

VIROLOJİ - I

Viruslarda Enfeksiyözite Tayini

Titrasyon

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

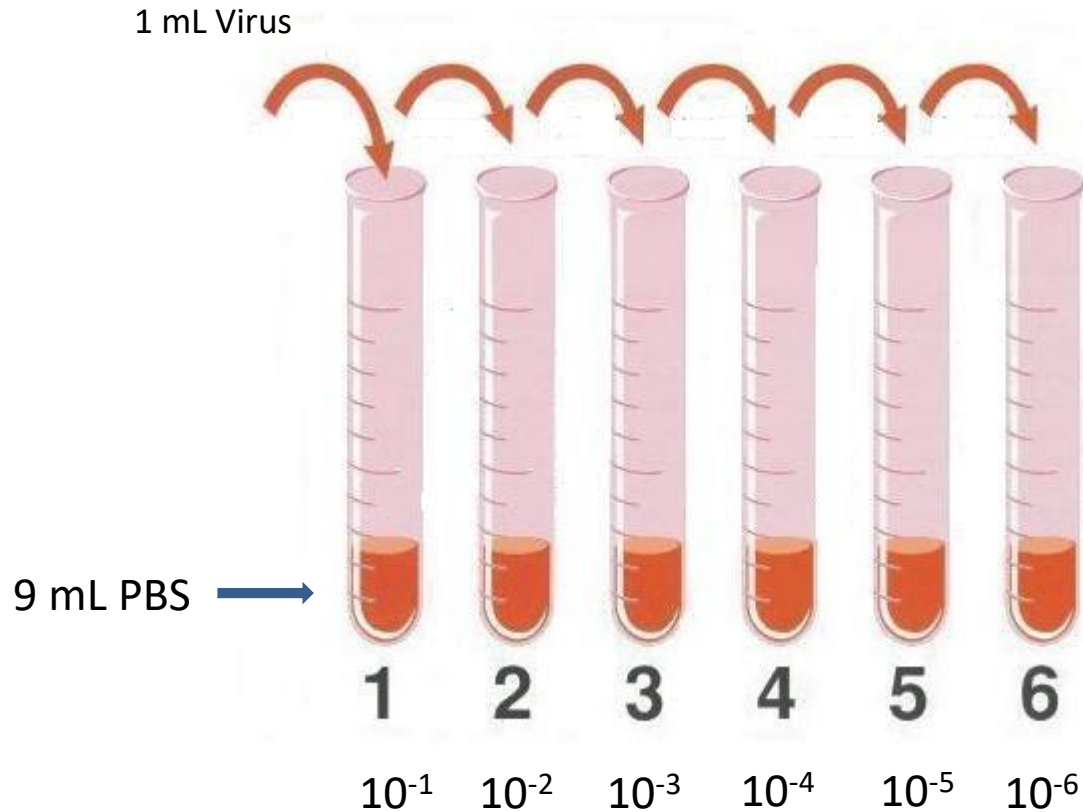
Tanım

- İzole edilmiş virusların in vivo ve in vitro şartlarda enfeksiyon (ve/veya hastalık) yapma güçlerinin tespit edilmesi amacıyla yapılan bir seri uygulamanın genel adıdır.
- Bir virusun enfeksiyözite gücüne o virusun titresini denir.
- İki temel şekilde yapılır:
 - İn vivo Titrasyon
 - İn vitro Titrasyon

İn Vivo Titrasyon

- Deneme hayvanı ve Embriyolu Tavuk Yumurtalarında (ETY) gerçekleştirilir.
- Her iki yöntemde de esas olan; stok virus süspansiyonunun seri sulandırmalarının hazırlanarak duyarlı hayvan veya ETY'larına inokule edilmesidir.
- Sulandırmalar standart protokole göre hazırlanır. Stok virus tamponlu sıvı ile \log_{10} olacak şekilde sulandırılır.

Virus Sulandırması Hazırlama



- Her sulandırmadan 4 adet deneme hayvanı veya ETY'na uygun yolla inokulasyon yapılır.

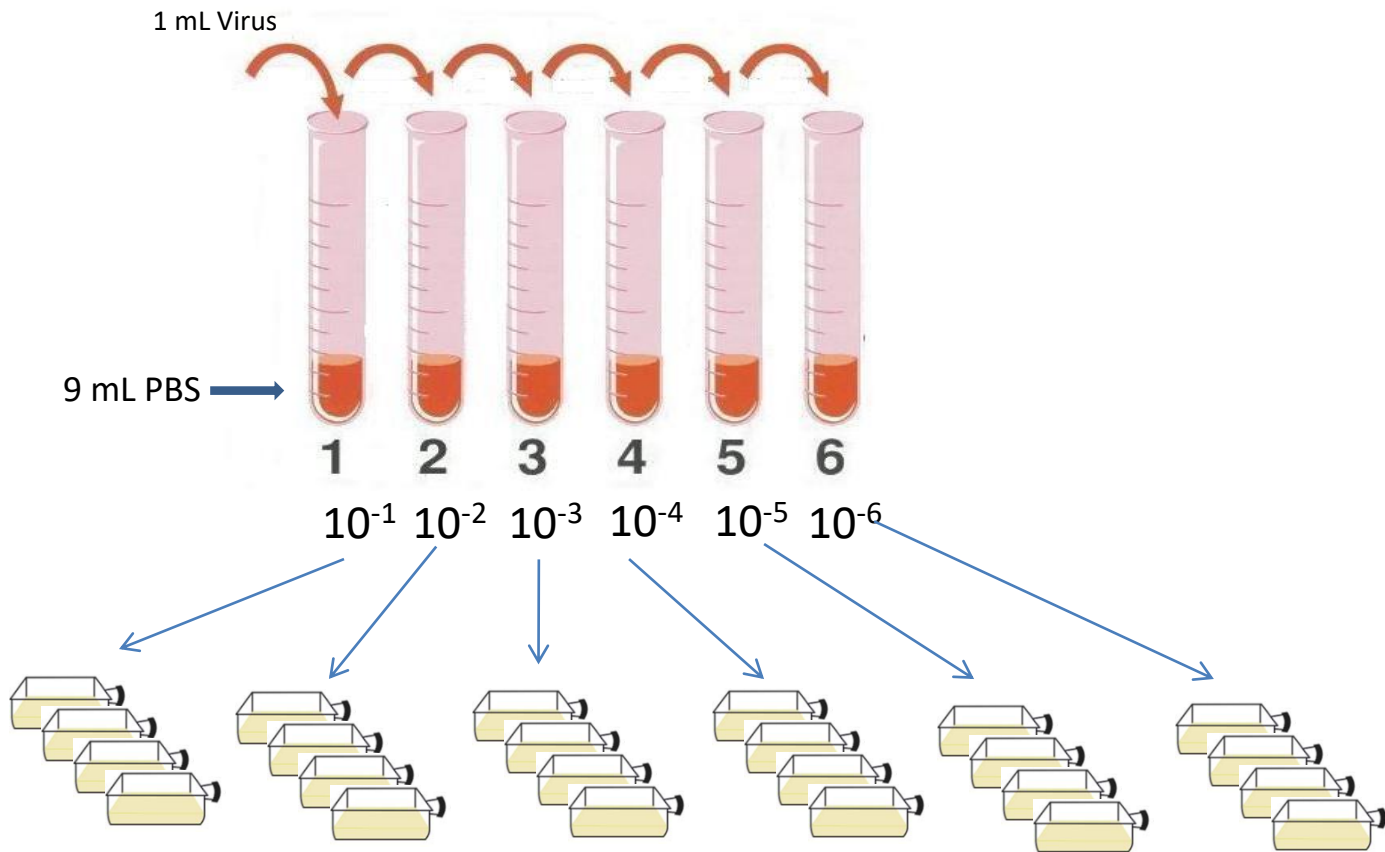
Birimi:

- Deneme Hayvanlarında
 - Letal Doz 50 (LD_{50})
 - Minimum İnfektif Doz 50 (MID_{50})
- Kanatlı Yumurtalarında
 - Yumurta İnfektif Doz 50 (YID_{50})

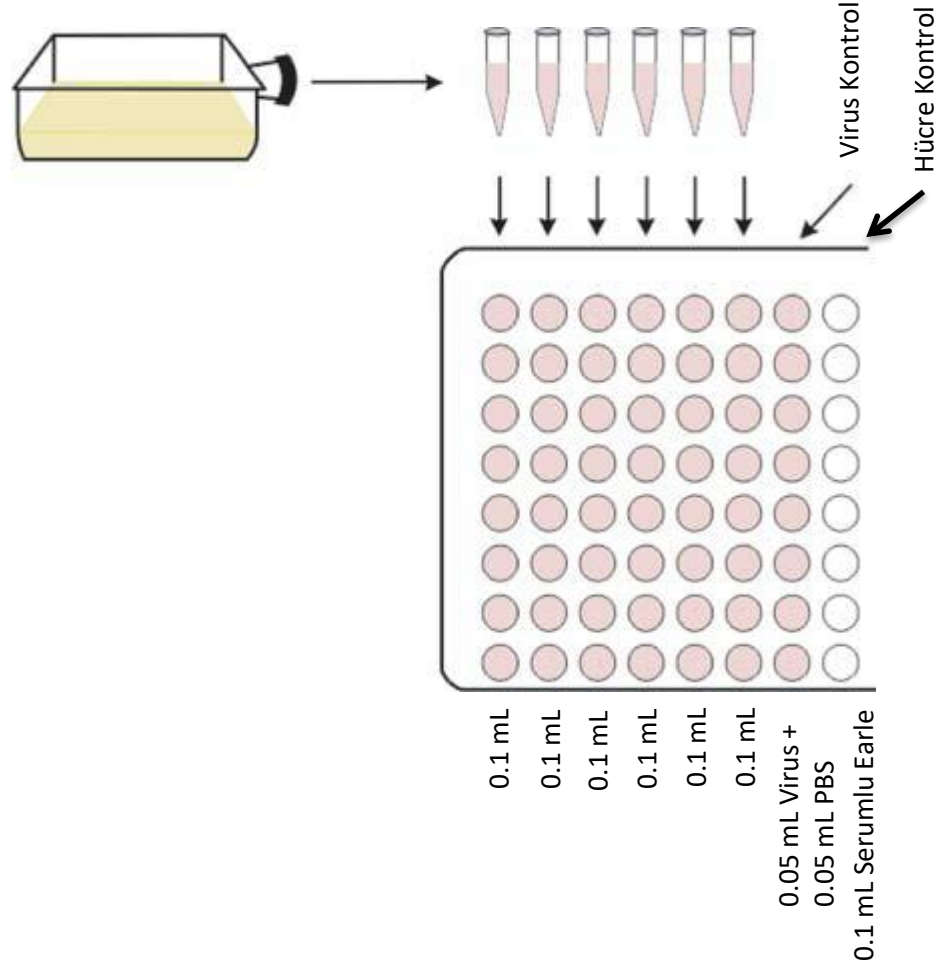
İn Vitro Titrasyon

- Hücre Kültürlerinde yapılır:
 - Makro Titrasyon
 - Mikro Titrasyon
 - Plak Test

Makro Titrasyon



Mikro Titrasyon



Değerlendirme

- Doku Kültürü İnfektif Doz 50 (**DKID₅₀**)-
İnokule edildiği sistemlerin **ENAZ**
yarısında cpe oluşturan virus sulandırması.

- Spearman & Kaerber Yöntemi

$$DKID_{50} = X_0 - d/2 + d(r/n)$$

X_0 = %100 cpe görülen son cpe sulandırması

d = sulandırma katsayısının \log_{10} 'u

r = tüm pozitiflerin toplamı

n = her sulandırma için kullanılan göz sayısı

- Reed & Muench Yöntemi

Kolay Titre Hesabı:

10^0 - 4/4

10^1 - 4/4

10^2 - 4/4

10^3 - 4/4

10^4 - 3/4

10^5 - 2/4

10^6 - 1/4

$$100DKID_{50} = 10^3 / 0,1ml$$

↑

$$DKID_{50} = 10^5 / 0,1ml$$

↑

CPE toplamı: 22

$$22 - 2 = 20$$

$$20 \div 4 = 5$$

Titre Hesabı:

$$100DKID_{50} = 10^{2,75} / 0,1ml$$

10^0 - 4/4
 10^1 - 4/4
 10^2 - 4/4
 10^3 - 4/4
 10^4 - 3/4
 10^5 - 2/4
 10^6 - 0/4

↑

$$X_0 = 3$$
$$d = \text{Log}_{10} 10 = 1$$
$$n = 4$$
$$r = 4 + 3 + 2 = 9$$

$$DKID_{50} = 10^{4,75} / 0.1 \text{ cc}$$

↑

CPE toplamı: 21

$$21 - 2 = 19$$

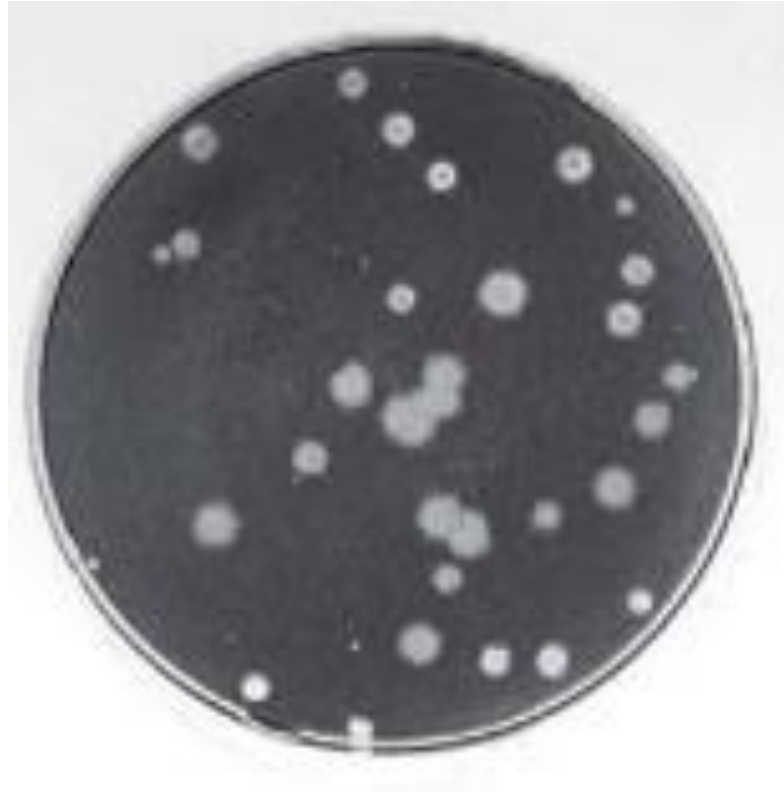
$$19 \div 4 = 4,75$$

Titrasyonun kullanım alanları

- Nötralizasyon testinde kullanılacak virusun standardizasyonu ($100DKID_{50}$)
- İnaktivasyon kinetiğinde
- Aşı hazırlamada
- Virus saflaştırmada (plak test)
- Virus izolatlarının identifikasyonunda

Plak nedir?

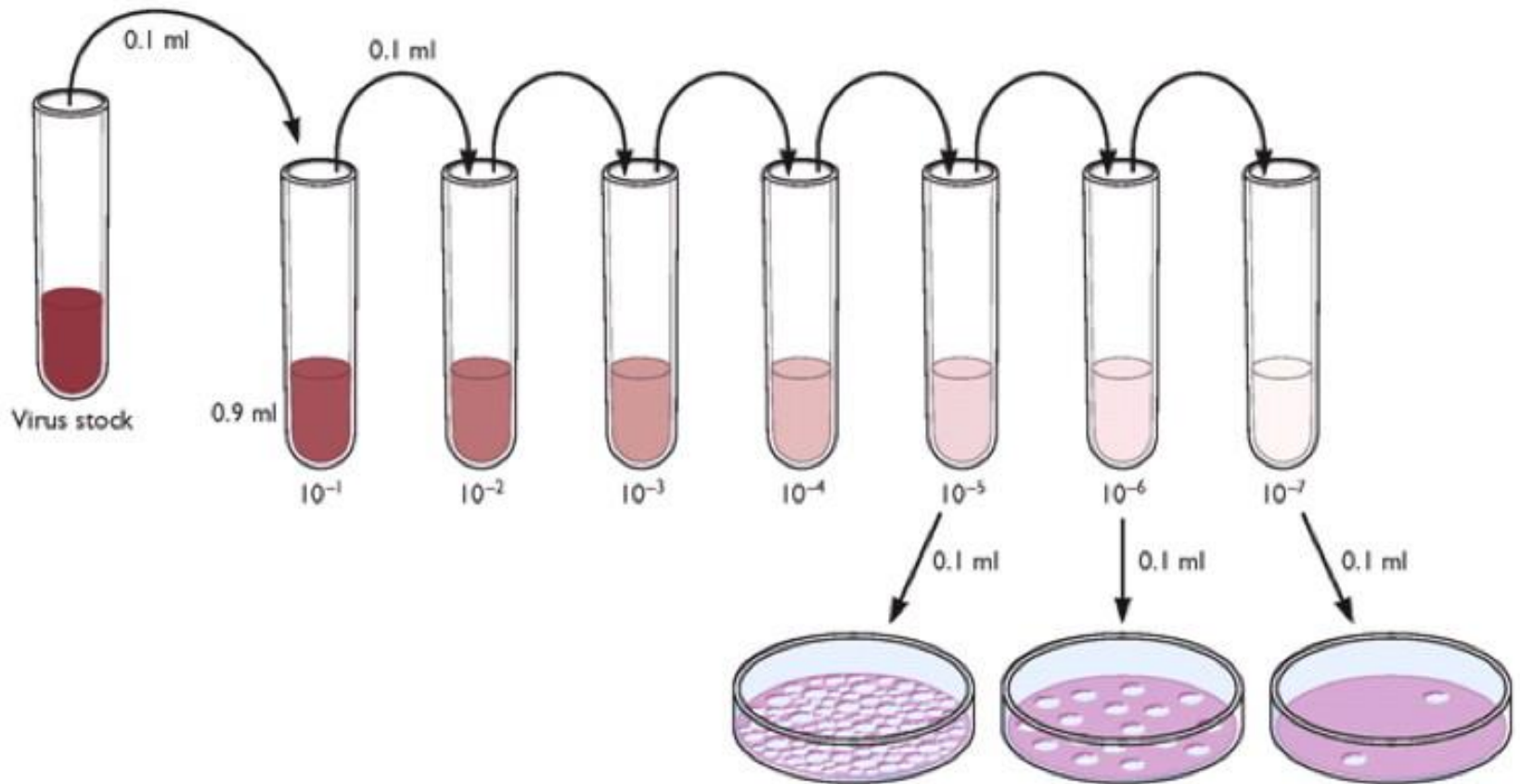
Her virus plak oluşturur mu?

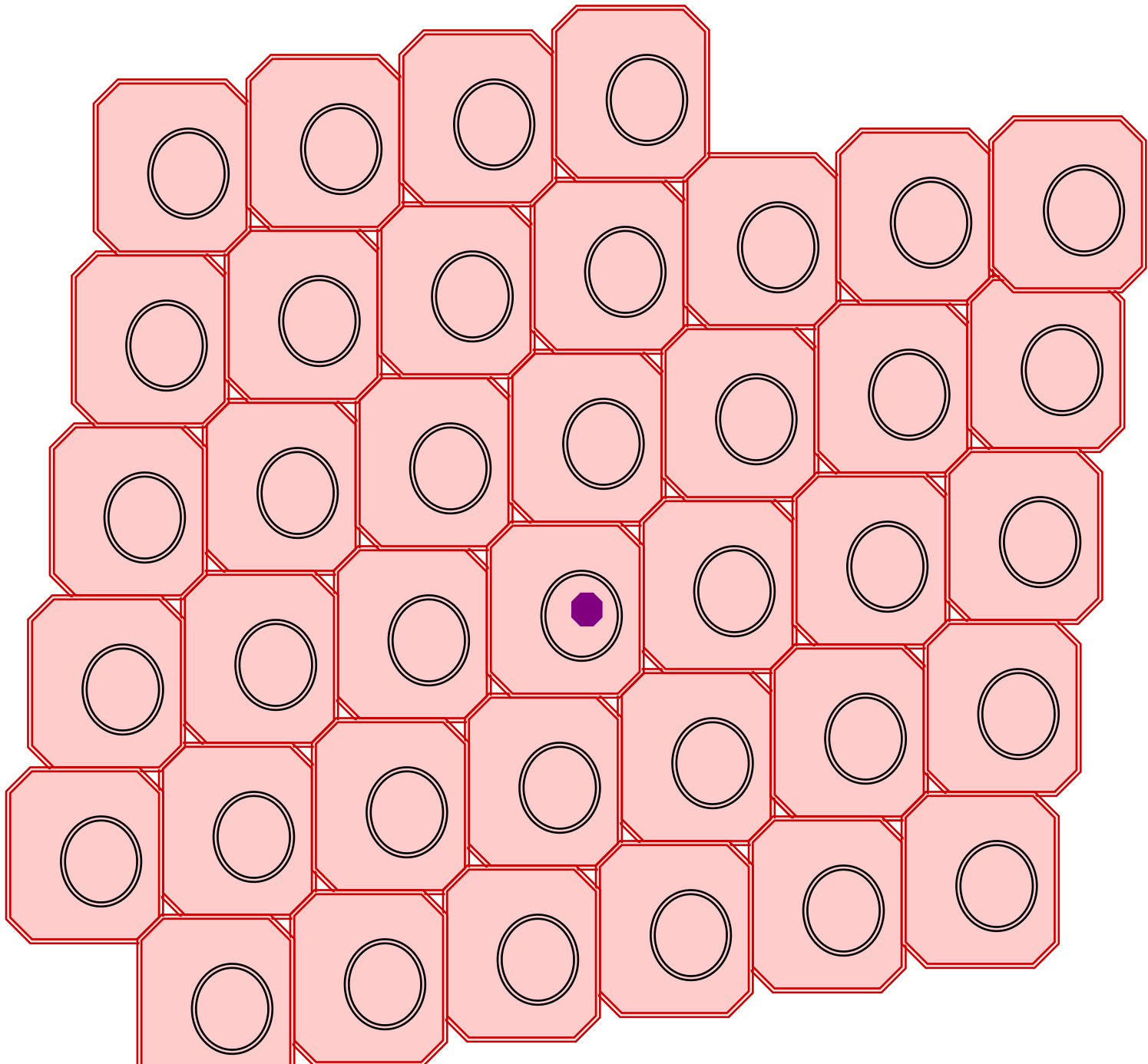


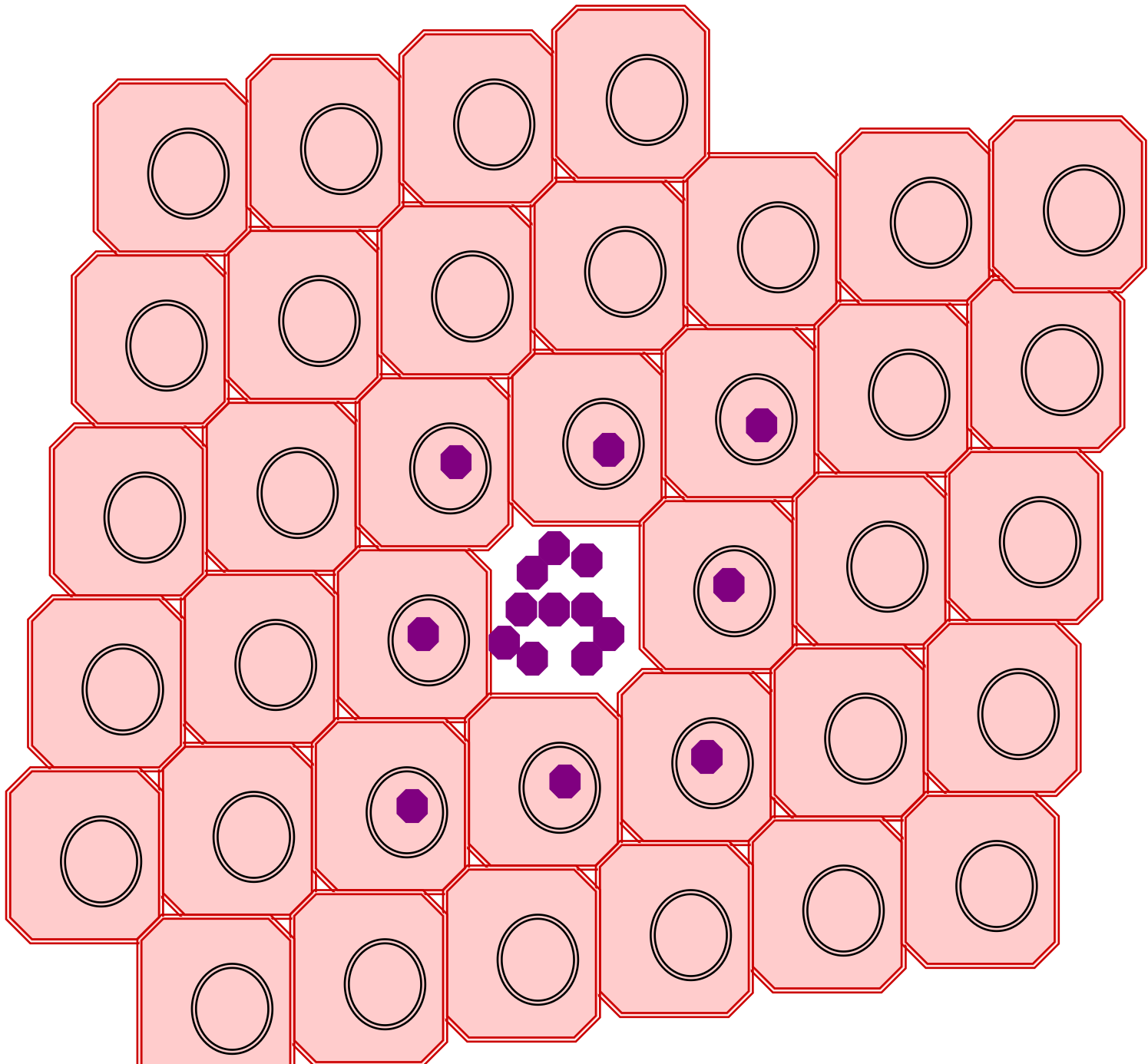
Plak Test

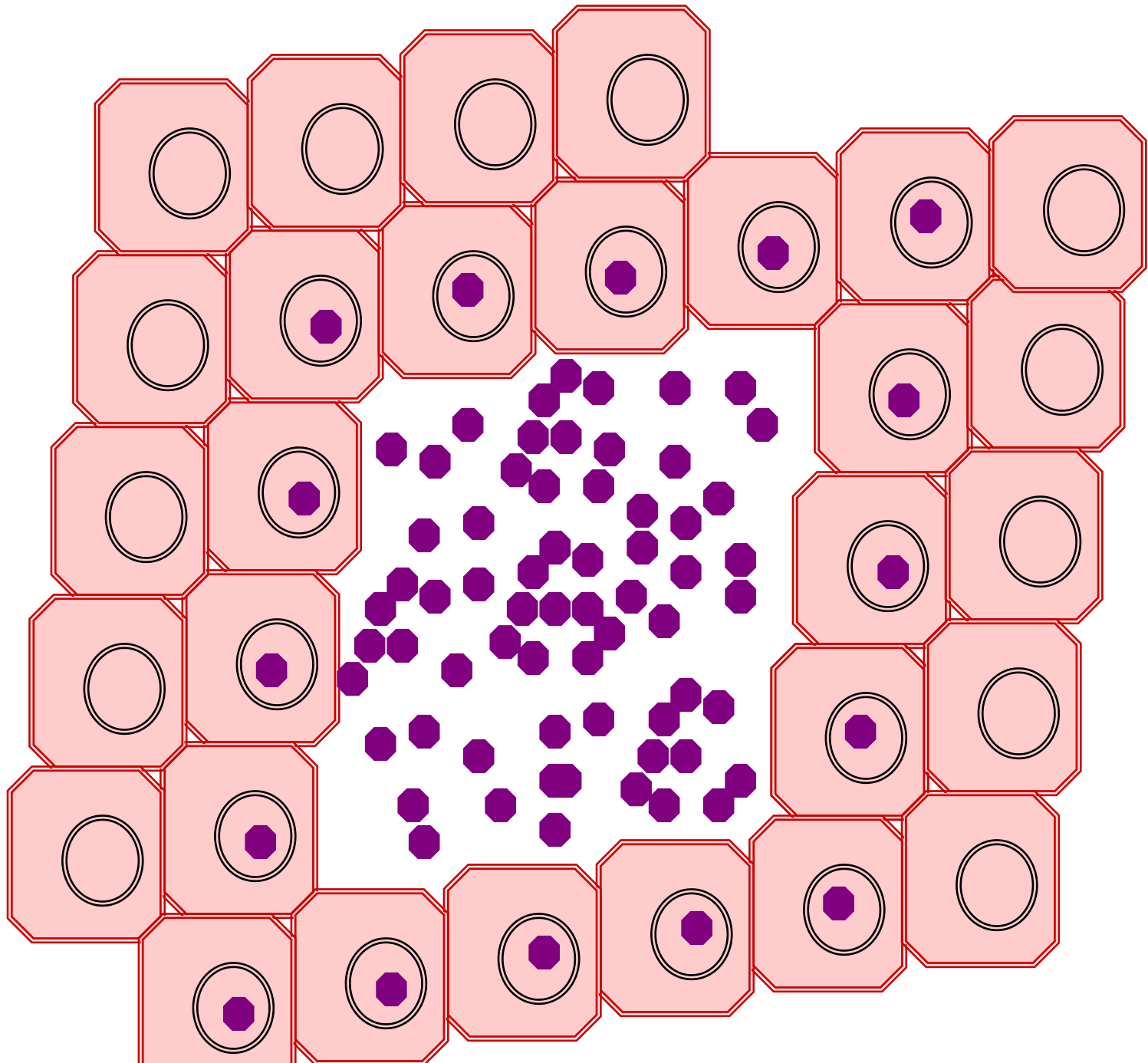
- Plak; hücre kültürlerinde etrafı sınırlı virus üreme alanlarını tanımlar.
- Plak çeşitleri: Litik, Proliferatif, Dejeneratif
- Petri kutularında hücreler üretilir.
- Her virus sulandırmasından iki göze inokulasyon yapılır.
- Virus üretme vasatı olarak 2XEarle+%1.8-2'lik Noble agar ilave edilir.
- Değerlendirme: Ya özel boyamalar yapılarak ya da her gün mikroskopta kontrol yapılarak, oluşan plaklar sayılır.
- Plak Oluşum Ünitesi (PFU) tespit edilir.

Plaque test



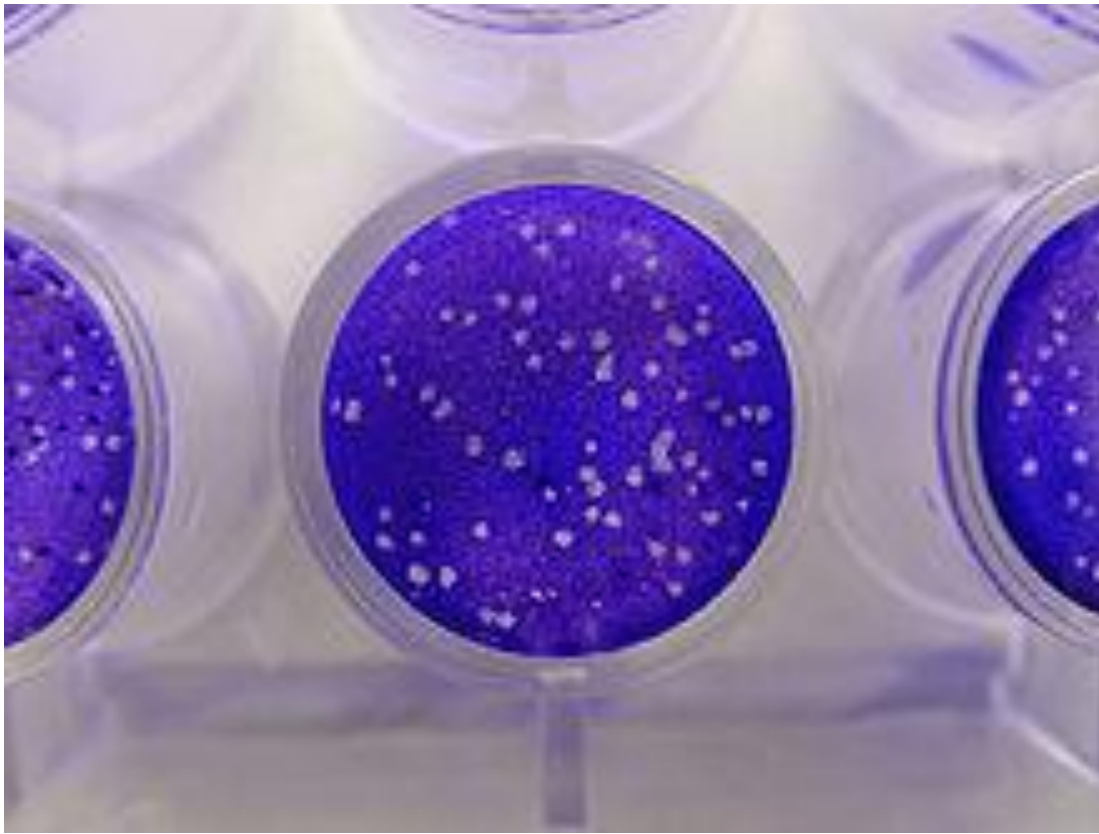








<http://www.lumacyte.com/applications/rapidviraltiter/>



https://en.wikipedia.org/wiki/Virus_quantification