

VIRUSLARIN ÜRETİLMESİ

Prof.Dr. Yılmaz Akça
Prof.Dr. Feray Alkan
Prof.Dr. Aykut Özkul
Prof.Dr. Seval Bilge-Dağalp
Prof.Dr. M. Taner Karaoğlu
Prof.Dr. Tuba Çiğdem Oğuzoğlu

Viruslar Neden Üretilir?

- ➡ Virusları izole ve identifiye etmek için,
- ➡ Viruslar arası ilişkilerin ortaya konması için,
- ➡ Profilaktik ürünler elde etmek ve standardizasyonunu yapmak için,
- ➡ Serolojik testlerde kullanmak için,
- ➡ Hiperimmün veya tip spesifik serum elde etmek için,
- ➡ Epidemiyolojik ve patogenetik özelliklerini ortaya koymak için,

VIRUSLAR ÜRETİLİR !

- Viruslar sadece canlı sistemlerde üretilir. Virusun ürediği bu sisteme KONAK adı verilir. Konak sistemler in vivo veya in vitro olarak iki temel grupta incelenir.
- In vivo sistem → Deneme hayvanı, Embriyolu Tavuk Yumurtası (ETY)
- In vitro sistem → Hücre kültürü

In vivo Sistemler -1

Deneme Hayvanları



Deneme Hayvanları-1

- Konvansiyonel Hayvanlar: Herhangi özel bakım ve besleme programı uygulanmayan hayvanlar.
Hiperimmün serum eldesi



Deneme Hayvanları-2

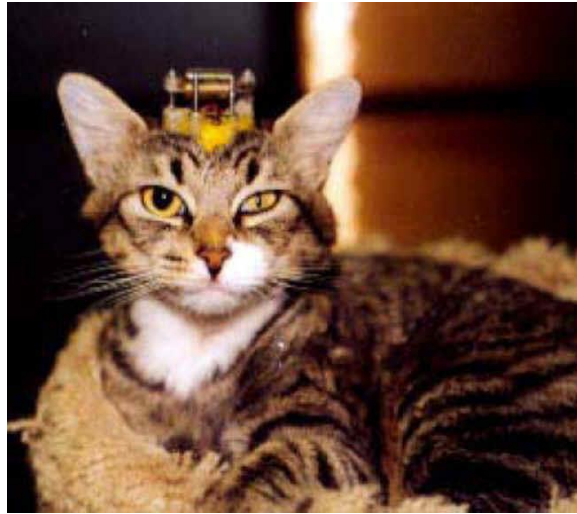
- Spesific Pathogen Free (SPF) hayvanlar: Üzerinde çalışılan patojen ve buna ait serolojik yanıtın yoksun hayvanlardır. Özel bakım ve besleme uygulanır. Sürekli olarak üzerinde çalışılan patojen yönünden virolojik ve serolojik olarak kontrol edilirler. Proflaktik ürünlerin potens ve sterilite kontrolleri için kullanılırlar.
- Germ Free (GF) hayvanlar: Hiçbir patojen veya apatojen mikroorganizma taşımayan hayvanlardır. Kendileri gibi GF olan ebeveynlerden elde edilirler. Yem ve ortam havaları steril edilmek suretiyle verilir. Sürekli olarak kan ve tüm vücut sekret ve ekskretleri tüm patojenler yönünden kontrol edilirler. Özel patogeneze çalışmalarında kullanılırlar.



DİKKAT !!!

- Virusa duyarlı hayvan türü,
- Virusa uygun inokulasyon yolu,
- Virusun saflığı,
- Virusun titresini,
- Kontrol grupları,

GÖZ ÖNÜNE ALINMALIDIR



İnokulasyon Yolları

- Intradermal (Deri içi)
- Subcutan (Deri altı)
- Dermal scarification (Çizme)
- Intramuscular (Kas içi)
- Intravenous (Damar içi)
- Intracerebral (Beyin içi)
- Intraperitoneal (Periton içi)
- Intracardiac (Kalp içi)
- Intranasal (Burun içi, sprey)
- Intratracheal (Trake içi)
- Subconjunctival
- Conjunctival scarification
- Rectal (Rectumdan)
- Peros (Oral, ağızdan)
- İNOKULASYON: Virus veya infektif materyalin yandaki yollardan herhangi biri ile organizma dahiline verilmesi.
- İNFEKSİYON: Virus veya infektif bir materyalin duyarlı bireye verilmesi veya doğal olarak girmesinden sonra çoğalmasıdır.
- HASTALIK: Virus infeksiyonu sonrası oluşan patolojilere bağlı olarak yaşamsal fonksiyon ve davranışlardaki normal dışı bulgular bütünüdür.
- EPRÜVASYON: Daha önceden immünize edilen bireylerin virulent virusla tekrar inokule edilmesidir.

Postinokulasyon İnfeksiyon Takibi

- Antemortem (Ölüm öncesi)

- Ateş,
- Sekret ve Ekskretlerden etken izolasyonu
- Antikor tayini
- Klinik hastalığın izlenmesi

Doğal ÖLÜM

Euthanasie=Sacrifice

- Postmortem (Ölüm sonrası)

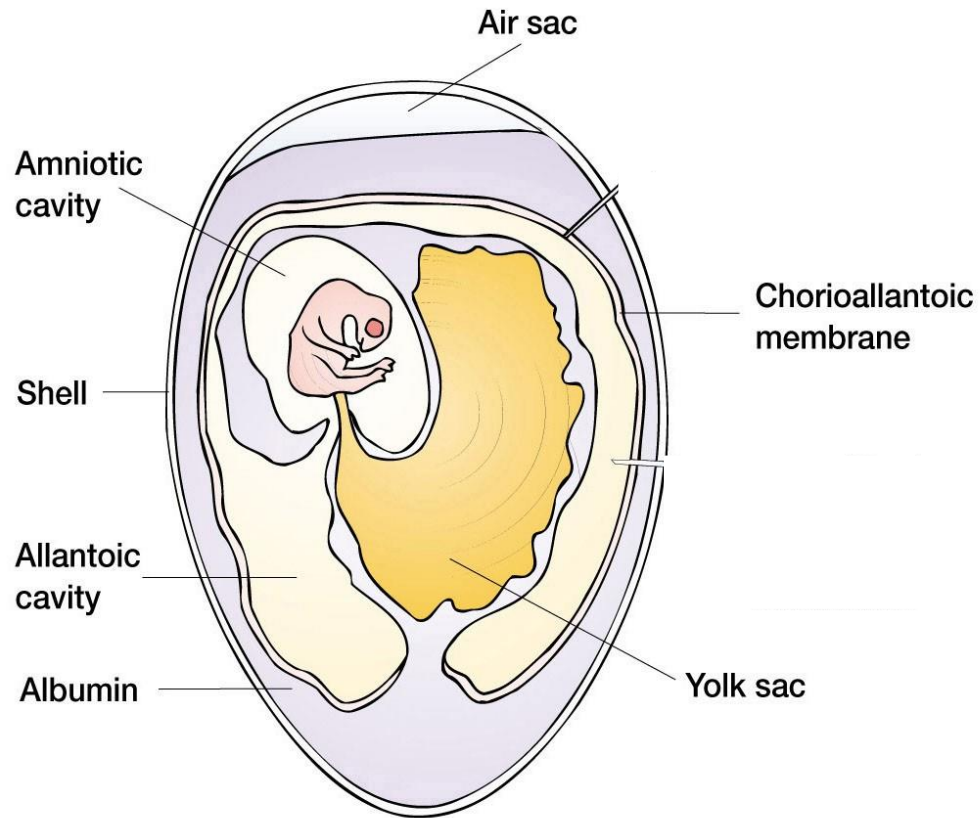
- Makro (otopsi) ve mikro patoloji



In vivo Sistemler -2

Embriyolu Tavuk Yumurtası
(ETY)

Embriyolu Tavuk Yumurtası (ETY)



Genel Kavramlar-1

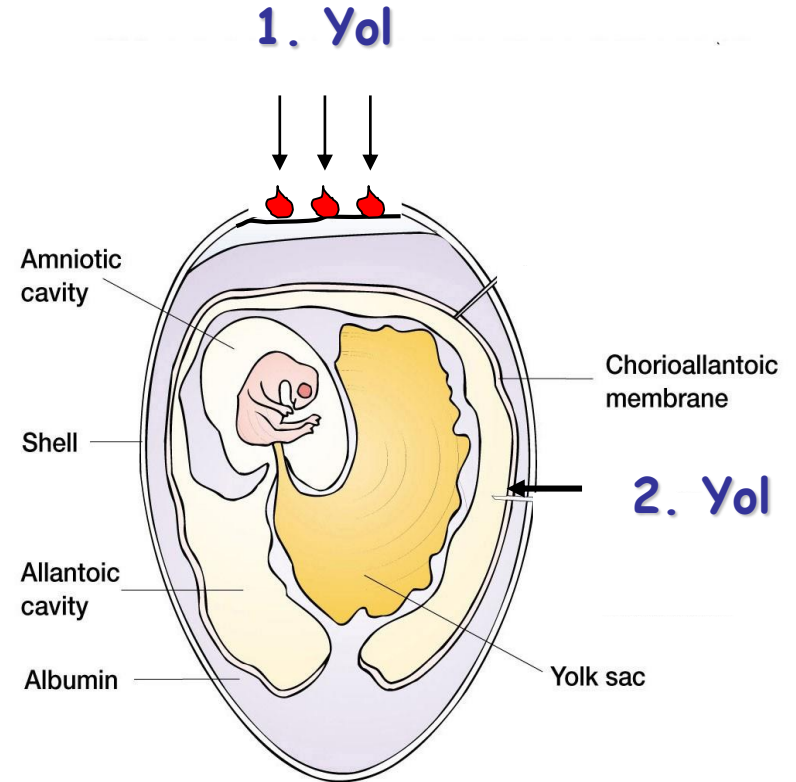
- Yumurta Seçimi: Hastaliksız sürülerden döllü yumurtalar alınır. Beyaz renkli ve yaklaşık 5-6 g ağırlıkta olmaları arzulanır.
- İnkubasyonu: Özel inkubatörlerde (kuluçka makinası) saklanırlar. Bunlar 35-37°C ısı ve % 40-70 oranında rölatif rutubete sahiptirler. İnkubasyon müddetince hergün canlılık kontrolü yapılır.
 - Canlılık kontrolü karanlık bir ortamda ve yüksek güçlü bir ışık kaynağı altında yapılır. Başlangıçta sadece yumurta sarısı üzerinde dar bir alanda tespit edilen damarlar hergün artar. Göz küresi ve ekstremiteler belirginleşir. Embriyo hareketlenir. Ölü olan embriyolar hareketsiz, damarlar soluk gri renkte ve değişmeyen büyüklüktedir. Açılırsa çok pis kokar.

Genel Kavramlar-2

- **İnokulasyon:** Direkt embriyoya (iv, sc, icer, retrobulbar vb) veya aksesuar yumurta komponentlerine (CAM, CAK, AK, SK) yapılabilir.
- **İnbubasyon ve Günlük Kontoller:** Daha önce belirtildiği gibi yapılır. Virus üremesine bağlı olarak embriyo ölümü takip edilir. İlk 48 saat içindeki ölümler uygulama hatası olarak kabul edilir.
- **İnfeksiyonun Takibi:** Ölen veya öldürülen embriyoya ait sıvı ve doku örnekleri virus üremesi yönünden kontrol edilir.
 - CAM → Lokal damarlaşma, opasite, pox oluşumu
 - CAK → Sıvıdan hemaglutinasyon
 - AK → Sıvıdan hemaglutinasyon
 - SK → Sarı kesesi zarı boyanır, inklüzyon cisimcikleri taranır.

1. Chorioallantoik Membran

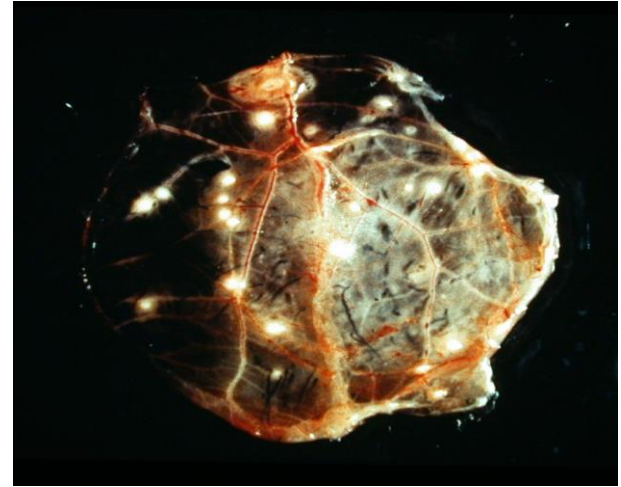
- 9-12 günlük embriyo
- Epitheliotrop viruslar (Pox-, herpesvirus)
- Pencere şeklinde açılan kabukdan girilir ve zara damla halinde virus süspansiyonu bırakılır. Damla altına gelen yerler enjektör ucu ile çizilir (scarification)





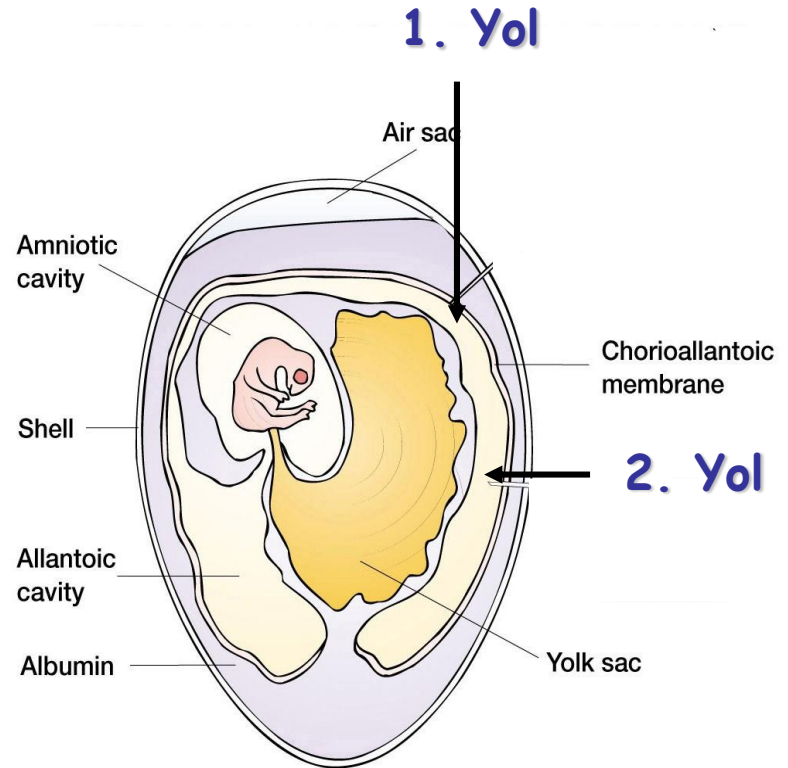
İnubulasyon yerindeki CAM dikkatlice yumurtadan dışarı alınır ve bir petri kabına yerleştirilir. Birkaç kez fizyolojik tamponlu bir sıvı (PBS, FTS) ile yıkanarak, allantois sıvısı ve kan hücrelerinden temizlenir.

Temizlenen zar içinde bulunduğu petri kutusu ile koyu bir zemin üzerine konarak kontrol yumurtaya (virus inokule edilmemiş) ait CAM ile karşılaştırılır.



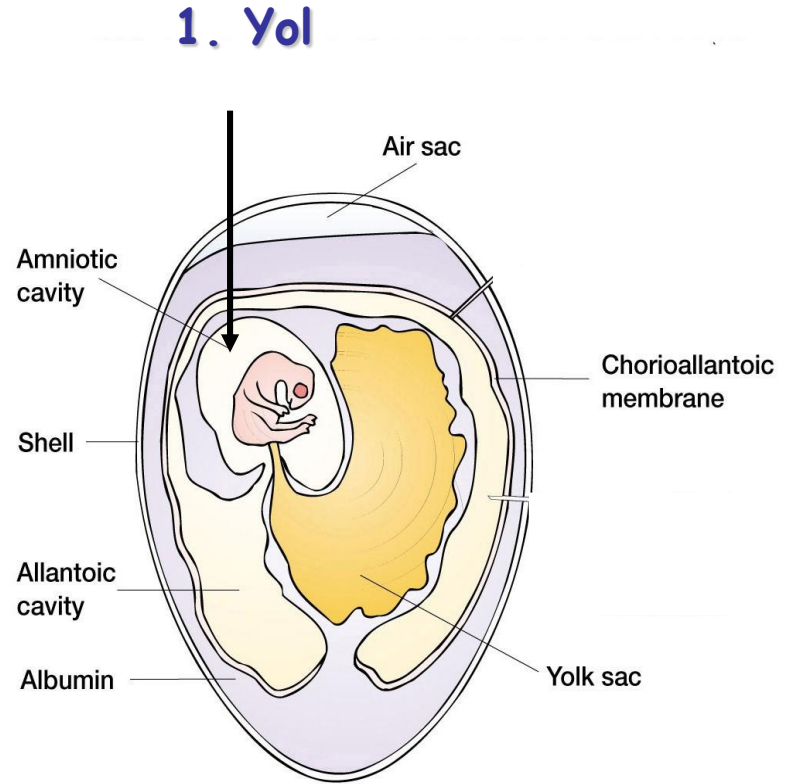
2. Chorioallantoik Kavite

- 9-12 günlük embriyo
- New Castle virusu,
- Virus üremesi alantois sıvısına yapılan HA testi ile tespit edilir.



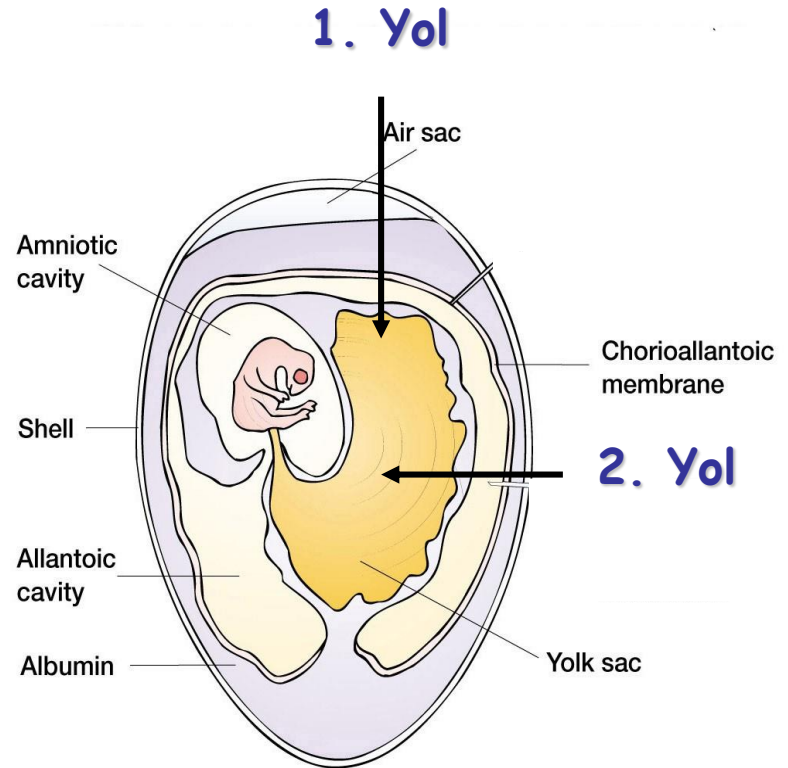
3. Amnion Kavitesi

- 9-12 günlük embriyo
- İnfluenza virusu, Mumps (Kabakulak) virusu
- Virus üremesi, amnion sıvısına yapılan HA testi ile tespit edilir.



4. Sarı Kesesi

- 6-8 günlük embriyo
- Kuduz virusu, Mavidil virusu, EHV-1 ve EHV-4
- Virus üremesi, gerek yumurta sarısı ve gerekse sarı zarının özel boylarla boyanarak inklüzyon cisimciklerinin tespit edilmesi esasına göre takip edilir.



In Vitro Sistemler

Hücre Kültürleri

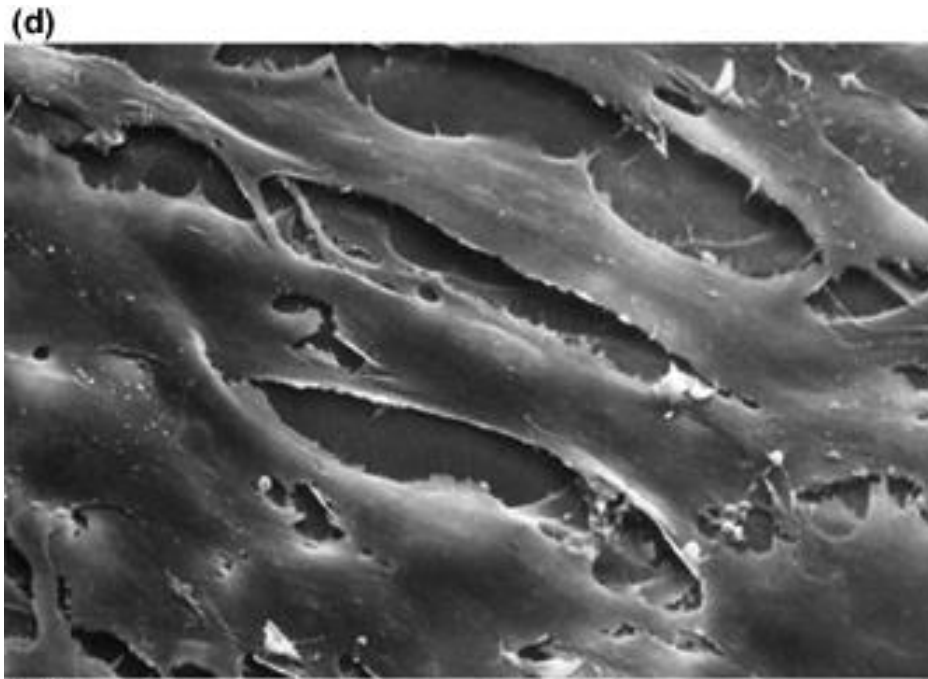
Genel Tanımlar

- **Organ Kültürü:** Organların belirli bir bölümü veya tamamının fonksiyon ve yapıları muhafaza edilmek şartı ile invitro olarak saklanmalarıdır.
- **Doku Kültürü:** Dokuların fonksiyon ve yapıları bozulmaksızın in vitro olarak saklanmaları ve üretilmeleridir.
- **Hücre Kültürü:** Tek bir hücreden çoğalarak in vitro şartlarda hücrelerin üretilmesidir. Burada hücreler hiçbir zaman dokuya varan bir organizasyon sergilemezler.

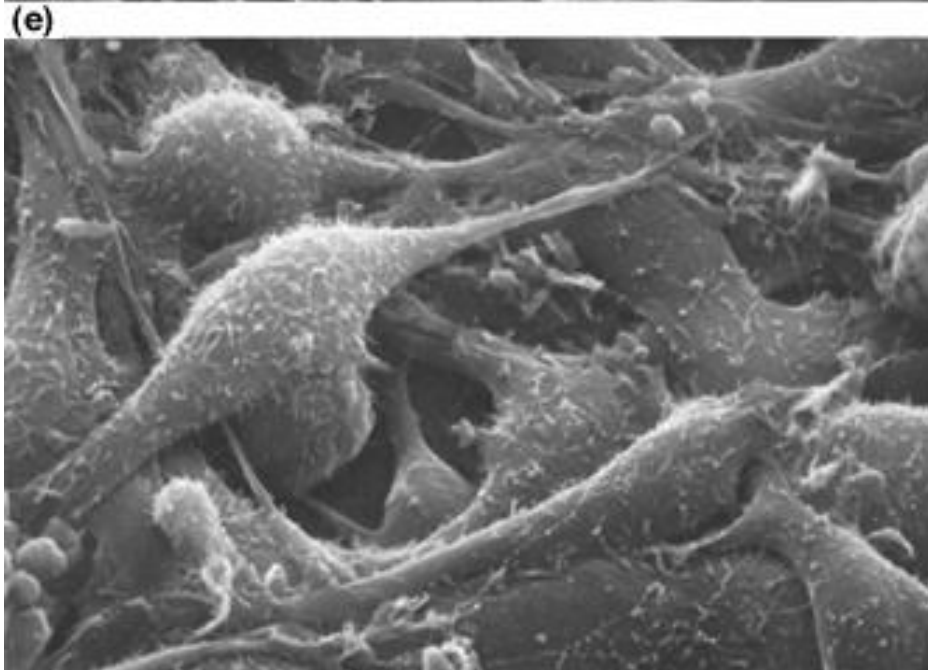
Hücre Kültürü Tanımları

- Primer Hücre Kültürü: Hücrelerin orijin aldıkları doku veya organdan in vitro şartlara ilk adapte edildikleri formdur. Bu tanımlama ilk subkültürün yapıldığı ana kadar geçerlidir. Genellikle ölümlü (mortal, finite) hücrelerdir.
- Permanent (Devamlı) Hücre Kültürü: Sınırsız olarak çoğalabilen ve subkültürleri yapılabilen hücre kültürleridir. Karyotipik olarak orijin aldıkları doku veya hücrelerden tamamen farklılaşmış hücrelerdir.
- Diploid Hücre Kültürleri: Primer kültürlerin subkültürlerinin yapılması sonucunda elde edilir. Karyotipik özellikleri orijin aldıkları dokudan belli oranlarda (% 20-30) farklılık gösterir.
- Fibroblast Hücre Kültürü: Embriyonal dokulardan köken alan, mekik (iğ) benzeri morfoloji sergileyen hücrelerdir.
- Subkültür: Bir kültür ortamında üremesini tamamlamış olan hücrelerin bir başka kültür ortamına sulandırılarak veya sulandırılmaksızın aktarılması veya transplantasyonlarıdır.

**Scanning
EM**



Primer hücre



Transforme hücre

Kültür Ortamları

- Hücre kültürü şişeleri
 - Cam (recycling)
 - Plastik (disposable)
 - Steril
 - Nötr
- Hücre üretme vasatları
 - Steril
 - Besleyici
 - İso tonic
 - Nötr pH
 - Vücut ısısı
- Vasat şişe hacminin %10'u olacak şekilde ortama ilave edilir ve % 5-20 arasında değişen oranda inaktif dana serumu içerir.



Kültür Ortamları

- **Vasatın görevi,**
 - İçinde barındırdığı hücre için besin kaynağı,
 - Hücre fonksiyonları için uyarıcı ve mineral kaynağı,
 - In vivo şartlardaki homeostatik ortamın sağlanması
 - Metabolitler için atık yeri,
- **Serumun görevi,**
 - pH regülasyonu yapar,
 - Tutunma ve bağlanma faktörlerini içerir,
 - Hormon ve taşıyıcı maddeleri içerir

- Hücreler içinde buldukları kabın yüzeyi ile olan ilişkilerine göre;
 - **Yerleşik**, (içinde bulunduğu kaba tutunan)
 - **Stationer** (tek katlı veya tabakalanmış)
 - **Roller** (döner)
 - **Süspanse**, (içinde bulunduğu kaba tutunmayan)

Primer Hücre Kültürü Hazırlanışı

1. Organ veya doku seçimi:

- A. Donörler genç mümkünse fötus olacak
- B. Donörler sağlıklı olacak
- C. Alınan doku/organ üzerinde bir patoloji olmayacak
- D. Alınan doku/organ dondurulmayacak
- E. Alınan doku/organ bir kimyasal madde ile temas etmeyecek
- F. Soğuk ortamda laboratuvara nakledilecek

2. Laboratuvar ekipmanı

- A. UV steril edilmiş çalışma zemini
- B. Cam malzeme (tülbentli beher, petri, erlen, pipet vb)
- C. Operasyon seti (makas, pens, bistüri, spatula)
- D. Manyetik karıştırıcı ve çubuk
- E. Maske, eldiven, teint d'iode, pamuk, gazlı bez
- F. Soğutmalı santrifüj
- G. 37°C ayarlı su banyosu ve etüv
- H. %0.25 tripsin, PBS, vasat, inaktif dana serumu

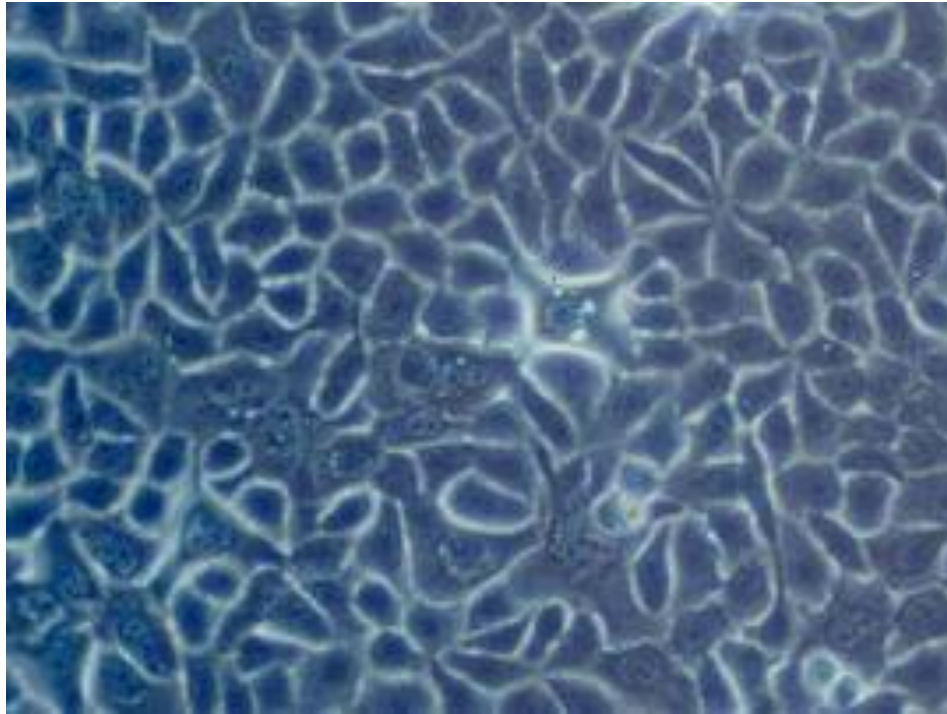
Primer Hücre Kültürü Hazırlanışı

1. Doku üzerindeki zar veya kapsula soyulur,
2. Bir petri kabına makas ile doku parçaları alınır,
3. Makas ve çift bistüri yöntemi ile iyice küçültülür,
4. Erlene aktarılan dokular PBS ile tekrarlayan kereler yıkanır.
5. Isıtılmış tripsin ile hücreler arası bağ doku ayrılır
6. Hücre tripsin karışımı her 20 dakikada bir behere alınır ve ısı düşürülür
7. Tripsinizasyon dokular iyice parçalanana kadar sürer.
8. Elde edilen hücre + tripsin karışımı santrifüj ile ayrılır.
9. Hücreler sayılır, vasat (dana serumlu) içinde sulandırılır ve kültür şişesine aktarılır.
10. 37°C de inkube edilir. Her gün doku kültürü mikroskopunda takip edilir.

Primer Hücree Kùltürü Hazırlanışı

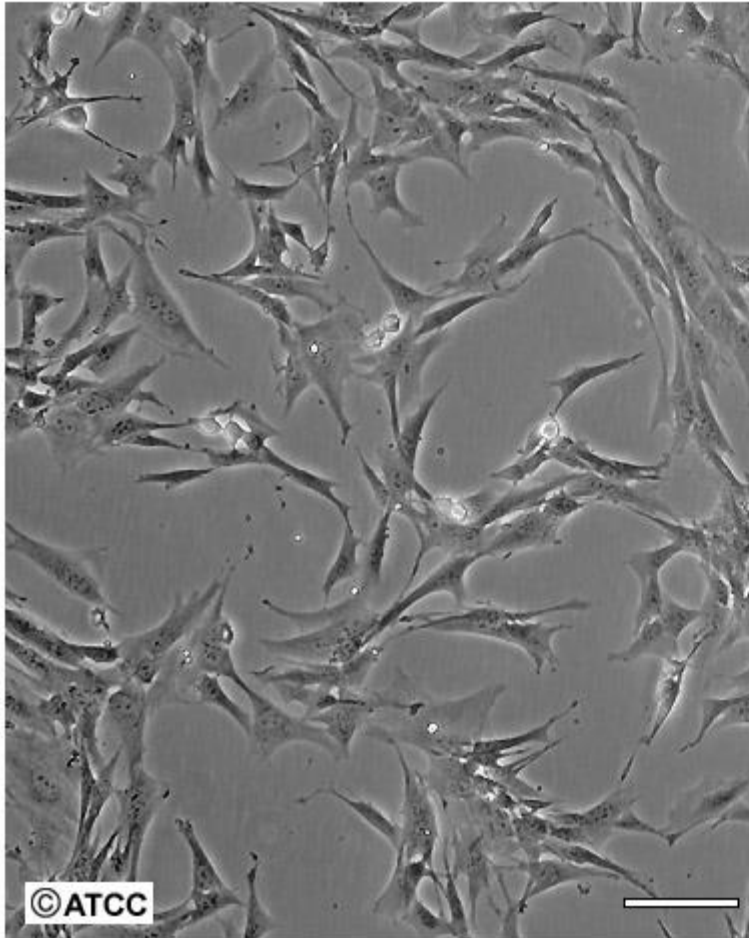


Kültüre Edilen Hücre (MDBK)



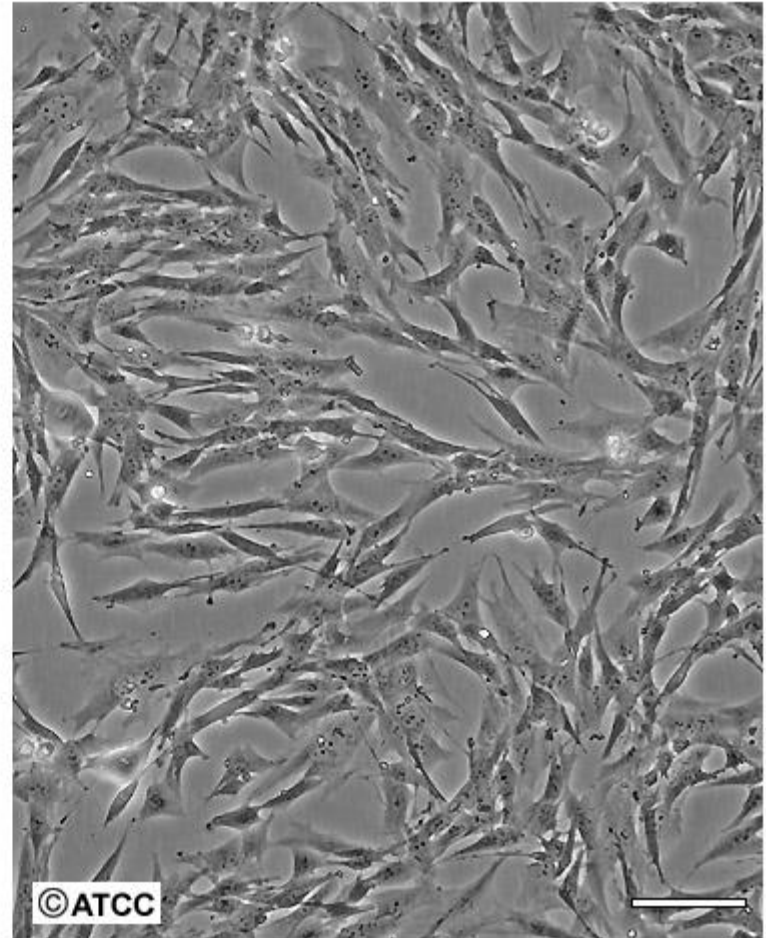
Fibroblastoid Huce

ATCC Number: **CCL-10**
Designation: **BHK-21**



Low Density

Scale Bar = 100µm

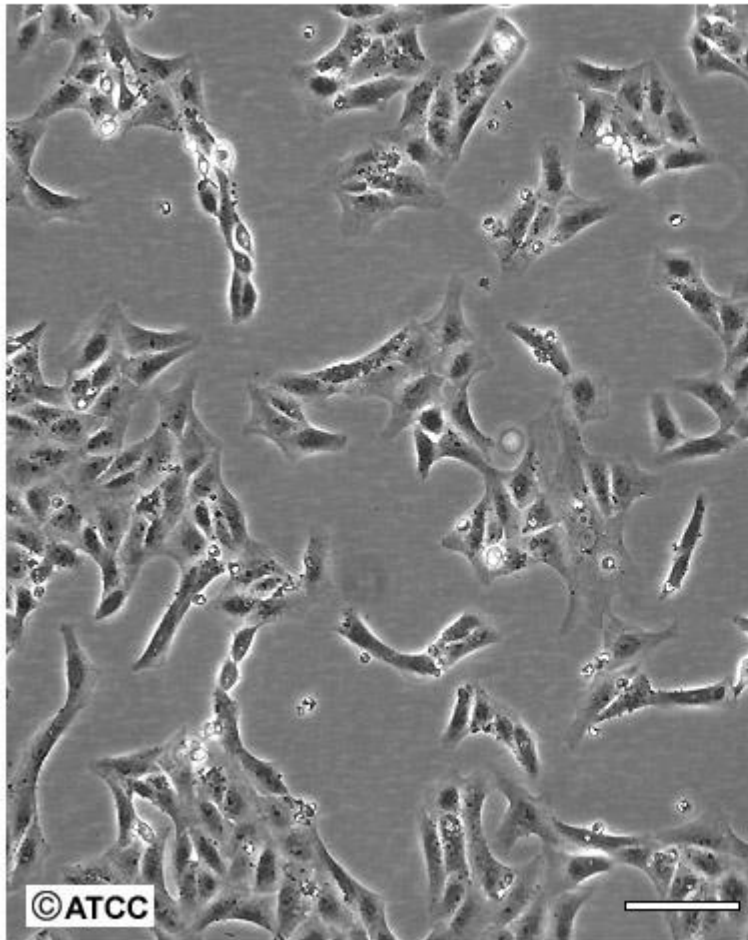


High Density

Scale Bar = 100µm

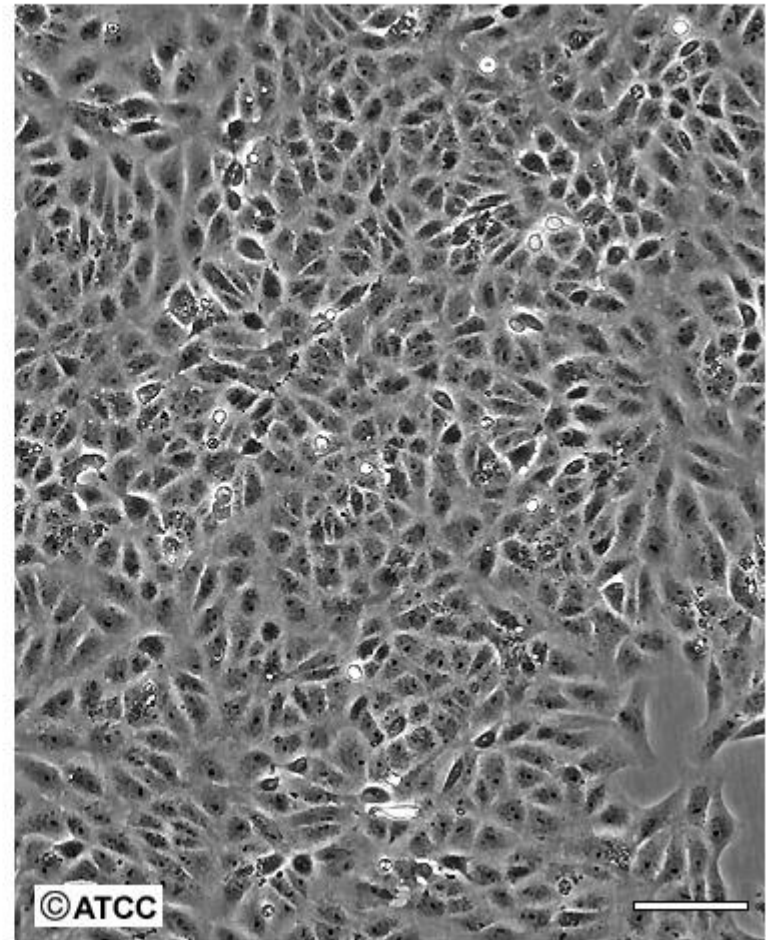
Epitheloid Hcure

ATCC Number: **CCL-81**
Designation: **Vero**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Hücre İdamesi

- Subkültür
- Dondurma