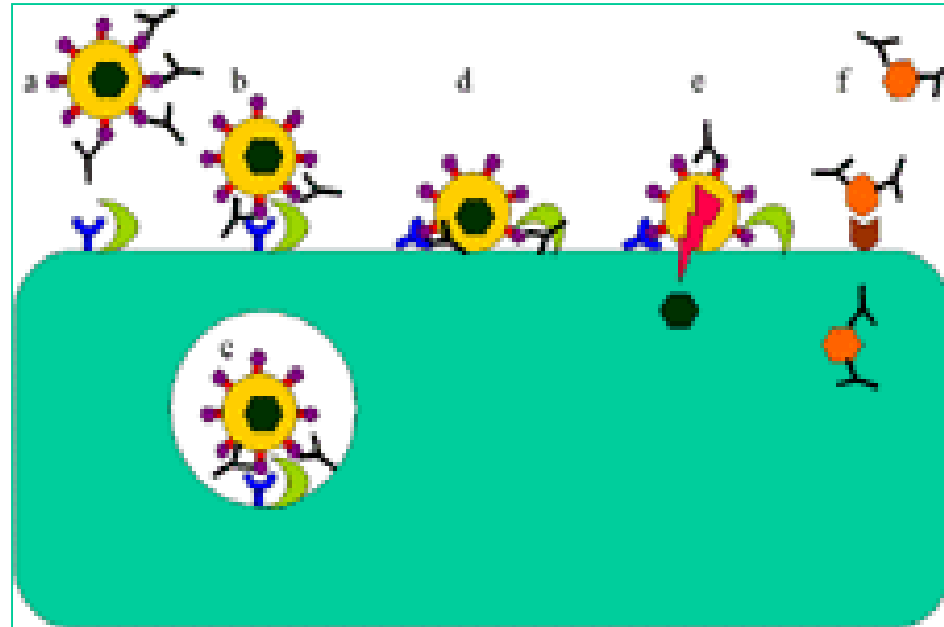
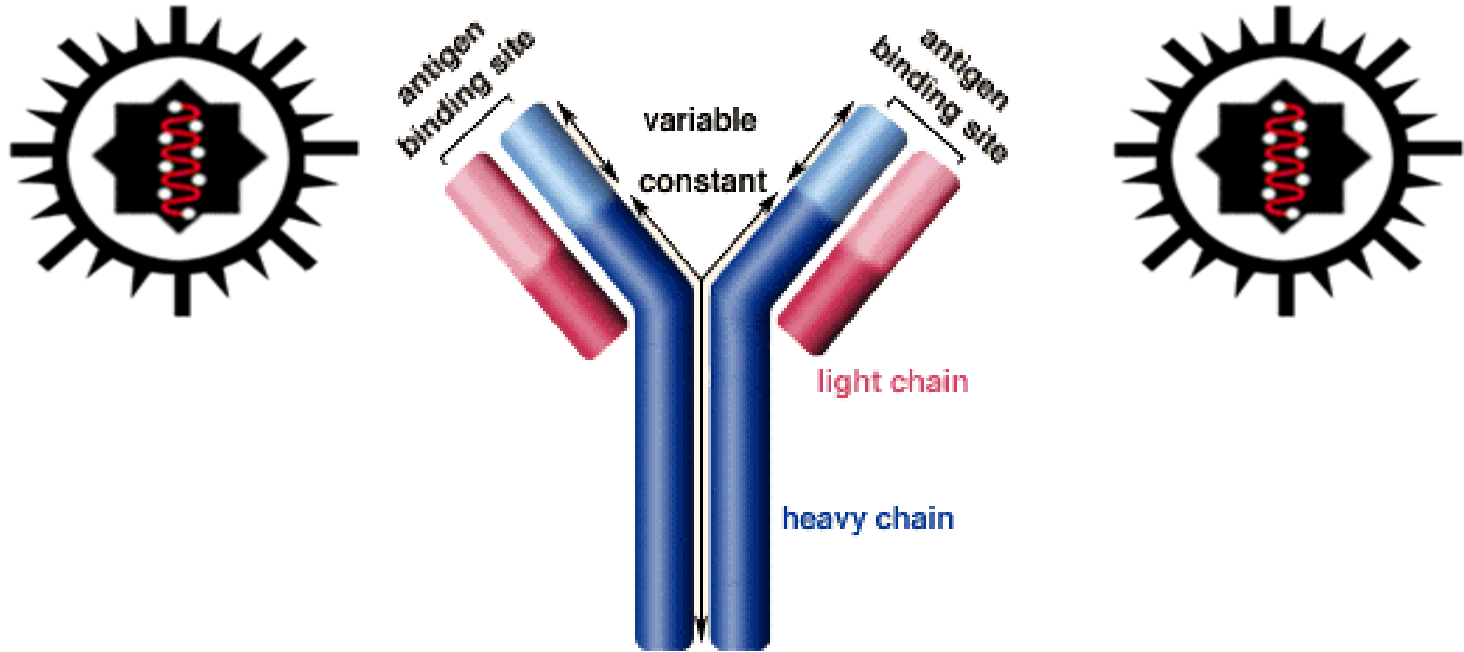


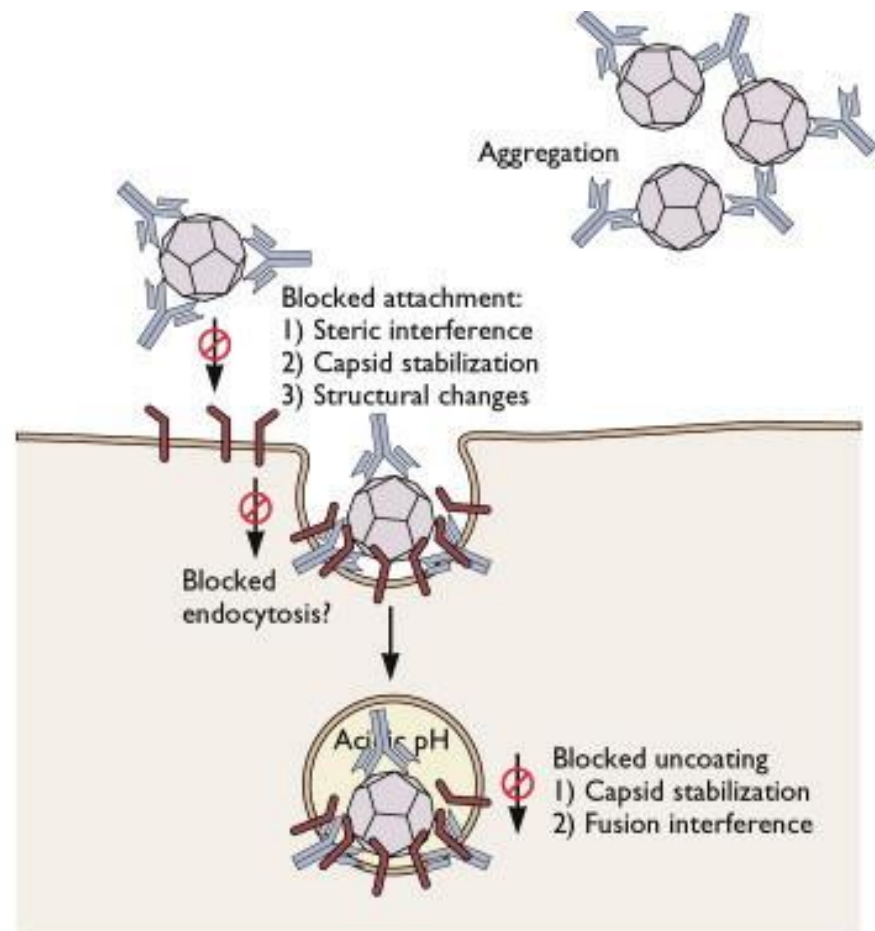
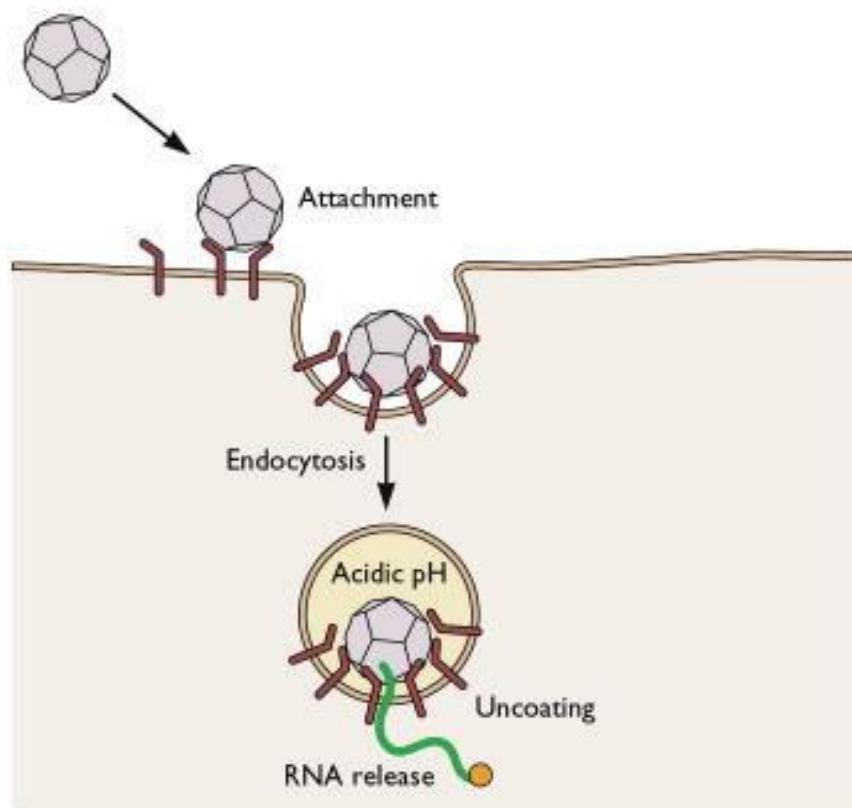
NÖTRALİZASYON



Antijen nedir? Organizmaya girdiğinde immun yanıtı neden olan moleküller. (=Virus)

Antikor nedir? Organizmaya giren antijen özelliğindeki maddelere karşı spesifik olarak sentezlenen immunglobulin karakterindeki maddeler.





Virus enfeksiyonlarının farklı sonuçları olabilir;

- (1) konakçı savunmalarına karşı yenilmeden enfektif kalabilirler.
- (2) latent olarak veya düşük virus replikasyonu düzeyinde kalabilirler.
- (3) konakçı organizmadan elimine edilebilirler.

Antijen - Antikor birleşmesine ve stabilitesine
çeşitli faktörler etkili olmaktadır:

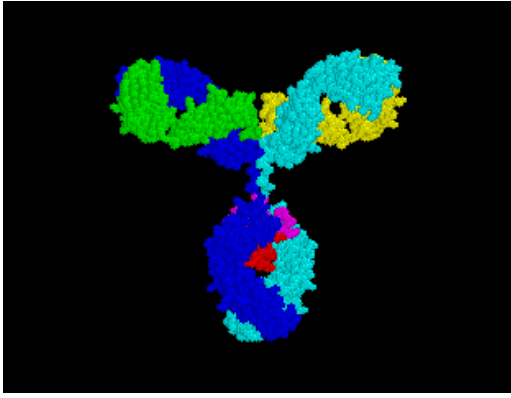
Ortamin pH'sı ve iyonik güçler

Antijen-antikor bağlantı yüzeyinde elektriksel
değişimler

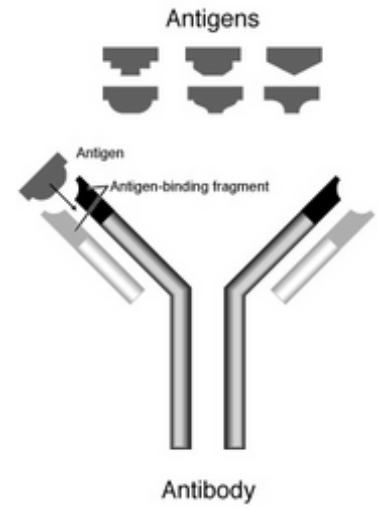
Isı

Antijen-antikor reaksiyonunun hızı

Organik eriyikler (propionik asit, asetik asit vs.):
yüzey geriliminde düşme ve Van der Waals
kuvvetlerinin ortadan kalkması



Antikorlar

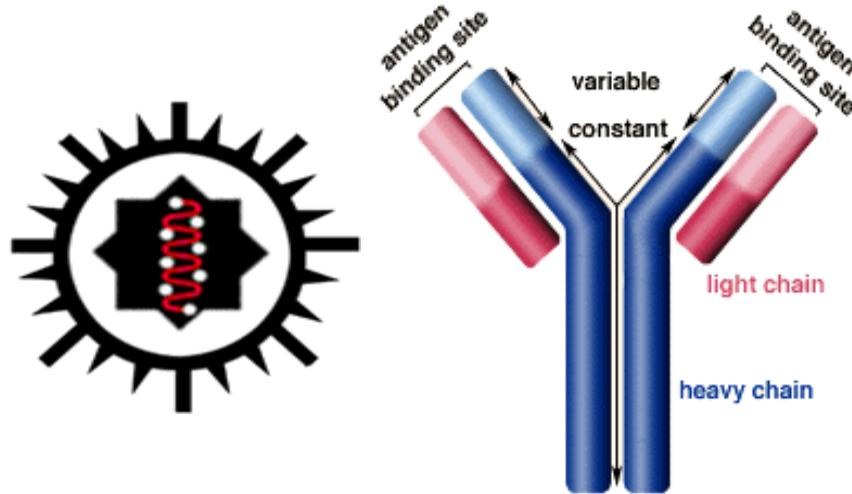


Virusların organizmadan elimine edilmesinde hücresel ve humoral bağışıklık önemli rol oynamaktadır.

Antikor molekülleri, immun kompleksler oluştururken antijenik determinantlarla geriye dönüşümlü olarak birleşirler. Bu reaksiyonların saptanması serolojinin temelini oluşturur.

Antijen antikor bağlanması sırasında şekillenen bağlar kuvvetli olmadığı için antijen antikor reaksiyonu geriye dönüşümlüdür (reversible) ve kompleks (Ag-Ab) ayrışabilir.

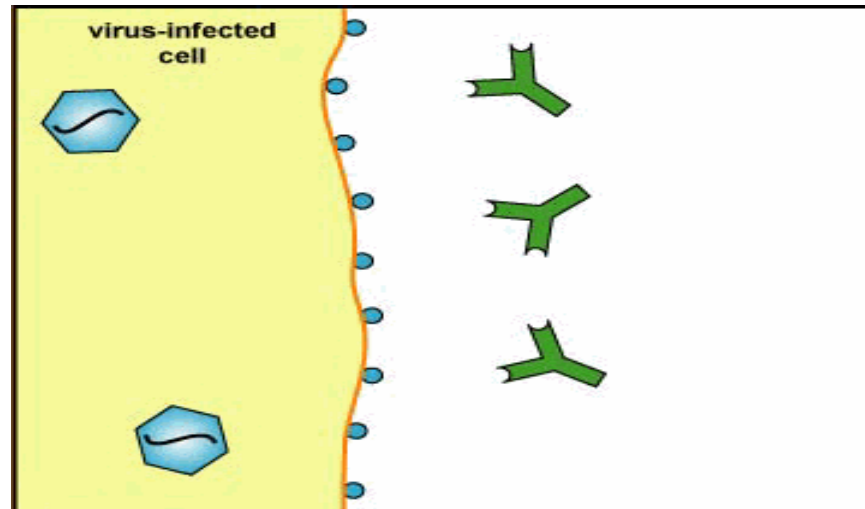
Birleşme esnasında antijenik determinantların (epitop), antikorların Fab bölgeleriyle (paratop) yapısal olarak uyuşması oldukça önem taşır. Bu ilişki aynen bir **kilit-anahtar** ilişkisine de benzetilebilir.



Nötralizasyon deneylerinin prensibi:

- Kan serumunda bulunan ve virusların yüzeyindeki reseptörleri bloke edebilecek nötralizan antikorların tespiti
- İnhibe edilmiş virusların hücre hatlarını enfekte edememesi

Nötralizasyon tanım: Enfeksiyon meydana getirme gücüne sahip olan bir virusun, in vivo ve in vitro sistemlerde homologu olan antikorlar tarafından enfeksiyözitesinin bloke edilmesidir.



Virus replikasyon siklusunda bloke ettikleri olaya göre nötralizasyon sınıflandırılabilir:

I.Adım : Virusun reseptörler veya yardımcı moleküller aracılığıyla duyarlı hücreye tutunmasının antikorlar tarafından engellenmesi

II.Adım : Virusun duyarlı hücreye tutunması sonrasında antikorların reseptörler ve ko-reseptörlerle etkileşimleri

III.Adım : Endositoz ile virion ve beraberinde yüzeyine tutunmuş antikorların hücre içine alınmalarının azaltılması

IV.Adım : Zarflı virusların endozomal veziküller içine füzyonu sırasında antikorlar tarafından füzyon proteini etkileşimlerinin engellenmesi

V.Adım : Kapsit üzerindeki örtücü katmanların antikorlar tarafından ortadan kaldırılması

VI. Adım : Virion yüzeyine tutunmuş antikorlar tarafından transkripsiyonun engellenmesi

UYGULAMA

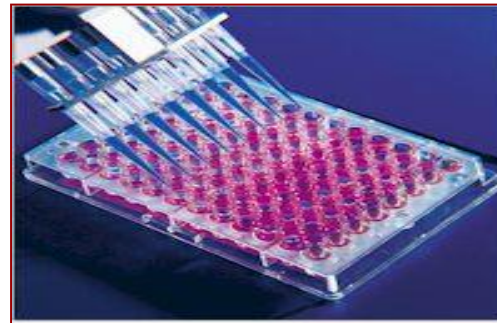
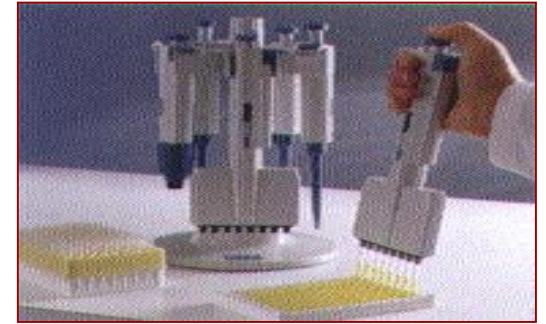
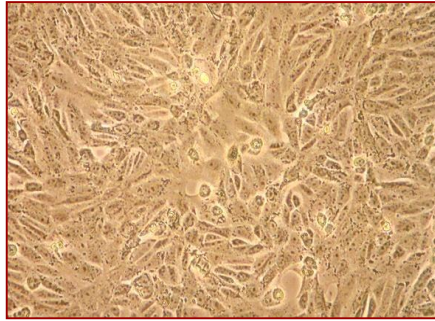
NÖTRALİZASYON

Konakçı sistemlere göre nötralizasyon 2 şekilde yapılabilir:

1- In vivo nötralizasyon

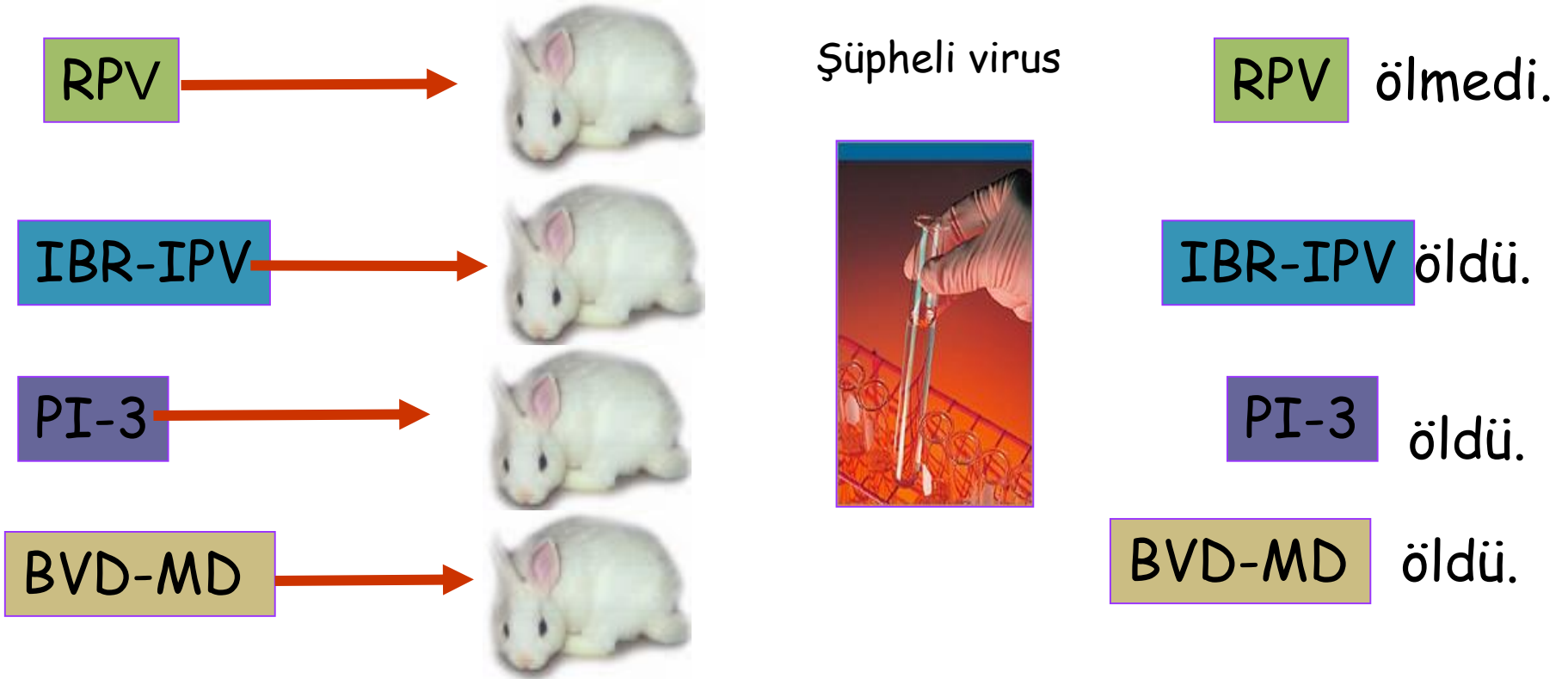


2- In vitro nötralizasyon



1- In vivo nötralizasyon

Çeşitli viruslar verilerek bağışık kılınmış deneme hayvanları;



*Şüpheli virus sığır vebası (RPV) virusudur.

2- İn vitro nötralizasyon

A- Makronötralizasyon

I- Serum sulandırma metodu. (şüpheli serum, bilinen virus)

II- Virus sulandırma metodu. (Şüpheli virus, bilinen serum)

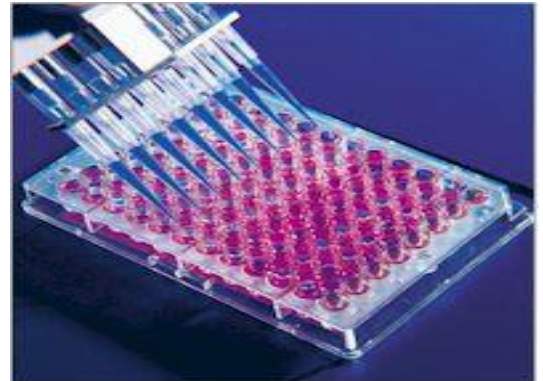
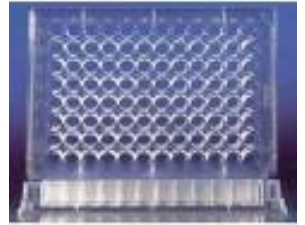


2- In vitro nötralizasyon

B- Mikronötralizasyon

I- Serum sulandırma metodu. (şüpheli serum, bilinen virus)

II- Virus sulandırma metodu. (Şüpheli virus, bilinen serum)



A- Makronötralizasyon

I- Serum sulandırma metodu.

(Şüpheli serum, Bilinen virus)

(Öncelikle **Serum İnaktivasyonu** yapılmalıdır.)

Şüpheli serumda antikor varlığını tespit etme:



Şüpheli serum (RPV ?)



1 cc şüpheli serum
1 cc PBS

1/2



Virusun titresi tespit edilir ve
100DKID₅₀ oranında sulandırılır.

Bilinen virus (RPV)



← 2 cc. Bilinen virus

← 1cc. Şüpheli serum

← 1 cc. PBS

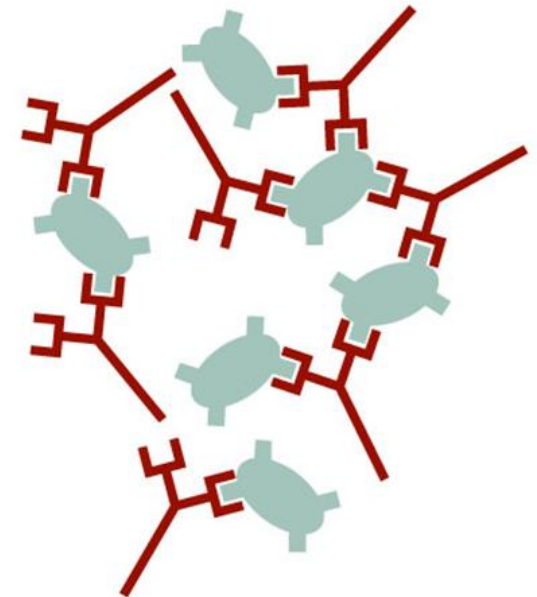
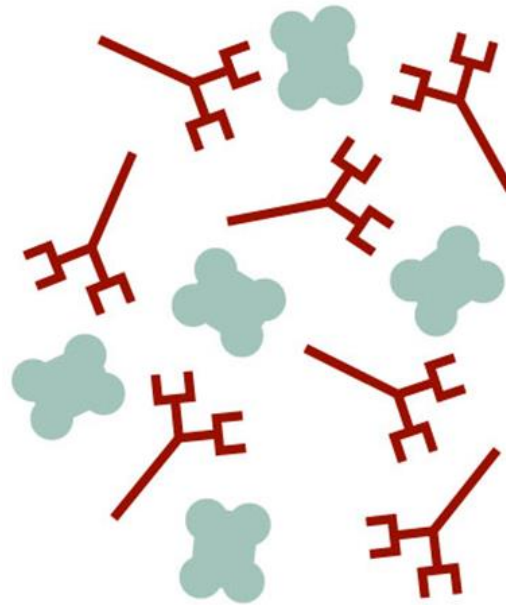


Oda derecesinde 2 saat, etüvde 1 saat bekletilir; en az 4 adet doku kültürüne ekim yapılır. Hücre ve virus kontrollerle birlikte inkube edilir.

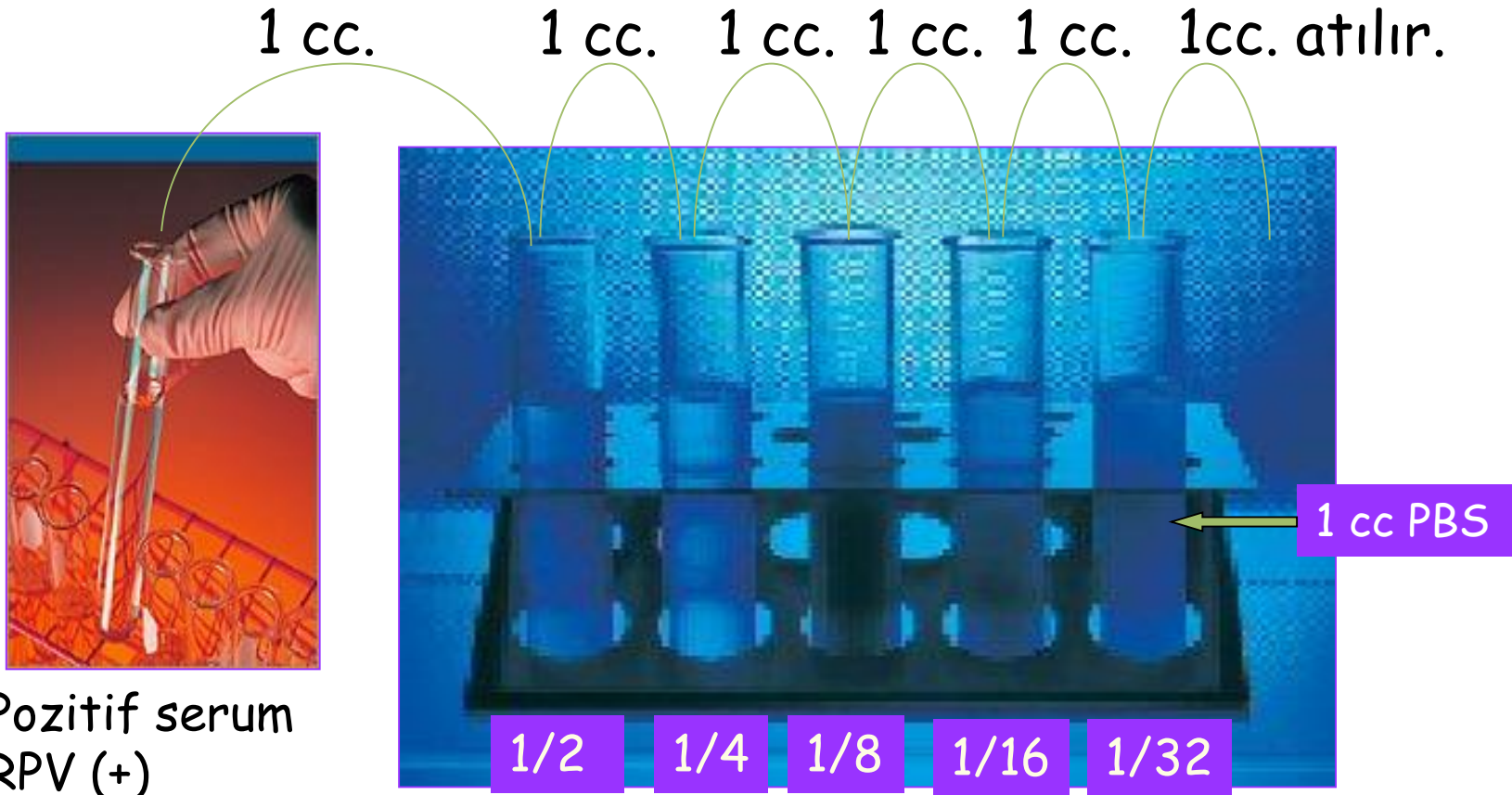
Değerlendirme:

Şüpheli serum	CPE	Nötralizasyon
Sığır vebası (+)	(-)	(+)
Sığır vebası (-)	(+)	(-)

- Pozitif Serum
- Negatif Serum
- Tip Spesifik Serum
- Hiperimmun Serum



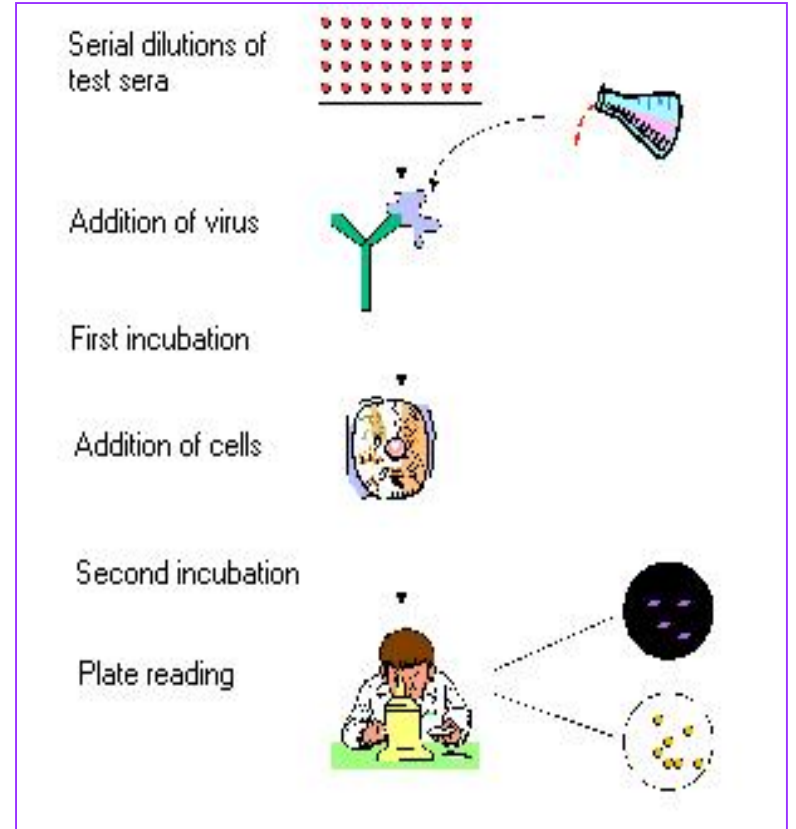
Pozitif serumda SN₅₀ Tespiti





Her tüpe virusdan 1 cc. konur. Oda ısısında 2 saat veya 37°C de 1 saat bekletildikten sonra 4 adet doku kültürüne ekim yapılır. Hücre ve virus kontrollerle birlikte 37°C de viruslara göre değişen sürelerde inkubasyona bırakılır.

Sığır vebası virusu
100DKID₅₀ oranında sulandırılır.



II- Virus sulandırma metodu. (Şüpheli virus, bilinen serum)



Şüpheli virus
(100DKID₅₀)



Bilinen serum
(SN₅₀)

Şüpheli virus ve bilinen serum eşit hacimde (1^{er} cc.) bir araya getirilir. Etüvde 1 saat veya oda ısısında 2 saat bekletildikten sonra doku kültürlerine ekim yapılır.



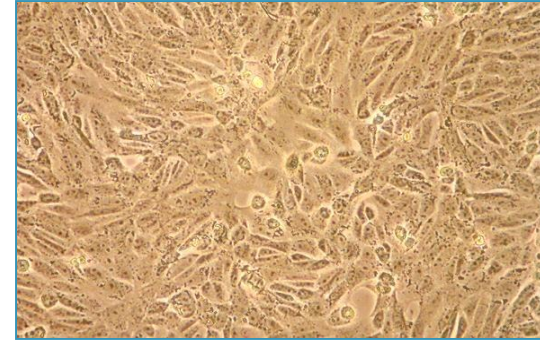
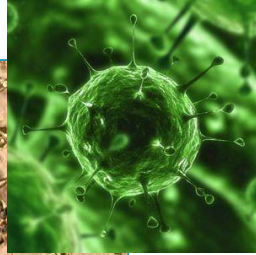
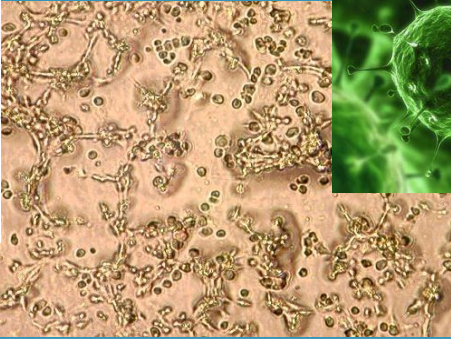


Değerlendirme:

Şüpheli virus	CPE	Nötralizasyon
Sığır vebası (+)	(-)	(+)
Sığır vebası (-)	(+)	(-)



Rinderpest virus:
Order: Mononegavirales,
Family: Paramyxoviridae,
Genus: Morbillivirus



CPE(+) Nötralizasyon(-)

CPE(-) Nötralizasyon(+)

B- Mikronötralizasyon

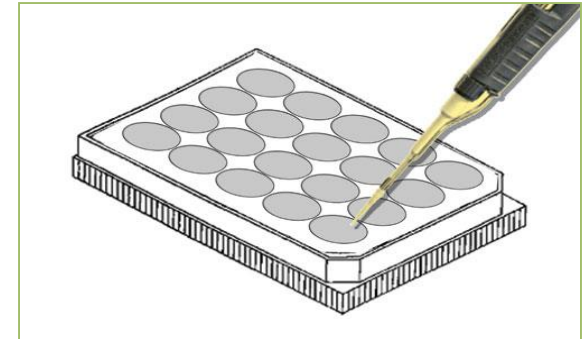
I- Serum sulandırma metodu. (şüpheli serum, bilinen virus)

Makronötralizasyonda olduğu gibi $\frac{1}{2}$ oranında sulandırılmış serum mikropleytlere **0.05 ml** oranında aktarılır. Üzerine eşit hacimde **100 DKID₅₀** oranında sulandırılan bilinen virus konur. Oda ısısında 2 saat bekletilir. Kontroller hazırlanır. Daha sonra tüm gözlere **300.000 hücre /ml** olarak hazırlanan hücre süspansiyonu **0.05** oranında damlatılır.



$\frac{1}{2}$?serum

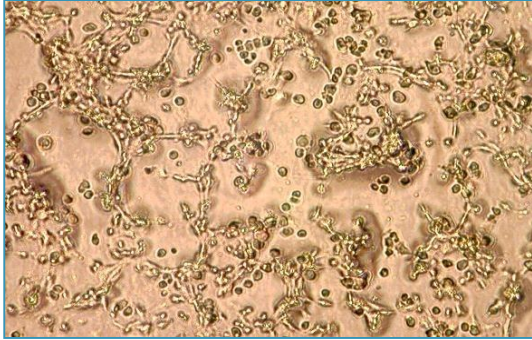
Hücre K.: 0.1 ml serumlu Earle
Virus K.: 0.05 ml saf virus+ 0.05
ml serumsuz Earle



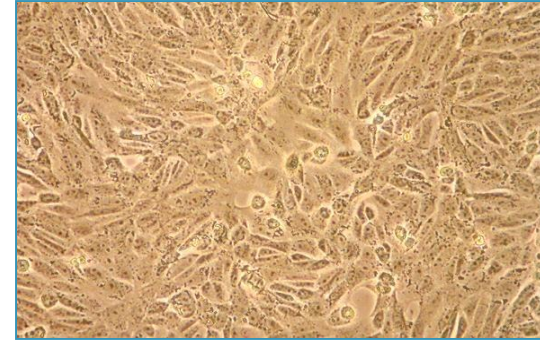


Değerlendirme:

Şüpheli serum	CPE	Nötralizasyon
Sığır vebası ab (+)	(-)	(+)
Sığır vebası ab (-)	(+)	(-)



CPE(+) Nötralizasyon(-)



CPE(-) Nötralizasyon(+)

Pozitif serumda SN₅₀ Tespiti

1 cc aktarılır



Pozitif serum

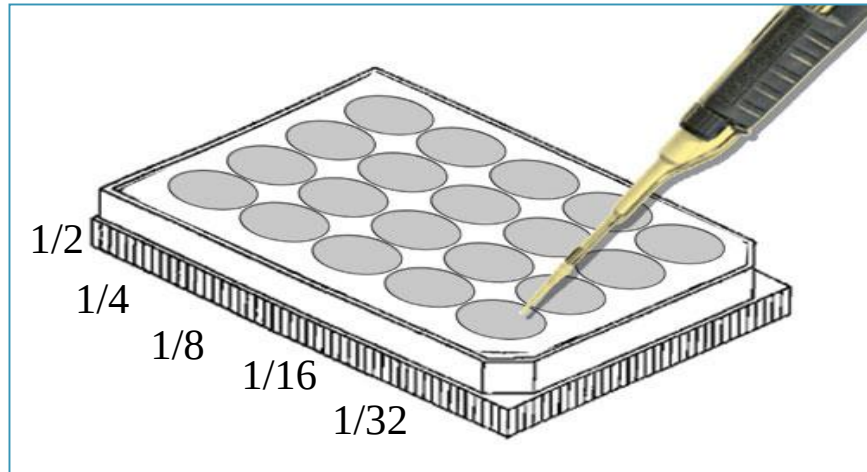


1 cc PBS

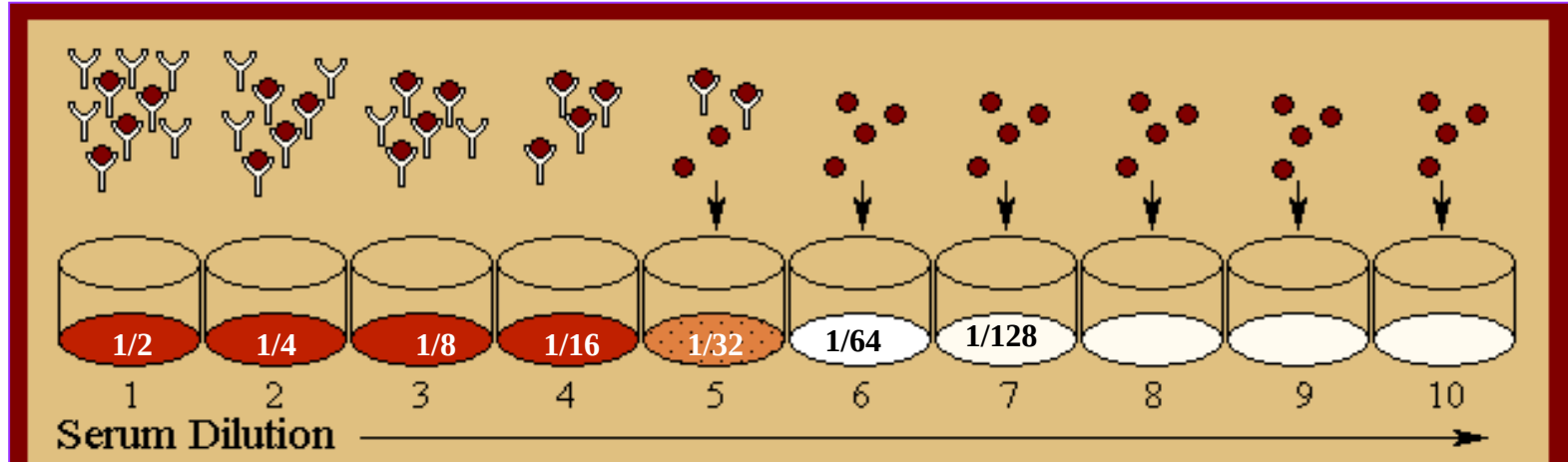


$\frac{1}{2}$ sulandırılmış
serum

$\frac{1}{2}$ oranında sulandırılmış serum ilk 4 göze **0.1 ml** oranında aktarılır. Diğer gözlere **0.05 ml** PBS damlatılır. Ya da tüm gözlere **0.05 ml** PBS koyduktan sonra ilk 4 göze **0.05 ml** serum konur. İlk gözden sulandırıcı (diluter) yardımıyla alınan **0.05 ml** oranındaki serum diğer gözlere aktarılarak serumun log2 tabanına göre sulandırılması gerçekleştirilir. **100 DKID₅₀** oranında sulandırılan virus tüm gözlere **0.05 ml** konur. Oda ısısında 2 saat veya etüvde 1 saat bekletildikten sonra kontroller hazırlanır ve daha sonra tüm gözlere hücre süspansiyonu **0.05 ml** oranında aktarılır.



Değerlendirme:



<u>serum sulandırma ları</u>	<u>CPE</u>	<u>Nötralizasyon</u>
1/2	0/4	+
1/4	0/4	+
1/8	0/4	+
1/16	0/4	+
1/32	2/4	+
1/64	4/4	-
HK	0/4	
VK	4/4	

II- Virus sulandırma metodu. (Şüpheli virus, bilinen serum)



Şüpheli virus
(100DKID₅₀)



Bilinen serum
(SN₅₀)

Şüpheli virus ve bilinen serum eşit hacimde (0.05 er cc.) biraraya getirilir. 37°C lik etüvde 1 saat bekletildikten sonra üzerine hücre süspansiyonu ilave edilir.



Değerlendirme:

Şüpheli virus	CPE	Nötralizasyon
Sığır vebası (+)	(-)	(+)
Sığır vebası (-)	(+)	(-)

Kullanım Alanları

- Epidemiyolojik kontrollerde
- Klinik enfeksiyonun teşhisinde
- Serolojik olarak eradikasyon amacıyla
- Karantina merkezlerinde
- Aşılama sonrası antikor tespitiinde
- Virus izolatlarının identifiye edilmesinde

