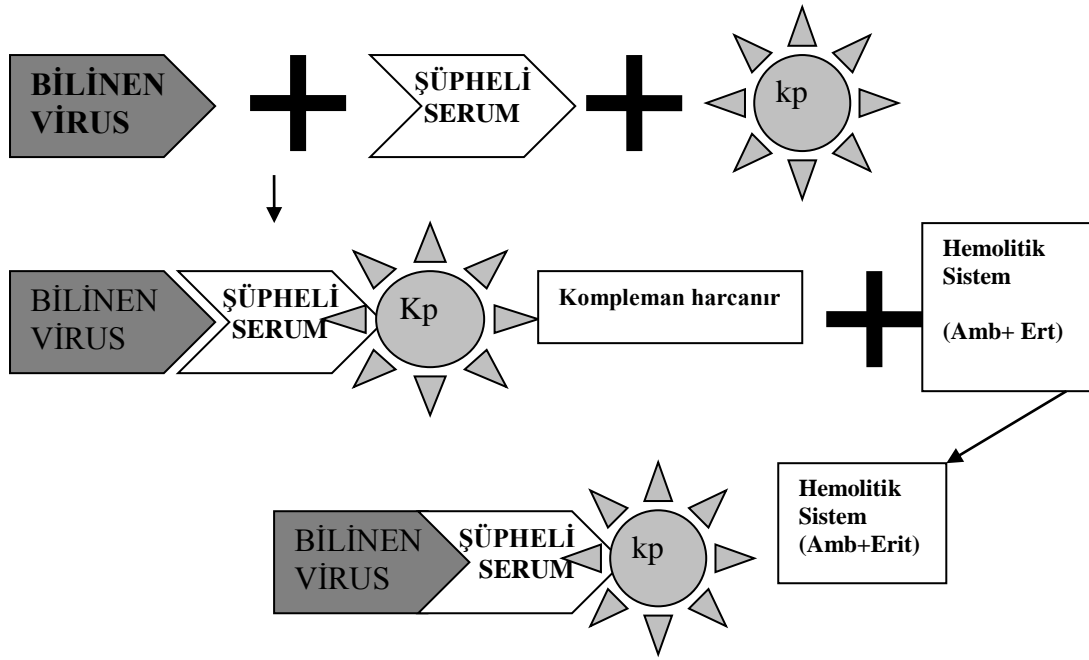
- A- Şüpheli serumdan bir tüpe 1 ml konur.
- B- Üzerine 1 ml bilinen virus ve 1 ml kompleman konur
- C- 37 °C'de 1 saat inkubasyona bırakılır.
- D- Inkubasyon sonrası karışım üzerine 2 ml hemolitik sistem (1ml amboseptör+ 1ml koyun eritrositi) eklenir.
- E- Tekrar 37 °C'de 1 saat inkubasyona bırakılır ve sonra sonuçlar değerlendirilir. Eğer bilinen virusa karşı ile şüpheli serum homolog antikorlar içeriyorsa ise kompleman eşliğinde birleşirler ve reaksiyonda kompleman tamam harcanır. İkinci bir reaksiyonda oluşamayacağından hemoliz olmayacaktır. (Bkz. Şekil 21)

Hemoliz (+) ise KFT (-)

Hemoliz (-) ise KFT (+)



Şekil 20. Komplemanı bağlama Testi



Şekil 21. Şüpheli serum ile Komplement Fiksasyon Testi (kp: komplement, Amb: Amboseptör, Erit:Eritrosit)

Komplement Fiksasyon Testinin en büyük avantajı ucuz olmasıdır. Dezavantajları ise çok fazla duyarlılığı olan test olmaması, çok sık non spesifik reaksiyon şekillenmesi ve zaman alıcı bir test olmasıdır.

PLAK REDÜKSİYON TESTİ (PRT)

İnterferonun ve virüs-hücre etkileşimlerinin sonuçlarını tespit eden önemli bir reaksiyondur. Plak testi, 1952’de Dulbecco tarafından geliştirilmiştir. Plak, virusların hücrede oluşturdukları sitopatik etkiyi, agar kullanarak odak şeklinde görebildiğimiz alanları ifade eder. Plak-redüksiyon testi, virus replikasyonu üzerine antiviral etki yapan interferonların etkisini plak sayısının hesaplanması ile olur. Bu test tekniği ile hücreler ilk önce interferonla muamele edilir. Daha sonra bu hücreler virusla muamele edilerek virusun çalışıp çalışmadığı kontrol edilir. İnterferon tarafından korunmayan hücrelerde plak formasyonu oluşurken, interferonla muamele edilmiş hücrelerde, bir gecelik inkübasyonda kullanılan interferon miktarıyla orantılı olarak, azalmış miktarda plak gözlenir. Plak redüksiyon testi iki amaçla kullanılır.

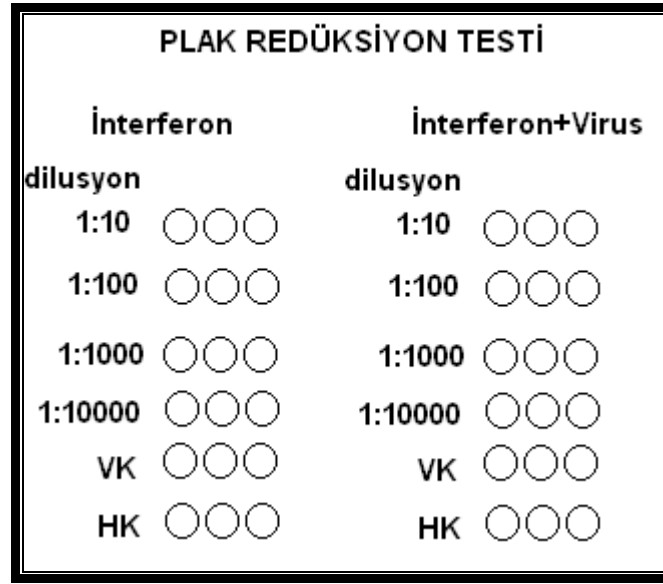
- 1- İnterferon varlığını tespit etmek
- 2- Antijen veya antikor tespiti

Bu testin uygulanışı esnasında 2X Earlie + % 1.8-2 Noble Agar’dan oluşan bir üretim vasatı kullanılır.

Testin yapılışı:

- 1- Bir seri steril petri kutusunda hücreler üretilir. Bu hücreler dörderli gruplar şeklinde interferon konulacak, virus kontrol ve hücre kontrol yapılacak şekilde işaretlenir.
- 2- İnterferon konulması için işaretlenen hücrelere interferon konur. Virus kontrol ve hücre kontrollere ise PBS solusyonu konur ve hücreler 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılır.

- 3- İnkubasyon sonrası petri kutularında bulunan interferon ile virus ve hücre kontrollere konulmuş olan PBS dökülür. Hücreler PBS ile yıkanır.
- 4- Log₁₀ tabanına göre seri olarak yapılmış virus sulandırılmalarından interferon ile muamele edilmiş hücrelere inokulasyon yapılır. Hücre kontrol için seçilen gözlere saf virus inokule edilir.
- 5- 37 ° C' de 1 saat inkubasyona bırakılır.
- 6- İnkubasyon sonrası virus hücrelerin üzerine konan virus sulandırılmaları virus kontrol ve PBS dökülür.
- 7- Tüm hücrelerin üzerine 2 X Earlie + % 1.8-2 Noble Agar şeklinde hazırlanmış hücre üretme vasat konur ve 37 ° C ısı ve %5 CO₂ içeren etüvlerde inkubasyona kaldırılır. Her gün plak oluşumu yönünden mikroskop ile kontrol edilir.



Şekil 22. Plak Redüksiyon testi dizilim şeması

Testin değerlendirilmesi

Virus Sulandırması	Virus Kontrol (İnterferon Yok)	Virus +İnterferon
10⁻¹	150 plak	55 plak
10⁻²	100 plak	32 plak
10⁻³	65 plak	15 plak
10⁻⁴	12 plak	Plak yok
10⁻⁵	5 plak	Plak yok

Eğer interferon etkili olmuşsa interferonla muamele edilmiş hücrelere ekilen virus sulandırılmalarının oluşturduğu plak sayısında azalma olacaktır. İnterferon virusun infeksiyözite gücünde azalma oluşturacaktır.

İMMUN PLAK TESTİ

Özellikle sığırların BVD virusunun sitopatojen olmayan suşlarını tespit etmek amacıyla geliştirilmiş bir tekniktir. Plak test ile immünperoksidaz testinin bir kombinasyonudur. Hücre kültürü sistemlerinde yapılan bir testtir.

Testin yapılışı:

- 1- Primer hücre kültürü hücre üretme vasatında 200.000 hücre / ml olacak şekilde sulandırılır. Bu sulandırmalardan 6 cm petri kutularına 6'şar ml konur.
- 2- Hücrelerin petri yüzeyine yapışmalarını sağlamak amacıyla petri kutuları oda ısısında bekletilir. Daha sonra 37 °C ısı ve %5 CO₂ gazı içeren etüvlerde 24 saat inkubasyona bırakılır.
- 3- Inkubasyon süresi sonunda petrilerin içinde bulunan hücre üretme vasatı dökülür ve hücre yüzeyi 1 kez yıkanır.
- 4- Biyotiplendirmesi tayin edilecek olan virusun log₁₀ tabanına göre sulandırması yapılır. Her sulandırma basamağı için bir petri kutusuna 0.5 ml ekim yapılır. Petri kutuları 37 °C ısı ve %5 CO₂ gazı içeren etüve kaldırılır ve 20 dakika ara ile çalkalanarak 2 saat inkubasyona bırakılır.
- 5- Inkubasyon sonrası petri kutularındaki virus sulandırmaları dikkatlice çekilir ve hücre yüzeyleri 3 kez yıkanır.
- 6- Yıkama işleminden sonra petrilerin içindeki hücrelerin içine 2X Earlie + %2 Noble Agar + % 10 dana serumu içeren vasattan 2'şer ml konur. Petri kutuları 37 °C ısı ve %5 CO₂ gazı içeren etüvde 3 gün inkubasyona bırakılır.
- 7- Inkubasyon sonrası petrilerden agar uzaklaştırılır. Hücre yüzeyleri yıkanır. Hücrelerin petri yüzeyine fizyasyonu sağlamak amacı ile -80 °C'de 1 saat tutulur.
- 8- Her petri kutusuna 1.5 ml konjugat konarak karanlık bir yerde oda ısısında bir saat beklenir. Süre sonunda petriler 3 kez yıkanır.
- 9- Her petri kutusuna 1.5 ml substrat konur. 30 dakika beklenir.
- 10- Her petri kutusuna su ilave edilerek reaksiyon durdurulur.

Sonuçların değerlendirilmesi: Mikroskopik olarak bakıldığında lizis şekillenmiş bir odak ile, bu lizis şekillenmiş odağı çevreleyen morfolojik olarak değişiklik gösteren ve hücre içi kırmızı kahverengi ile görülen bir hücre hattı BVD virusun sitopatojen olan bir biyotip olduğunu gösterir. Morfolojik olarak değişikliğe uğramamış ancak sitoplazmasında kırmızı – kahve renkte boyanmış hücrelerin oluşturduğu plaklar ise sitopatojen olmayan BVD suşunu tanımlar.

TEK YÖNLÜ İŞİNSAL HEMOLİZ TESTİ (Single Radial Hemolizis Testi)

Yaygın olarak kullanılmayan bir test olmasına rağmen güvenilirlik derecesi yüksek olan ve günümüzde halen insan hekimliğinde özellikle rubella hastalığına spesifik IgG antikorlarının tespit edilmesinde bazı tanı laboratuvarlarında kullanılan bir testtir.

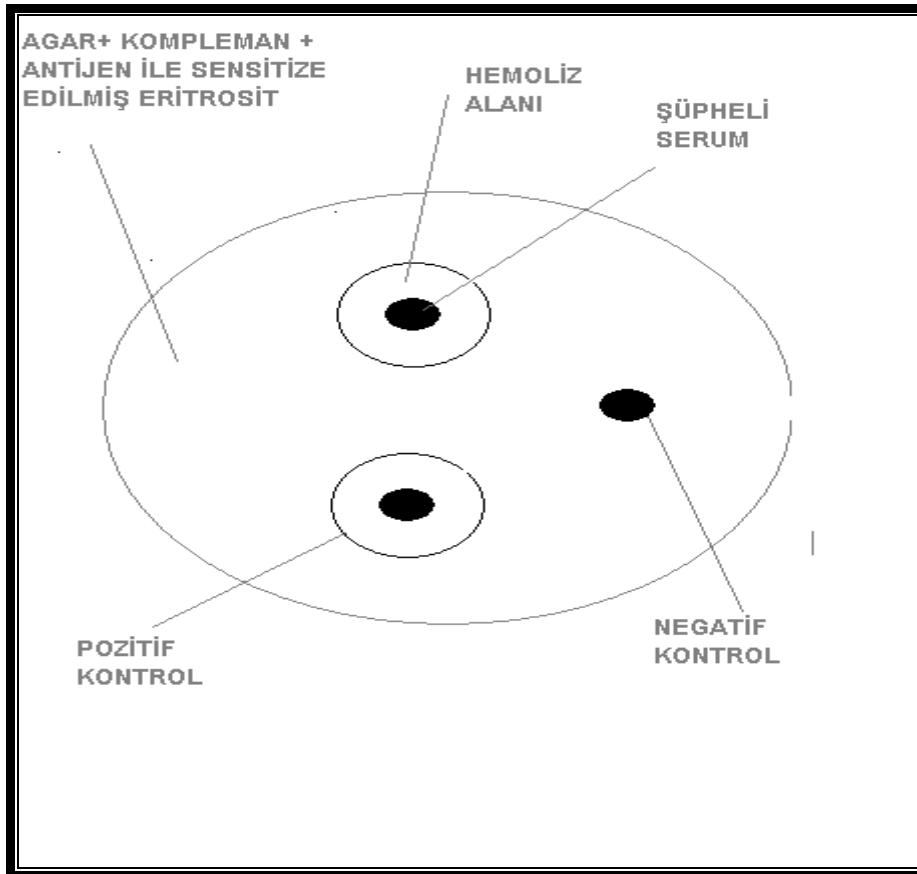
Prensip olarak agaroz ile oluşturulan yarı katı bir ortamda, antijen ile duyarlı hale getirilmiş eritrositler ile antikorların aralarına komplemanı da alarak serumun bulunduğu gözlerin çevresinde hemoliz halkaları oluşturmaları esasına dayanır. Antijen ile duyarlı eritrositler KIO₄ (potasyum periodat), Cr Cl₂ (Krom klorür) içinde yer aldığı çeşitli kimyasal maddelerle antijen ve eritrositlerin birleştirilmesi ile elde edilir.

Testin yapılması gerekli materyaller:

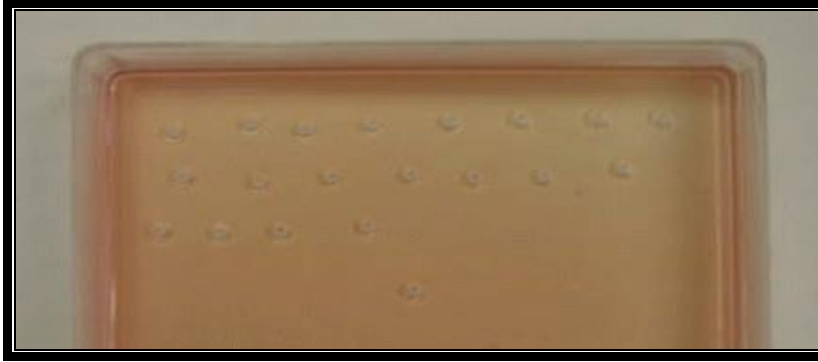
- 1- Antikor (Şüpheli Serum)
- 2- Antijen ile sensitize edilmiş eritrosit
- 3- Kompleman (Taze kobay serumu)
- 4- Agar (1% molten agaroz ya da %1.8-2 Noble Agar)

Testin yapılışı:

- 1- Su banyosu 45 °C ısıya ayarlanır.
- 2- 2.8 ml agaroz 100 ° C ısıda eritilir ve 10 dakika 45 °C ısıdaki su banyosuna konur.
- 3- 0.1 ml kompleman 45° C ısıdaki su banyosuna konur.
- 4- 0.1 ml virusla sensitize edilmiş eritrosit su banyosuna konur.
- 5- Agaroz kompleman ve eitrosit hepsi karıştırılır ve petri kutularına dökülür. 4 °C'de 1 gece beklenerek donmaları sağlanır.
- 6- Donan agar üzerine delikler açılır ve içine emici kağıtlar yerleştirilir. Açılan deliklere pozitif kontrol serum, şüpheli serum ve negatif serum konur.
- 7- 4 °C'de 15-16 saat beklenir. Bu süre zarfında serumlar agar içinde yayılma gösterir.
- 8- Buzdolabından çıkarılan petrilee 37 °C'de 3 saat beklenir. Bu süre zarfında antikor ile sensibilize edilmiş eritrosit kompleman eşliğinde birleşecek ve sonuçta hemoliz halkaları oluşacaktır. Negatif kontrol çevresinde ise halkalar oluşmayacaktır.



Şekil 23. Tek yönlü ışınsal hemoliz test (Single Radial Hemolysis Test)



Şekil 24. Tek yönlü ışınal hemoliz testi. Üst resim kontrol edilen numuneleri içeren tablalar alttaki resim kontrol içeren tablalar.

İMMUNOFLORESANS ANTİKOR TESTİ

İmmunofloresans Antikor Testi, viral infeksiyonların laboratuvar tanısında kullanılan hem viral antijenlerin hem de antikorların tespit edilmesinde hızlı bir metottur. Bu yöntem fluorescein ile işaretlenmiş antikorlar ile spesifik antijenlerin reaksiyona sokularak ultraviyole ışık altında değerlendirilmesi prensibine dayanır. Bu metodun sonuç değerlendirmesinde özel mikroskoplar kullanılmaktadır. İmmnofloresans testi **direkt** ve **indirekt** olmak üzere iki yöntemle yapılır. Viral antijenler direkt ve indirekt yöntemlerle antikorlar ise genellikle indirekt yöntemle tespit edilmektedir. İmmunofloresans testi günümüzde başta kuduz olmak üzere, RSV, parvovirus, CMV, akabane, pestivirus gibi birçok viral infeksiyonun tanısında kullanılmaktadır.

1- Direkt İmmnofloresans Testi (DFA): Klinik numunelerde virus aranmasında sık olarak kullanılan bir yöntemdir. İndirekt immunofloresans yöntemine nazaran sensitivitesi biraz daha düşüktür. Direkt yöntemle floresans antikor testi genel olarak aşağıdaki basamakları içerir. Bu yöntemde kullanılan konjugat aranan antijene spesifiktir.

1- Bu amaçla sekiz kameradan oluşan özel lamellerde şüpheli olduğunu düşündüğümüz virusa spesifik hücreler üretilir.

- 2- %80 -100 oranında monolayer olmuş hücrelerin üzerine şüpheli virus inokulumundan ekim yaparız.
- 3- 37 ° C ısı içeren etüvlerde inkubasyona kaldırılır.
- 4- 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki viruslu vasat çekilir. Hücreler 3 kez PBS ile yıkanır ve son yıkamadan sonra hücreler kurutulur.
- 5- Hücrelerin üzerine etanol solusyonundan ilave edilerek içinde viral antijen bulunan hücreler fikze edilir.
- 6- Daha sonra FITC ile işaretlenmiş konjugat ilave edilir. 37 °C ısı ve nemli bir ortamda 30 dakika inkubasyona bırakılır.
- 7- İnkubasyon sonrası PBS ie 3 kez yıkanır. Bu yıkama ile hatalı pozitiflik vermesi olası konjugat kalıntıları uzaklaştırılmış olur. Daha sonra lam kurutulur. Kuruma işleminden sonra hücrelerin üzerine gliserol konur ve üzerine lamel kapatılarak floresans mikroskobu ile kontrol edilir. Sarı ya da yeşil renkli ışıdamalar pozitif reaksiyonun göstergesidir.

2- İndirekt İmmnofloresans Testi (İİFA) : Bu yöntemle hem antijen hem de antikor aranabilir. Direkt metoda göre spesifik antiserumlar kullanıldığından dolayı daha duyarlı bir yöntemdir. Bu yöntemde öncelikle antijene karşı başka bir hayvan türünden elde edilmiş (ör:tavşan spesifik antiserumlar yani antikorlar kullanılır.Ayrıca bu yöntemde kullanılan konjugatlarda bu antivirüs antikorlarına özel olarak başka hayvan türlerinden elde edilmiş anti antikorlardır.(keçi anti tavşan antikoru). Bu yöntemin basamakları genel olarak aşağıda gösterilmiştir.

- 1- Bu amaçla sekiz kameradan oluşan özel lamellerde şüpheli olduğunu düşündüğümüz virusa spesifik hücreler üretilir.
- 2- %80 -100 oranında monolayer olmuş hücrelerin üzerine şüpheli virus inokulumundan ekim yaparız.
- 3- 37 °C ısı içeren etüvlerde inkubasyona kaldırılır.
- 4- 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki viruslu vasat çekilir. Hücreler 3 kez PBS ile yıkanır ve son yıkamadan sonra hücreler kurutulur.
- 5- Virüsün ekildiği hücrelerin üzerine virusa spesifik antikor içeren immün serumdan ilave edilir.
- 6- 37 °C ısı içeren etüvlerde inkubasyona kaldırılır ve 1 saat inkubasyona bırakılır. İnkubasyon esnasında her 10 dakika aralıklarla lamalar çıkartılarak hafifçe sağa sola oynatılır. Böylece antijenle spesifik antikorun yeterli miktarının reaksiyona girmesine yardım edilmiş olur.
- 7- Hücrelerin üzerindeki virus ve antikor karışımı olan sıvı çekilir. Hücreler 3 kez PBS ile yıkanır ve son yıkamadan sonra hücreler kurutulur.
- 8- Daha sonra FITC ile işaretlenmiş konjugat ilave edilir. 37 °C ısı ve nemli bir ortamda 30 dakika inkubasyona bırakılır.

9- İnkubasyon sonrası PBS ie 3 kez yıkanır. Bu yıkama ile hatalı pozitiflik vermesi olası konjugat kalıntıları uzaklaştırılmış olur. Daha sonra lam kurutulur. Kuruma işleminden sonra hücrelerin üzerine gliserol konur ve üzerine lamel kapatılarak floresans mikroskobu ile kontrol edilir. Sarı ya da yeşil renkli ışıldamalar pozitif reaksiyonun göstergesidir.İmmunofloresans teknikleri arasında kullanılan diğer önemli bir yöntem ise nötralizasyon indirek immunofloresans (NIIF)teknigidir.Bu yöntem genel olarak antikor varlığının saptanması amacıyla kullanılır.Testin basamakları aşağıda verilmiştir.

1- 100 DKID₅₀ oranında sulandırılmış bilinen virus ile şüpheli serum bir tüpte eşit oranda karıştırılır.

2- 37 ° C ısı içeren etüvlerde 1 saat inkubasyona bırakılır.

3- Daha sonra bu karışım adsorbsiyon tekniğine uygun olarak hücre kültürü üretilmiş lameller üzerine ekilir.

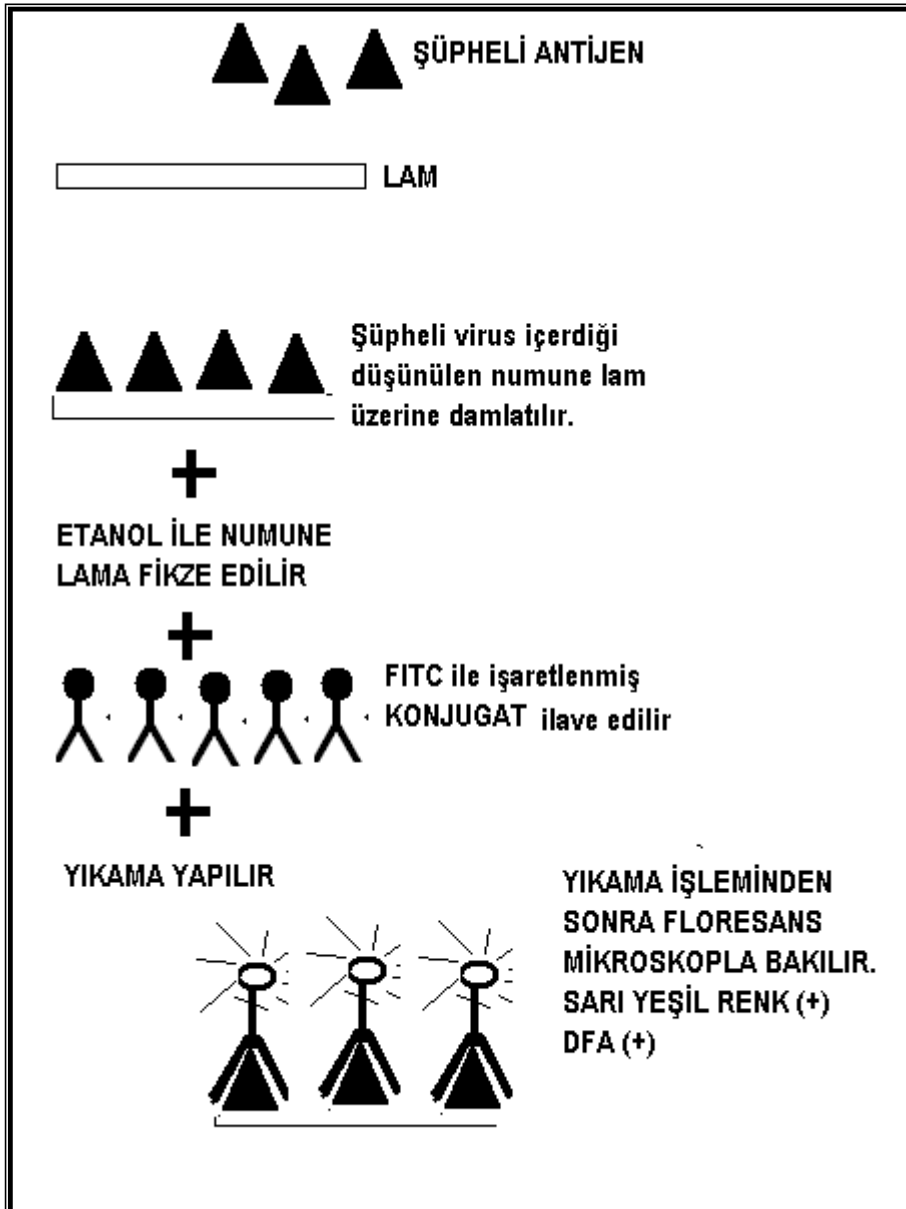
4- 37 ° C ısı içeren etüvlerde 48 saat inkubasyona bırakılır

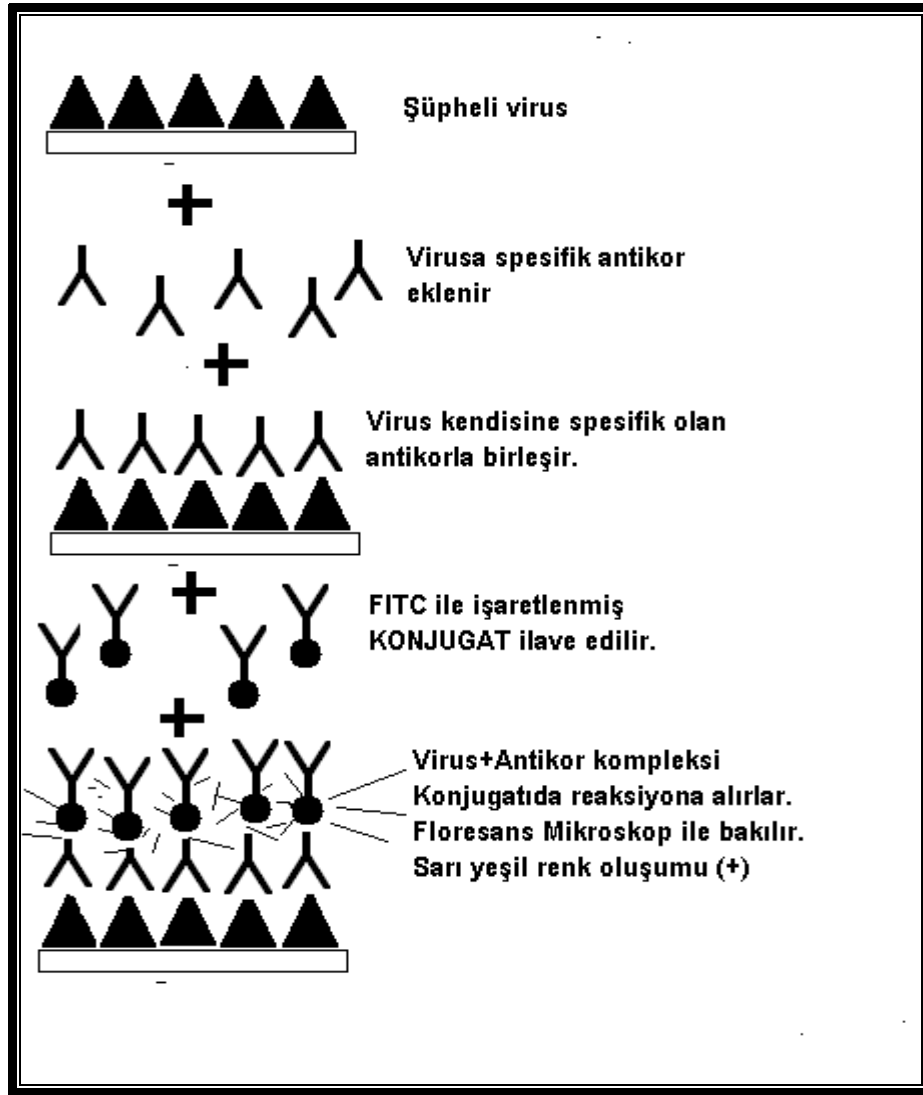
5- İnkubasyon sonrası ekim yapılmış lamellerde etanol ile muamele edilerek hücreler fikze edilir.

6- Üzerine FITC ile işaretlenmiş konjugat ilave edilir.

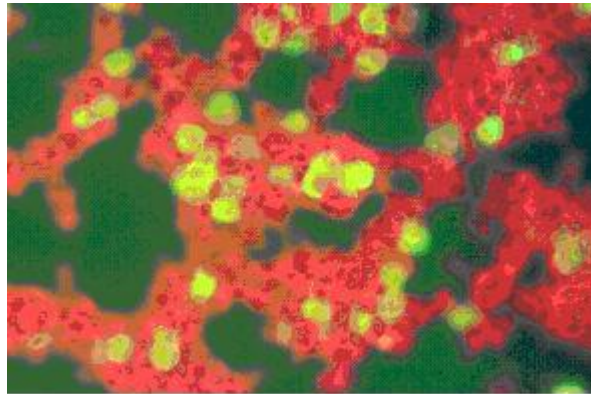
7- 37 ° C ısı içeren etüvlerde 1 saat inkubasyona bırakılır. Daha sonra floresans mikroskopta sonuçlar değerlendirilir. Bilinen virus ile şüpheli serum birleştiği zaman konjugat virusa bağlanamayacağından sarı ya da yeşil renkte bir ışıldama olmaz. Renk oluşmaması NIIF testinin

pozitif olduğunu gösterir.





Şekil 25. İndirekt Floresans Antikor tekniği



Şekil 26. Direkt Floresans Tekniği ile Hep-2 Hücre kültürlerinde İnsan adenovirus antijenleri (Z.Yazıcı'dan alınmıştır)

ELİSA TESTİ (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Spesifik antijen için spesifik antikorların varlığı çeşitli farklı immun reaksiyonlar ile gösterilir. Bu teknikler bilinen antijen ile bilinmeyen antikor ya da bilinen antikor ile

bilinmeyen antikorların taranması şeklinde değişik şekillerde uygulanabilir. Elisa testinde antijen ve antikor arasındaki spesifik reaksiyona giren antijen ve antikordan biri ile kaplanmış katı ortamlarda (Solid phase) gerçekleşir. Bu amaçla katı ortam olarak polisteren ya da polivinil ile kaplanmış mikroelisa tablaları kullanılır. Bu yönü ile hücreye bağımlı olmamasından dolayı ve bakteriyel kontaminasyon riskinin az olmasından dolayı immunfloresans ve immunperoksidaz tekniklerine nazaran daha kullanışlı bir tekniktir.

Günümüzde birçok rutin tanı laboratuvarında çok yaygın olarak kullanılır. Elisa testinde antijen ve antikorun arasında reaksiyonun tespitinde kullanılan konjugat ve substratlar önemli yer tutmaktadır. Konjugatlar enzim ile işaretlenmiştir. Bu enzim ikinci bir antikor ile reaksiyona girdiği zaman reaksiyon bölgesinde renk oluşturacaktır. Konjugat işlenmesinde alkalın fosfataz, B-galaktosidaz, D-galaktosidaz ya da HRPO kullanılır. Substrat olarak son yıllarda TMB (tetra metil benzidin) ve OPD (orto fenil di fostat) kullanılmaktadır. Laboratuvar tanı amacı ile kullanılan birçok tanı yöntemi vardır. Ancak bir genelleme olarak; Elisa testi direkt ve indirekt olmak üzere iki yöntemle yapılır.

1- Direkt Elisa testi şüpheli virusun tespiti:

Bu yöntem viral antijenlerin tespiti için kullanılır. Test aşağıdaki aşamaları içerir.

a- Mikroelisa tablalarının her bir kuyucuğuna 200 µl bilinen antikor konur.

b- 4 °C’ de bir gece inkubasyona bırakılır.

c- İnkubasyon sonrası mikroelisa tablasının tüm kuyucukları boşatılır ve PBS – Tween ile doldurulur ve 10 dakika beklenir. Sonra PBS tween boşaltılır. Kuyucuklara tekrar PBS-Tween ile doldurulur ve 10 dakika beklenir. Yıkama olarak tanımlanan bu işlem toplam 3 kez yapılır. Son yıkamadan sonra mikroelisa tablaları kuruması beklenir.

d- Şüpheli virus seçilen maddelerden konur.

e-Daha sonra mikroelisa tablası nemli bir ortamda 37 °C’ de 90 dakika inkubasyona kaldırılır.

f- İnkubasyon sonrası mikroelisa tablasının tüm kuyucuklar boşatılır ve PBS – Tween ile 3 kez yıkanır ve kurutulur.

g- Tüm gözlere 100 µl konjugat konur.

h- Daha sonra mikroelisa tablası nemli bir ortamda 37 °C’ de 60 dakika inkubasyona kaldırılır

i- İnkubasyon sonrası mikroelisa tablasının tüm kuyucukları boşatılır ve PBS – Tween ile 3 kez yıkanır ve kurutulur.

j- Tüm gözlere 100 µl substrat konur.

k- Nemli bir ortamda 37 °C’ de 30 dakika inkubasyona kaldırılır.

l- İnkubasyon sonrası tüm gözlere 50 µl reaksiyonu durdurmak amacı ile stop solusyon konur.

m- Mikroelisa tablası elisa okuma cihazlarında 450nm, 490nm ya da 620 nm lik filtrelerden biri ile okunarak optik dansite değerleri yani absorbanları tespit edilir. Oluşan renk reaksiyonlarına ve elde edilen optik dansite değerlerine göre reaksiyon değerlendirilir. Renk oluşumu pozitif reaksiyonun varlığını yani şüpheli antijenin bilinen antikorumuza spesifik olduğunu gösterir. (Şekil.46)

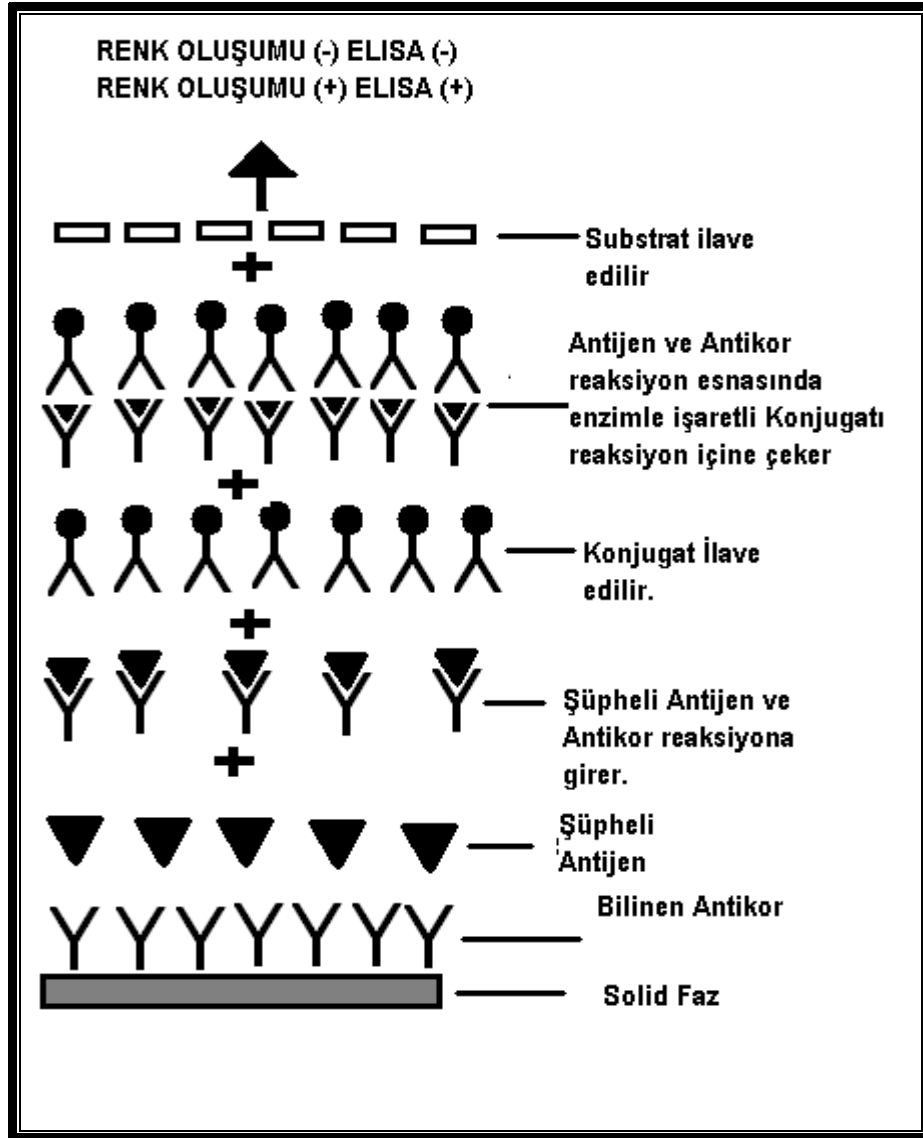
2- İndirekt Elisa testi :

Bu yöntem viral antijene karşı oluşan antikor tespiti için kullanılır. Test aşağıdaki aşamaları içerir.

a- Mikroelisa tablalarının her bir kuyucuğuna 200 µl bilinen antijen konur.

b- 4 °C’ de bir gece inkubasyona bırakılır.

- c- İnkubasyon sonrası mikroelisa tablasının tüm kuyucukları boşatılır ve PBS – Tween ile doldurulur ve 10 dakika beklenir. Sonra PBS tween boşatılır. Kuyucuklara tekrar PBS-Tween ile doldurulur ve 10 dakika beklenir. Yıkama olarak tanımlanan bu işlem toplam 3 kez yapılır. Son yıkamadan sonra mikroelisa tablaları kuruması beklenir.
- d- Şüpheli virus içeren her numune için mikroelisa tablalarından bir kuyucuk seçilir ve bu kuyucuklara şüpheli numunelerde 100 µl konur. Ayrıca pozitif ve negatif kontrol içinde kuyucuklar seçilir. Bu kuyucuklara pozitif ve negatif olarak seçilen maddelerden konur.
- e-Daha sonra mikroelisa tablası nemli bir ortamda 37 °C de 90 dakika inkubasyona kaldırılır.
- f- İnkubasyon sonrası mikroelisa tablasının tüm kuyucukları boşatılır ve PBS – Tween ile 3 kez yıkanır ve kurutulur.



Şekil 27. Direkt Elisa Metodu

- g- Tüm gözlere 100 µl konjugat konur.
- h- Daha sonra mikroelisa tablası nemli bir ortamda 37 °C de 60 dakika inkubasyona kaldırılır
- i- İnkubasyon sonrası mikroelisa tablasının tüm kuyucukları boşatılır ve PBS – Tween ile 3 kez yıkanır ve kurutulur.

j- Tüm gözlere 100 µl substrat konur.

k- Nemli bir ortamda 37 °C'de 30 dakika inkubasyona kaldırılır.

l- İnkubasyon sonrası tüm gözlere 50 µl reaksiyonu durdurmak amacı ile stop solusyon konur.

m- Mikroelisa tablası elisa okuma cihazlarında 450nm, 490nm ya da 620 nm lik filtrelerden biri ile okunarak optik dansite değerleri yani absorbanları tespit edilir. Oluşan renk reaksiyonlarına ve elde edilen optik dansite değerlerine göre reaksiyon değerlendirilir. Renk oluşumu pozitif reaksiyonun varlığını yani şüpheli antikorumuz bilinen antijenimize karşı spesifik olduğunu gösterir. (Şekil.29)

Klasik olarak kullanılan bu yöntemler dışında antijen aranması için indirekt elisa yöntemi de kullanılmaktadır. Bu tekniğin aşamaları genel olarak şöyledir (Bkz.şekil.28).

a. Mikroelisa tablalarının her bir kuyucuğuna 200 µl bilinen antikor konur.

b- 4 °C'de bir gece inkubasyona bırakılır.

c- İnkubasyon sonrası mikroelisa tablasının tüm kuyucukları boşatılır ve PBS – Tween ile doldurulur, 10 dakika beklenir. Sonra PBS tween boşaltılır. Yıkama olarak tanımlanan bu işlem toplam 3 kez yapılır. Son yıkamadan sonra mikroelisa tablaları kuruması beklenir.

d- Şüpheli virus içeren her numune için mikroelisa tablalarından bir kuyucuk seçilir ve bu kuyucuklara şüpheli numunelerde 100 µl konur. Ayrıca pozitif ve negatif kontrol içinde kuyucuklar seçilir. Bu kuyucuklara pozitif ve negatif olarak seçilen maddelerden konur.

e-Daha sonra mikroelisa tablası nemli bir ortamda 37 ° C' de 90 dakika inkubasyona kaldırılır.

f- İnkubasyon sonrası mikroelisa tablasının tüm kuyucuklar boşatılır ve PBS – Tween ile 3 kez yıkanır ve kurutulur.

g- Tüm kuyucuklara biotin ile konjude edilmiş 100 µl antikor konur.

h- Daha sonra mikroelisa tablası nemli bir ortamda 37 °C'de 60 dakika inkubasyona kaldırılır

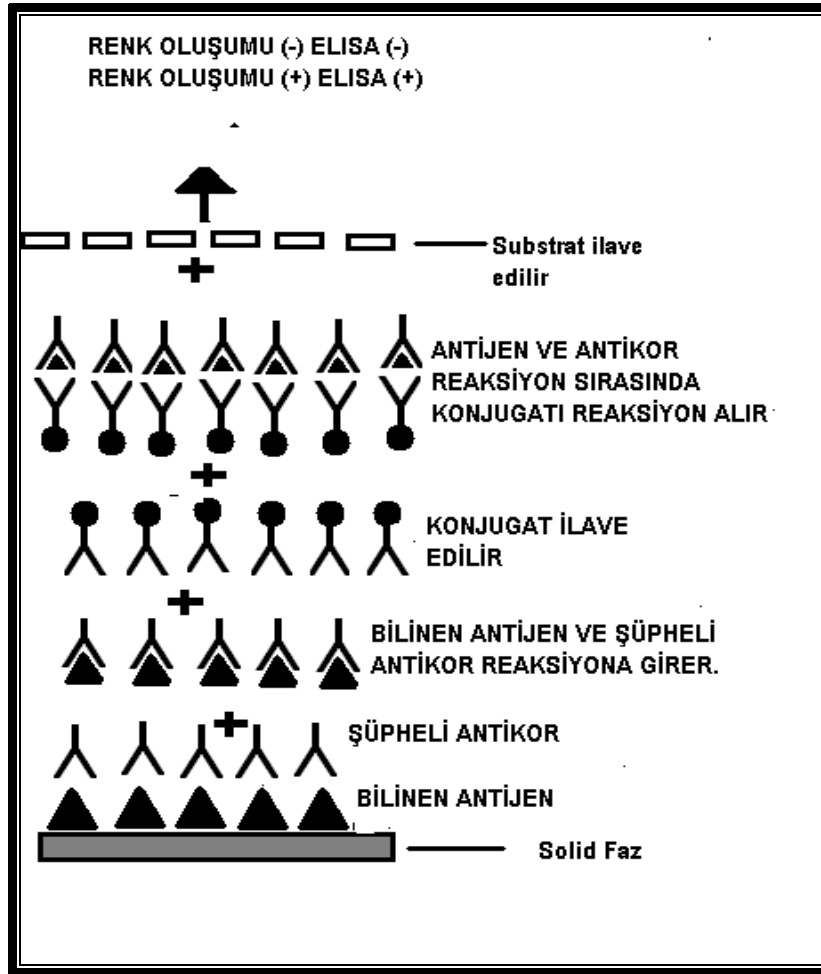
i- İnkubasyon sonrası mikroelisa tablasının tüm kuyucukları boşatılır ve PBS – Tween ile 3 kez yıkanır ve kurutulur.

j-- Tüm kuyucuklara 100 µl avidin ile işaretlenmiş enzim ilave edilir.

k- Daha sonra mikroelisa tablası nemli bir ortamda 37 °C'de 60 dakika inkubasyona kaldırılır.

l- İnkubasyon sonrası mikroelisa tablasının tüm kuyucukları boşatılır ve PBS – Tween ile 3 kez yıkanır ve kurutulur.

m- Tüm kuyucuklara 100 µl substrat konur.



Şekil28.İndirekt Elisa Metodu



Şekil 29. Elisa testinde mikroelisa tablasında pozitif reaksiyon

n- Nemli bir ortamda 37 °C'de 30 dakika inkubasyona kaldırılır.

o- İnkubasyon sonrası tüm gözlere 50 µl reaksiyonu durdurmak amacı ile stop solusyon konur.

ö- Mikroelisa tablası elisa okuma cihazlarında 450nm, 490nm ya da 620 nm lik filtrelerden biri ile okunarak optik dansite değerleri yani absorbanları tespit edilir. Oluşan renk reaksiyonlarına ve elde edilen optik dansite değerlerine göre reaksiyon değerlendirilir.

ELISA testinin rutin tanı laboratuvarlarında çok fazla tercih edilen bir metot olması üç önemli özelliğinden dolayıdır. Bunlar testin yüksek derece hassas bir test olması, pratik olarak kolay yapılabilmesi ve yüksek derece spesifitesinin olmasıdır.

İMMUNPEROKSİDAZ TESTİ (IP)

İmmunositokimyasal boyama teknikleri işaretli antikorlar ile lokalize olduğu yerde antijenin tespiti için sensitiv ve duyarlı laboratuvar tanı yöntemleridir. Immunperoksidaz testi antijen ile konjuge edilmiş antikorların ve peroksidaz enzimin varlığında verdikleri reaksiyonunun doku sistemlerinde görüntülenmesidir. Enfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılan hızlı yöntemlerden bir tanesidir. Testin gerçekleşmesinde iki temel evre vardır. Bunlardan birincisi, antijen ile antikor arasında spesifik bir reaksiyonun oluşması, bunu takiben eden evrede ise, substrat maddesi hücre yüzeyine verildiği zaman burada bulunan peroksidaza bağlı olarak oksidasyon şekillenmesi ve kahverengi rengin oluşmasıdır. IP testi enterovirus, RSV, papillomavirus, herpesvirus içinde bulunduğu bir çok virus grubunun ve özellikle pestivirusların laboratuvar tanısında kullanılır.

IP testi “ direkt “ ve “ indirekt “ olmak üzere iki yöntemle yapılır.

1- Direkt İmmunopreoksidaz Test:

Özellikle şüpheli antijeni tespit etmek amacıyla yapılır.

a- 96 kuyucuklu mikrotitrasyon tablalarında hücreler üretilir.

b- Şüpheli virus izolatları birer kuyucuğa inokule edilir.

c- 37 ° C’ de 1 saat inkubasyona bırakılır.

d- İnkubasyon sonrası kuyucukların içinde bulunanlar dökülür. Tüm kuyucuklar PBS ile bir iki kez yıkanır.

e- Peroksidaz enzimiyle işaretlenmiş spesifik antikorlar yani konjugat ilave edilir. 30 dakika inkubasyona bırakılır.

f- İnkubasyon sonrası kuyucukların içinde bulunanlar dökülür ve tüm kuyucuklar PBS ile bir iki kez yıkanır.

g- Substrat ilave edilir.20 dakika beklenir.Daha sonra sonuçlar değerlendirilir.Hücre içinde meydana gelen kahverengi renk oluşumu pozitifliği gösterir.

2- İndirekt İmmunperoksidaz testi :

Antijen ya da antikor tespiti için kullanılır.

A - 96 kuyucuklu mikrotitrasyon tablalarında hücreler üretilir.

B- Bilinen virus birer kuyucuğa inokule edilir.

C- 37 ° C’ de 1 saat inkubasyona bırakılır.

D- Şüpheli serum kuyucuklara ilave edilir.

E- 37 ° C’ de 1 saat inkubasyona bırakılır.

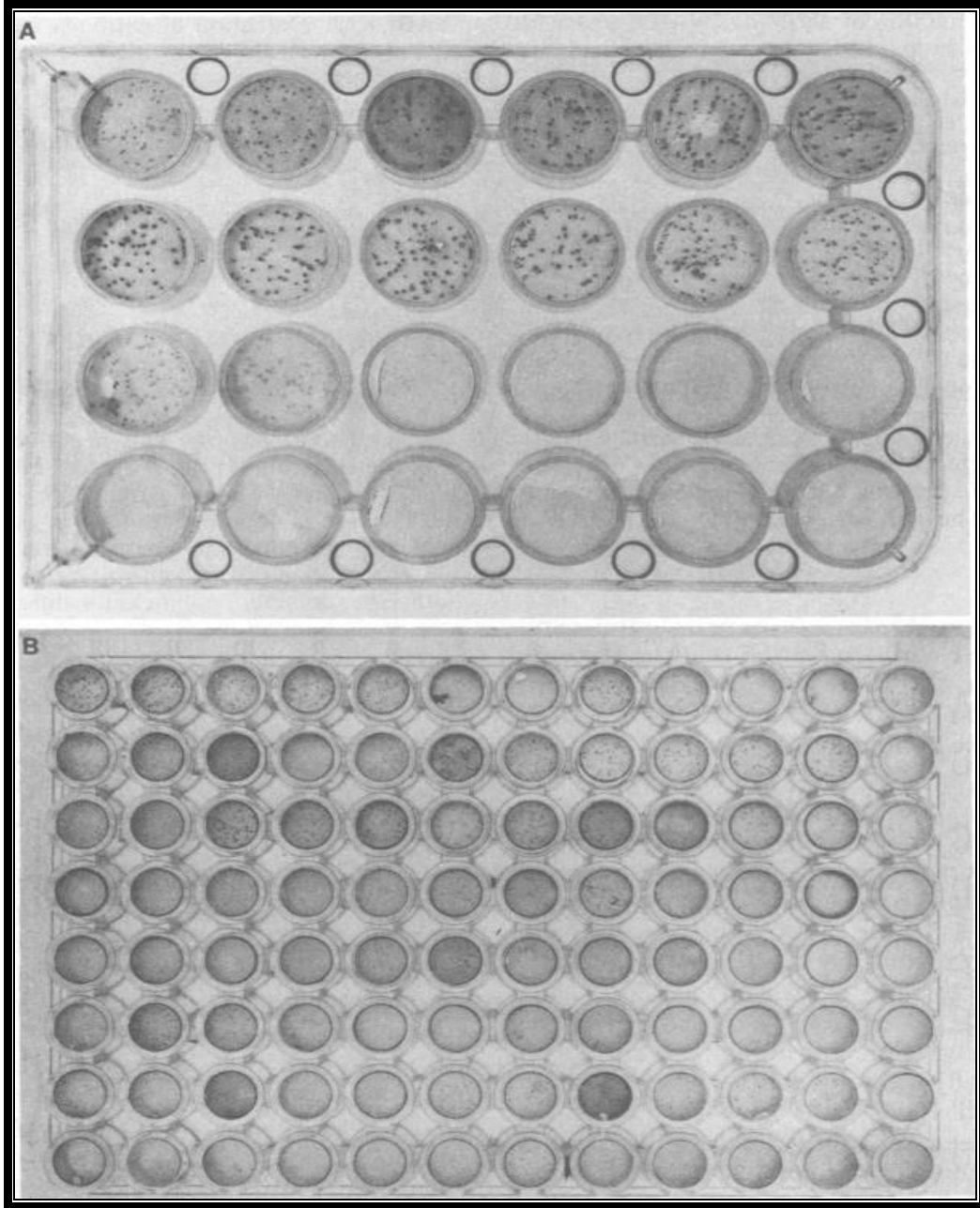
F- İnkubasyon sonrası kuyucukların içinde bulunanlar dökülür. Ve tüm kuyucuklar PBS ile bir iki kez yıkanır.

E- Peroksidaz enzimiyle işaretlenmiş spesifik antikorlar yani konjugat ilave edilir. 1 saat - 37 ° C’ de inukbasyona bırakılır.

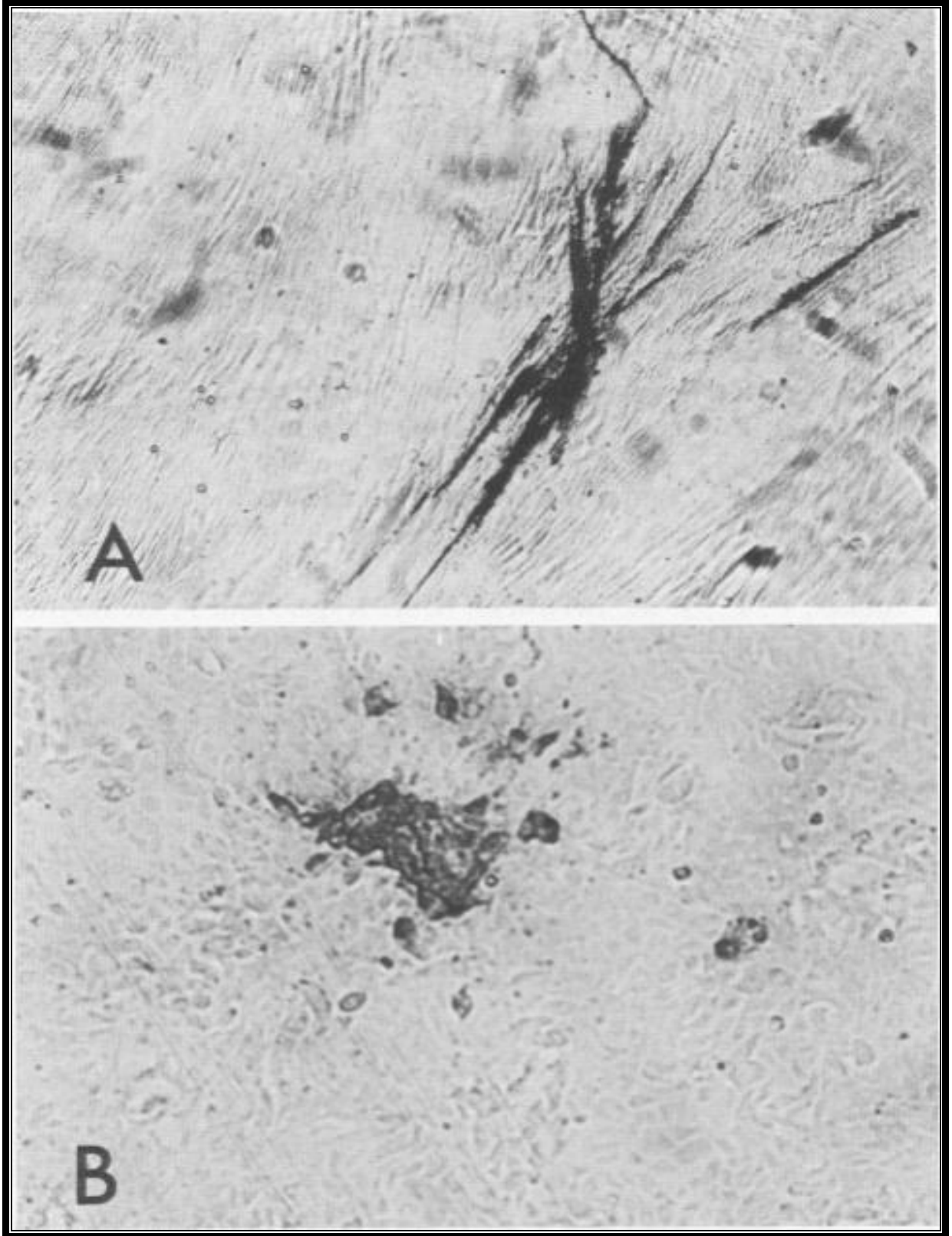
F- İnkubasyon sonrası kuyucukların içinde bulunanlar dökülür. Ve tüm kuyucuklar PBS ile bir iki kez yıkanır.

G- Substrat ilave edilir.20 dakika beklenir. Daha sonra sonuçlar değerlendirilir. Hücre içinde meydana gelen kahverengi renk oluşumu pozitifliği gösterir.

İmmunoperoksidaz tekniği ile yapılan uygulamalarda diğer önemli bir metot ise nötralizasyon immünperoksidaz (NPLA) testidir.



Şekil 30. İmmunoperoksidaz tekniğin mikrotitrasyon tablalarında görünümü



Şekil 31. İmmun peroksida tekniğinin hücre kültürlerinde görünümü: A İnsan fibroblast hücre kültürlerinde RSV antijenleri B:MDCK hücre kültürlerinde Influenza A(M.Warısr'ten alınmıştır)

ELEKTROFOREZ TESTİ

Elektroforez elektrik akımı içeren bir alanda, sabit bir materyal içinde (jel, agaroz jel gibi) moleküllerin ayrılması işlemidir. Günümüzde immunolojik olarak prensipite olabilen materyaların kalitatif ve kantitatif olarak tespitinde kullanılan bir tekniktir. Prensip olarak moleküllerin bulunduğu ortama elektrik uygulanarak yaratılan alanda, moleküllerin üzerinde elektrik alanın gücü ve miktarına uygun ve orantılı bir kuvvet oluşturularak, oluşan bu kuvvet ile moleküllerin kısa bir sürede belli bir hıza ulaşmasını sağlamak amaçlanır. Bu ortak güç ile taşınan partiküller sürtünmeye bağlı direnç engellediği anda durur ve sabitleşir. İşte bu sabitleşme noktasında protein bantları oluşur.

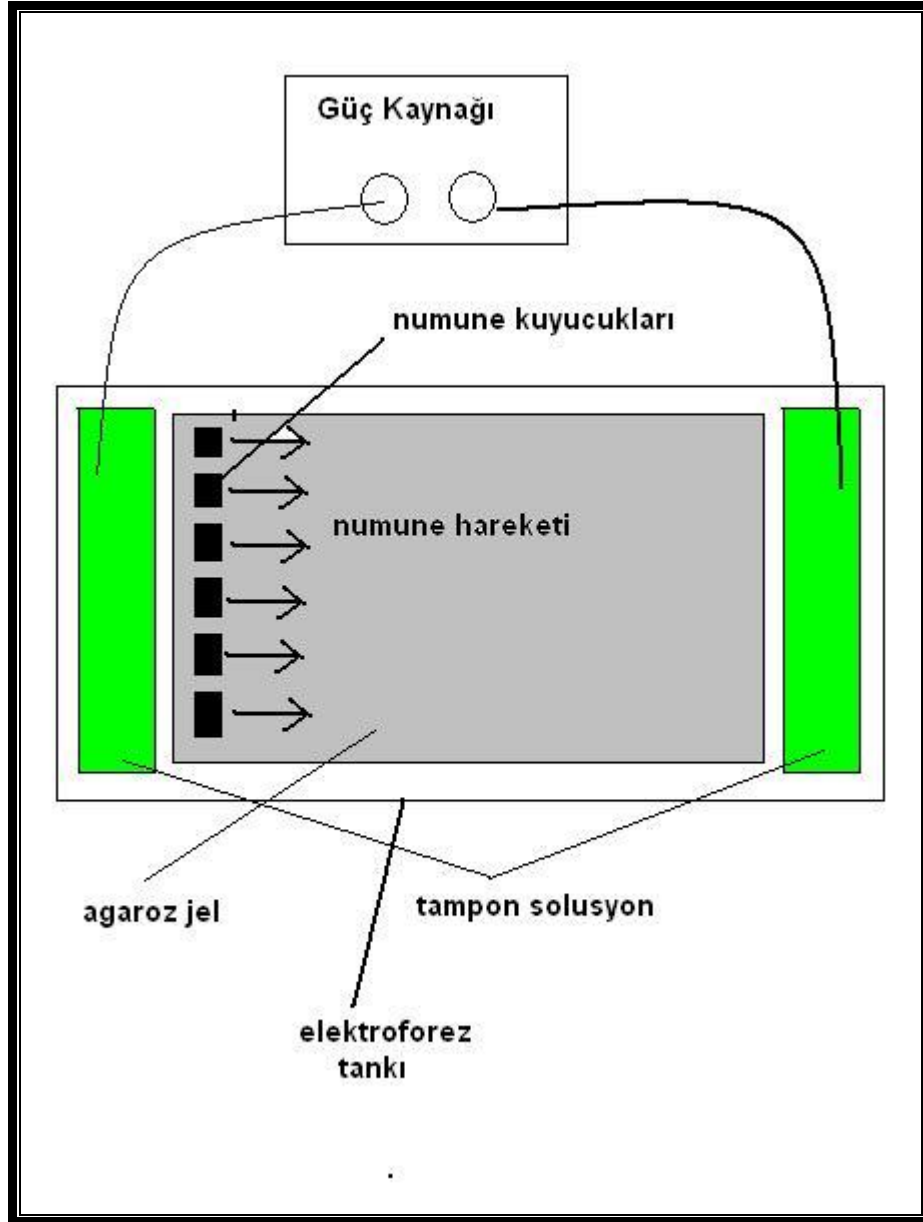
Elektroforez sistemi şu aparatlardan ve kimyasallardan oluşur.

- a- Elektroforez tankı: İçinde elektrotlar bulunur. Katodu ve anodu içeren iki bölüme ayrılır.
- b- Güç kaynağı: Elektroforez için gerekli olan güç 500 volt potansiyel, 200 mA çıkışlı voltaj kaynağıdır.
- c- Elektroforez tablaları: Özel film tabakalardan ya da cam tablalardan oluşur. Testin gerçekleştirildiği yer olarakta tanımlanır.
- d- Destek matriks: Analiz için numunelerin yerleştirildiği ortamdır. Bu ortam polakrilamid jel, agaroz jel, kolojenler, nişasta jel den oluşur.
- e- :Tampon solusyonlar: Elektrik akımını iletmede kullanılır.
- f- Boyalar: Test esnasında oluşan protein bantların görülebilmesini sağlamak için kullanılan boyalardır. Amido Balck, Light gren bazılarıdır.

Elektroforez sistemleri konumlarına göre dikey (vertikal) ve yatay (horizontal) olmak üzere iki şekilde yapılır en fazla kullanılanı vertikal elektroforezdir.

Testin yapılışı:

- 1-Şüpheli izolattan viral DNA ekstrasyon yolu ile ayrılır.
- 2 Elektroforez tablası tankın içine yerleştirilir.
- 3 Daha sonra destek matriksi ya da sabit alan oluşturmak için %2 lik agaroz jel hazırlanır. Agaroz jelin içine etidyum bromür karıştırılır.



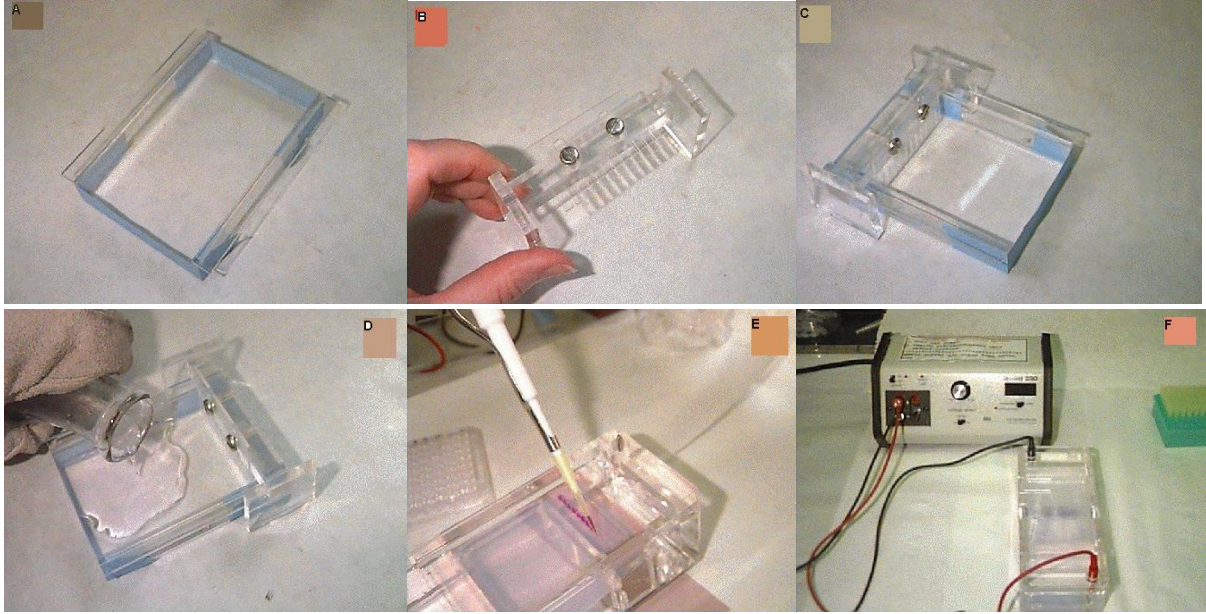
Şekil 32. Agaroze Jel elektroforezin şematik gösterimi

4 Jel elektroforez tankına konur. Tank tampon solusyonu jelin üzerinde kalmalıdır.

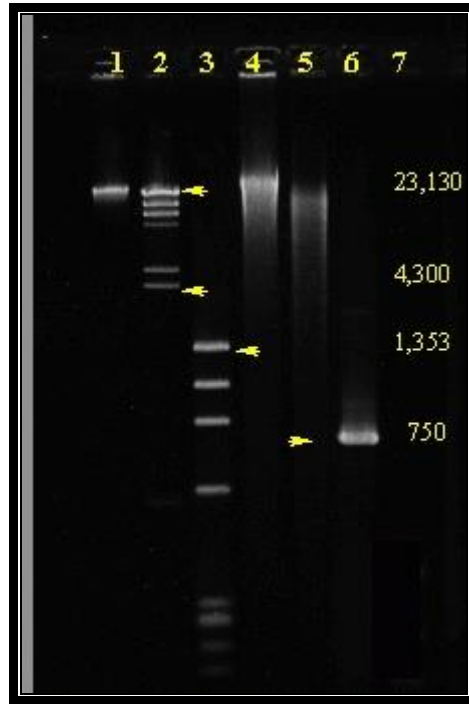
5-10 mikrolitre izollattan elde edilen ekstratlar numune kuyucuklarına yüklenir. Yaklaşık 100 volt altında 10-30 dakika jelde yürütülür.

6- Test sonucu ultraviyole ışık altında jel incelenir. (Bkz Şekil .41-42)

Elektroforezde destek matriksi ya da sabit alan olarak kullanılan agaroze jel bir elek gibi hareket eder. Büyük moleküller agaroze jel içinde daha yavaş, küçük moleküller ise daha hızlı hareket eder. Bu nedenle büyük moleküller jel içinde küçük moleküllerin arkasından hareket edecektir.



Şekil 33. Agar jel elektroforezin yapılış aşamaları :A: Elektroforez tankı B:Elektroforez tablası C:Tablanın tank içine yerleştirilmiş şekli D:Agaroz jelin dökülmesi E: Numnelerin elektroforez tablasına konması F.Güç kaynağı ile birlikte elektroforezin yapılışı



Şekil 34. Agar jel elektroforezde sonuç aşaması

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, ya da kısaca PCR, in vitro ortamlarda polimeraz enzimlerini kullanarak nükleik asitlerin replikasyonunun sağlandığı kimyasal reaksiyonlar olarak tanımlanabilir. Polimeraz Zincir reaksiyonu (PCR), viral nükleik asidin tespitinde kullanılan çok duyarlı ve özel bir laboratuvar tanı yöntemi. 1985 yılında ilk kez kullanılan

bu yöntem geliştirilmesi ile birlikte, adli tıpta, genetikte olduğu kadar virolojide de geniş kullanım sahası bulmuştur. PCR tanı metodu beşeri hekimlikte ilk olarak HIV, hepatitis virüsleri, sitomegalovirus infeksiyonların tanısında uygulanmış daha sonra tüm virüsler için kullanılmıştır. Veteriner hekimlikte yaygın bir kullanım sahası bulunan PCR ilk olarak Auzejký ve kedi herpesvirus infeksiyonlarında kullanılmıştır. Tek bir nükleik asidi bile tespit edebilen bir test olması PCR tanı yönteminin hem gücünü hem de zayıflığını oluşturmaktadır. PCR testi ile tespiti yapılan nükleik asitler çok büyük miktarlara ulaşmaktadır. Herhangi bir nedenle reaksiyon ortamına girecek olan tek spesifik bir nükleik asit parçası etkin şekilde çoğaltılarak yanlış pozitiflik oluşturarak reaksiyonu kontamine edebilmektedir. Bir PCR reaksiyonu için en büyük kontaminasyon kaynağı daha önce elde edilmiş PCR ile elde edilmiş olan ürünlerdir.

PCR reaksiyonun prensibi esas olarak alınan nükleik asit dizilerinin (DNA veya RNA dizileri) in vitro olarak çoğaltılması ve istenmeyen dizilerin ortaya çıkmasının önlenmesidir. PCR reaksiyonunu üç ayrı aşamalı olarak değerlendirebiliriz.

1- Şüpheli materyalin PCR reaksiyonu için hazırlanması: Bu aşamada DNA veya RNA ekstrasyonu yapılır.

2- PCR reaksiyonunda kullanılan çoğaltma karışımı ve diğer çözeltilerin hazırlanması

3- PCR sonrası analiz devresi

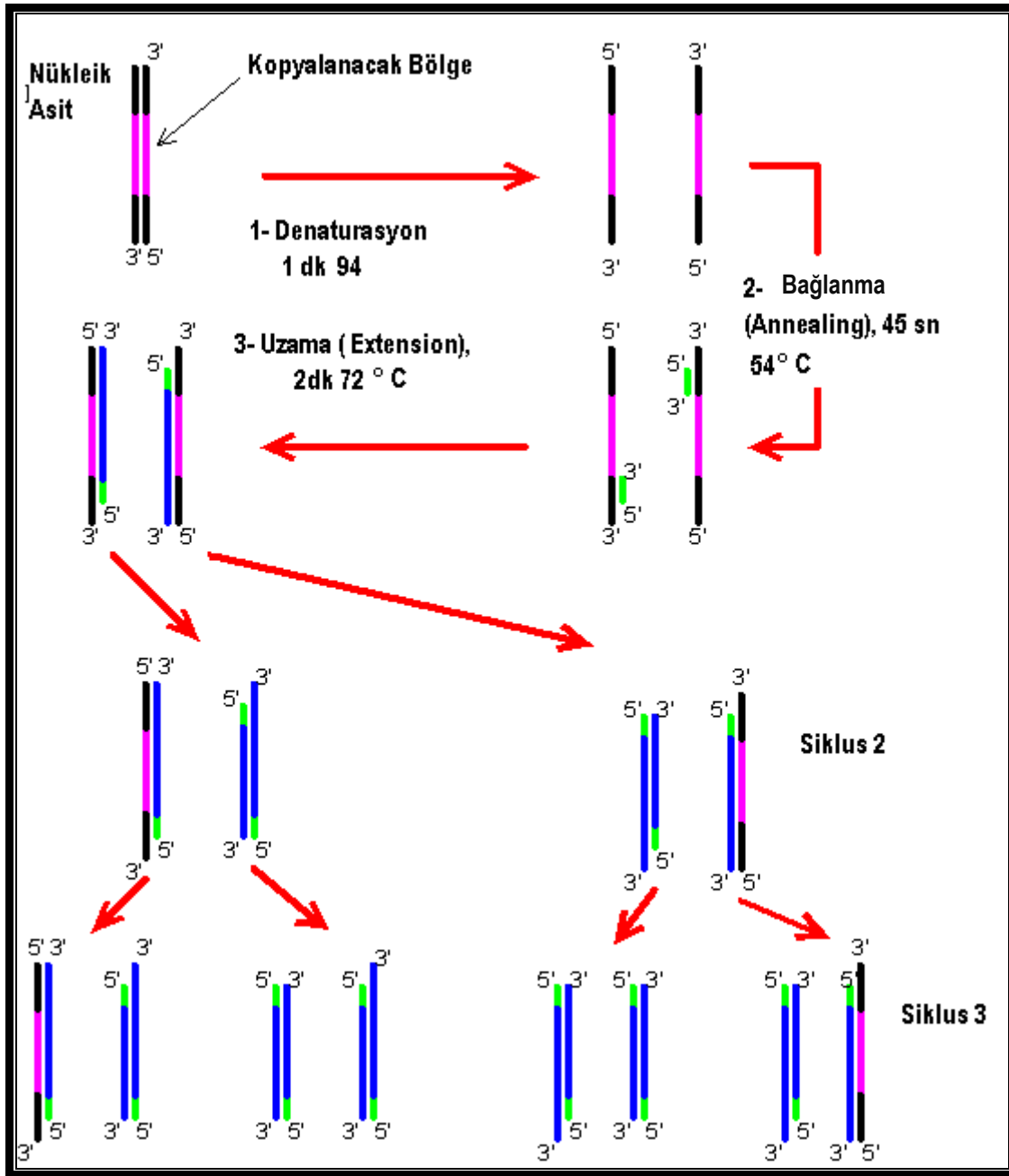
Bu işlemlerin her birinin ayrı bölümlerde yapılması gerekmektedir.

PCR reaksiyonunun tekrar eden 30-40 siklus şeklinde devam eden üç ana evresi vardır. Bunlar termal döndürücüler ile (termal cycler) ile otomatik olarak çok kısa sürede yapılabilmektedir. Kısaca bu önemli evreler şunlardır:

a- Denaturasyon: Bu evre süresince çift iplikçikli DNA çözülerek tek iplikçikli DNA molekülü şekline gelir. Bu reaksiyon 94 ° C de 1 dakika süreyle olur. Bu devre sırasında tüm enzimatik reaksiyonlar durur.

b- Bağlanma evresi (Annealing): Denaturasyon evresinden sonra ayrılarak tek iplikçikli hale gelen nükleik asit molekülüne iki ayrı primerin bağlandığı evredir. Bu primerler küçük, 20-30 baz çifti içerir ve sentetik olarak üretilebilir. Bu primerler seçildikten sonra biri üst zincire diğeri alt zincire bağlanır. Yumuşama evresi genellikle 40 ° C - 60 ° C dereceleri arasında olur ve baz uzunluklarına ve baz zincirlerinin dizilimine bağlıdır.

c- Uzama (extension): Polimeraz enzimleri kalıp DNA moleküllerinin tamamlanması amacıyla nükleotitlere bağlanır ve netice hedeflenen zincirinin yönetiminde uzama başlar. Bu enzimatik reaksiyon orijinal hedef DNA zincirinden, iki adet yeni zincir oluşturur. Bu zincirlerin oluşması ile birinci siklus biter. Hedef DNA kopyalarının sayısı her siklуста ikiye katlar. Örneğin 25 siklus içeren bir tekrarda tek bir hedef DNA molekülünden 100 000 kopyadan fazla elde edilir.



Şekil 35. Polimeraz Zincir reaksiyonunun evrelerinin şematik gösterimi

PCR reaksiyonu ile viral RNA genomundan RNA'nın arttırılmasında ise yumuşayan primerlerin RNA kalıbı oluşturması gerekir ve sonra ters transkriptaz enzimini kullanarak komplementar DNA (c DNA) sentezi şeklinde siklus oluştururlar. PCR reaksiyonunun bir çok avantajı vardır. Çok duyarlı bir testtir ve düşük miktardaki genom zincirini tespit edebilir. Dizayn edilmesi kolaydır. Zamandan tasarruf sağlar. Dezavantajları ise kontaminasyon riski yüksek bir testtir. Kalifiye elemanlara ihtiyaç duyulan bir tekniktir. Bazı latent infeksiyonlarda pozitiflik değerlendirmesinde güçlük yaşanabilir.

5- MONOKLONAL ANTİKORLAR

Monoklonal antikorlar, biyomedikal araştırmalarda , infeksiyon hastalıklarının ve kanserin tanı ve tedavisinde kullanılan önemli maddelerdir. Bu antikorlar hücre kültürlerinden ya da hayvanlardan elde edilen klonlardan üretilir. Elde edilmesi istenen

monoklonal antikorlar ya in vivo olarak uygun olarak hazırlanmış farelerin peritoneal boşluğuna injeksiyon yolu ile (fare - ascites metodu) ya da in vitro olarak hücre kültürlerinde üretilir. İn vivo metot bir çok laboratuvar da yaygın olarak kullanılmasına rağmen bakım şartlarının zor olması, stres faktörleri ve ascites sıvısının tüm karın bölgesine yayılma riski taşımamasından dolayı yapımı daha zordur. İn vitro metot pahalı bir metot olmasına rağmen purifikasyon ve hatalı antikor üretim riski daha az olduğundan dolayı tercih edilir.

Prensip olarak monoklonal antikorlar virusun uyandırdığı B lenfositlerden oluşan plazma hücrelerinin yine bir plazma hücresi kanseri olan myelomalardan elde edilen hücreler ile füzyon yoluyla birleşerek devamlı antikor sentezleyen ve hibridoma olarak bilinen hibrit hücreler oluşumları sonrası elde edilirler.

Füzyon olayı ile immunize edilmiş farelerden antikor sentezleyen ancak üremeyen plazma hücreler ile myelomalardan antikor sentezlemeyen ancak üreyen hücreler bir araya getirilir. Elde edilen bu yeni hücre hibrit bir hücredir. Hibridoma adı verilen bu hibrit hücreden çeşitli virüslara karşı spesifik monoklonal antikorlar elde etmek mümkündür.

Monoklonal antikor hazırlanması şu basamakları içerir.

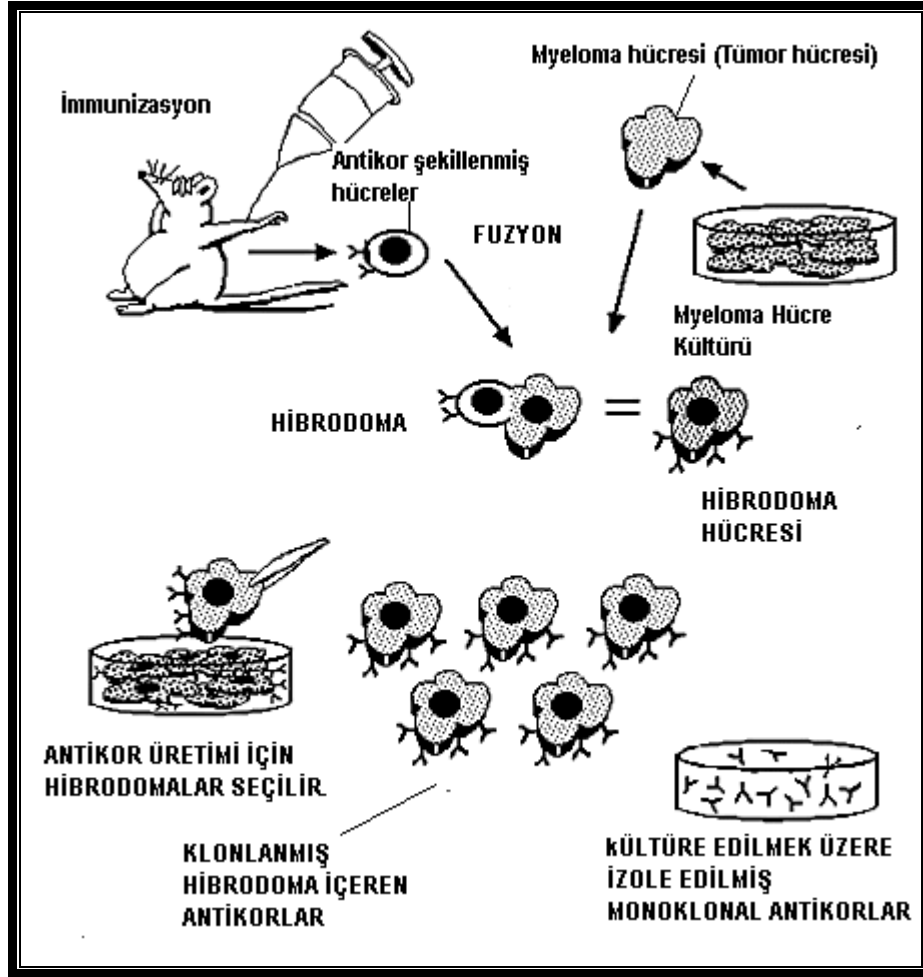
1- İmmünizasyon: Fareler antijen kullanarak immunize edilir. İmmünizasyon için kullanılan antijenler ya Freund's adjuvant veya diğer adjuvantler tarafından emülsiyon haline getirilmiş ya da jel içinde homojenize edilir.

2- Antikor üretimi için farelerin seçilmesi: İmmünizasyondan birkaç hafta sonra, immunize edilen farelerden serum antikor seviyelerinin tespit edilmesi için kan numuneleri toplanır. Serum antikor titreleri ELISA ve flow sitometri gibi çeşitli tekniklerle tespit edilir. İmmünizasyon sonrası farelerde antikor titresi yüksek ise hücre birleşmesi gerçekleşebilir; eğer antikor titresi düşük ise fareler uygun antikor yanıtı oluşuna kadar immunizasyona devam edilir. Eğer antikor titresi yeterli seviyeye ulaşırsa , fareler adjuvant içermeyen antijen ile intraperitoneal ya da intravenöz (kuyruk venası) olarak immune edilir. Bu arttırıcı injeksiyonun ilk yapılan immunizasyondan 2 hafta sonra, fakat füzyon olayından 3 gün önce yapılmamalıdır. Daha sonra farelere ötanazi yapılır ve dalak hücreleri in vitro hibridoma hücrelerinin üretimi için çıkarılır.

3-Myeloma hücreleri hazırlanması: Antikor üreten dalak hücreleri lenfositlerin immortal tümörlerinden elde edilen hücreler ile füzyon yolu ile birleştiklerinde sınırsız üreme yeteneğine sahip hibridoma hücreleri şekillenir. Myeloma hücreleri immortal hücrelerdir. Bu hücreler sensitiviteyi korumaları amacı ile 8-azoguanin ile kültüre edilirler. Hücre füzyon olayından bir hafta önce myeloma hücreleri 8-azoguanine içinde üretilirler. Bu hücreler yüksek oranda canlılığa ve yüksek büyüme hızına sahiptir. Füzyon olayı birleşen hücreler için ise hipoksantin aminopterin timidin (HAT) vasatı kullanılır. Bu vasat kültüre edilen füzyona uğramış hücrelerin canlılığını devam ettirir.

4-İmmünize edilmiş dalak hücreleri ile myeloma hücrelerinin füzyonu: İmmünize edilen fareden elde edilen dalak hücreleri önceden hazırlanmış dalak hücreleri ile füzyon yolu ile birleştirirler. Füzyon olayı hücre membranlarını eritme özelliğine sahip polietilen glikol (PEG) içinde myeloma hücreleri ile dalak hücrelerinin taze olarak ortak santrifüjü ile olur. Birleşen hücreler özel seleksiyon vasatı olan HAT içinde çoğalacaktır. Bu hücreler farelerin yıkanmış peritoneal tuzlarından elde edilen besleyici hücreler içeren 96 kuyucuklu tablolara

dağıtılır. Besleyici olan hücrelerin büyüme faktörü olarak katkı yapısına ve bu katkısıyla hibridoma hücrelerinin büyümesini arttırdığına inanılır.



Şekil 36. Monoklonal Antikor üretimi

5- Myeloma hücrelerinin klonlanması: Bu adımda, 96 kuyucuklu tablolardan seçilen hibridoma kümeleri, antijen bağlanması ya da daha sonra ascites metodu ile klonlanmak üzere üretilmek için doku kültürlerinde üretilir.

Bu basamakların ardından elde edilen antikorların saflaştırılması ve etkinlik kontrolü yapılır.