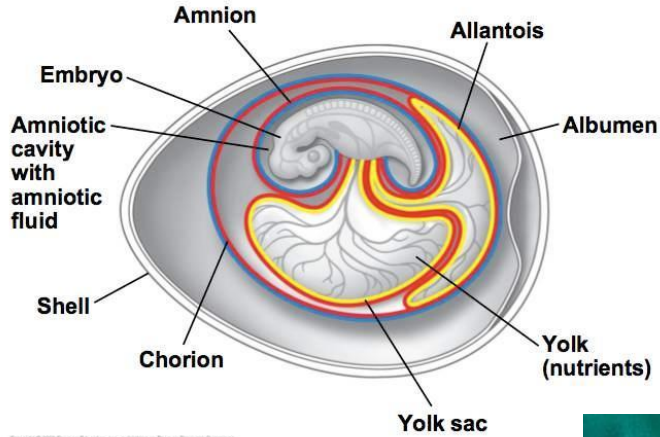


# VİRUSLARIN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ÜRETİLMESİ

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

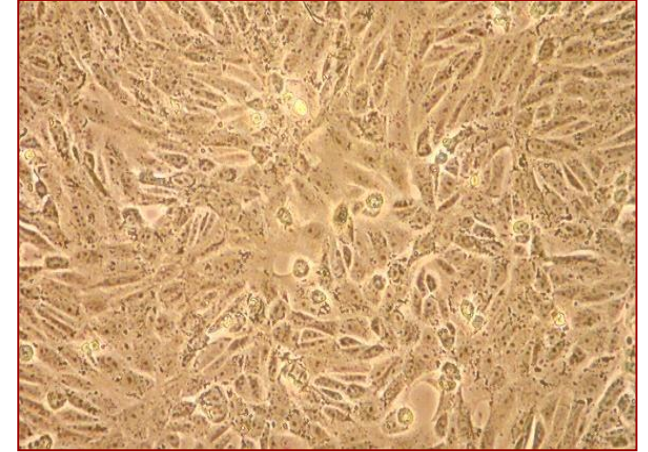
# VİRUSLARIN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ÜRETİLMESİ

Fig. 47-15



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

<http://biology.stackexchange.com>



Alıntı: S.Bilge Dağalp

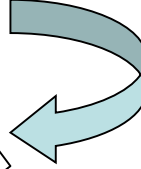
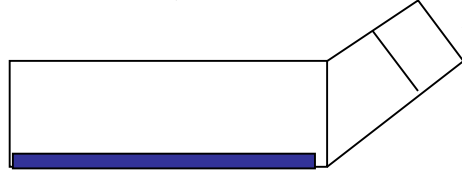
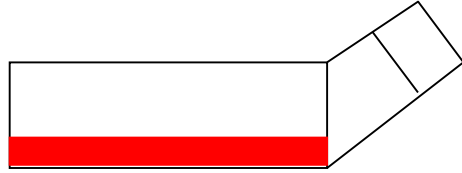


Abdurrahman Aksoy, DVM, PhD  
Dean of Veterinary Medicine Faculty  
Ondokuz Mayıs University/TURKEY

# Virus İnokulasyonu

- Adsorbsiyonlu Teknik
  - Virus inokulasyonundan sonra 37°C'de 1 saat süreyle ekstra bekleme süresi vardır.
- Adsorbsiyonsuz Teknik,
  - Virus inokulasyonundan sonra ekstra bekleme süresi olmaksizin virus üretme vasatı konulur.

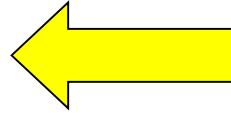
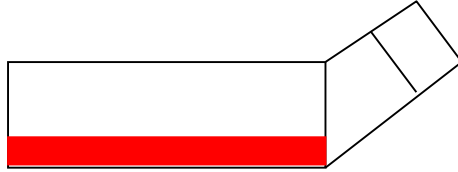
# Adsorbsiyonlu Teknik



Virus, inokulum  
(%1 Şişe hacmi)

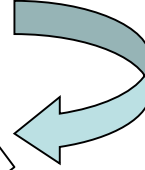
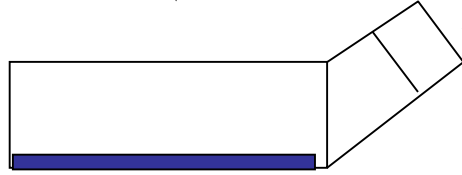
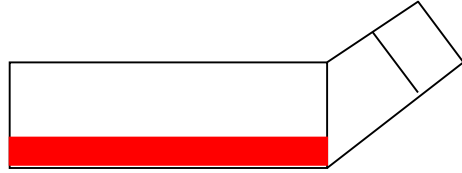


37°C'de 1 saat

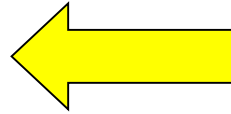
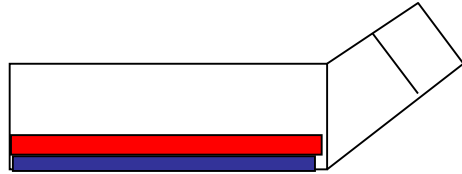


Virus Üretme Vasatı  
(Serumsuz Earle's)  
%10 Şişe hacmi

# Adsorbsiyonsuz Teknik



Virus, inokulum  
(%1 Şişe hacmi)



Virus Üretme Vasatı  
(Serumsuz Earle's)  
%10 Şişe hacmi

# Virus Üremesinin Takibi



- Günlük mikroskop kontrolleri ile virus üremesinin olup olmadığı kontrol edilir.
- Önce kontrol (enfekte edilmemiş) hücrelerin mikroskop kontrolleri yapılır. Buradaki hücreler paralelinde, enfekte edilen hücrelerdeki sitolojik bulgular araştırılır.

# CPE

- Virus üremesine bağılı olarak hücrelerde meydana gelen ve mikroskopik olarak tespit edilebilen değişikliklere **Sitopatik Etki** (cytopathic effect = cpe) denir.
  - Hücre sitoplazması
  - Hücre nükleusu

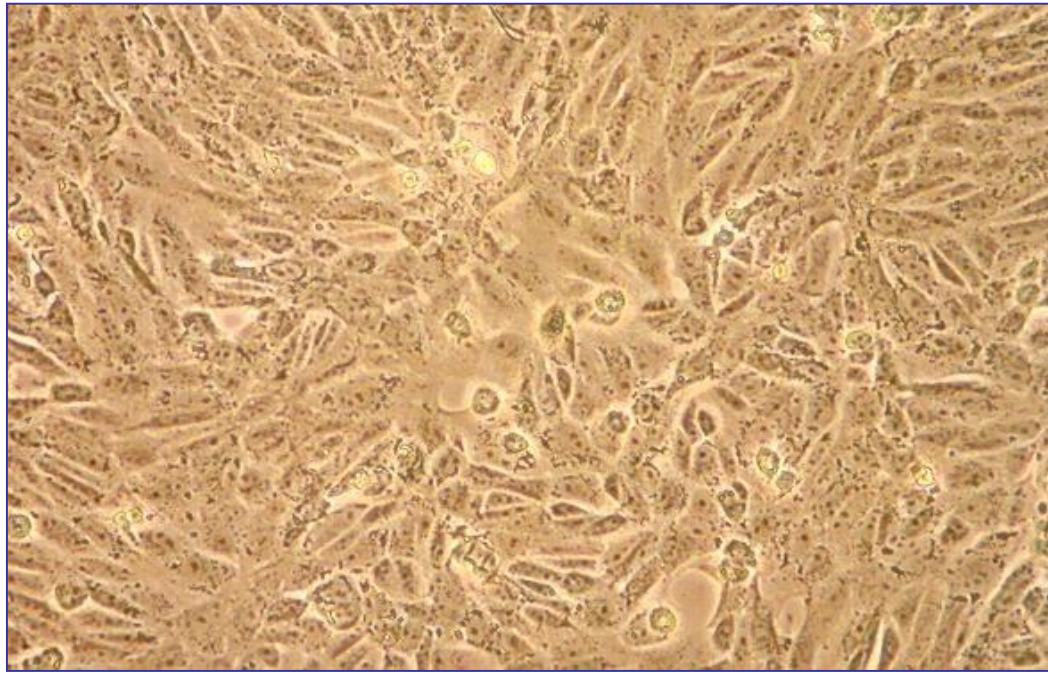
# CPE Çeşitleri

- Sitoplazmada,
  - Yuvarlaklaşma,
  - Granülasyon,
  - Vakuolizasyon,
  - Sinsityum (dev hücresi) oluşumu,
  - Agregasyon
  - İnkluzyon cisimciği oluşumu
- Çekirdekte,
  - Piknoz,
  - Karyorekzis,
  - Nukleolus büyümesi,
  - İnkluzyon cisimciği,



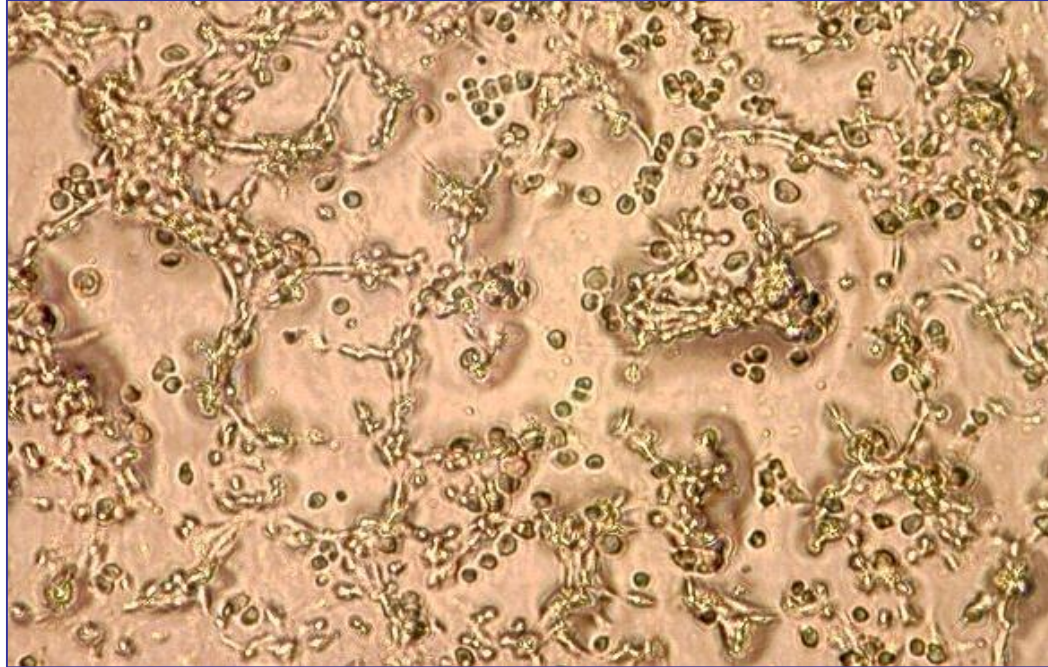
## Hücre Kontrol

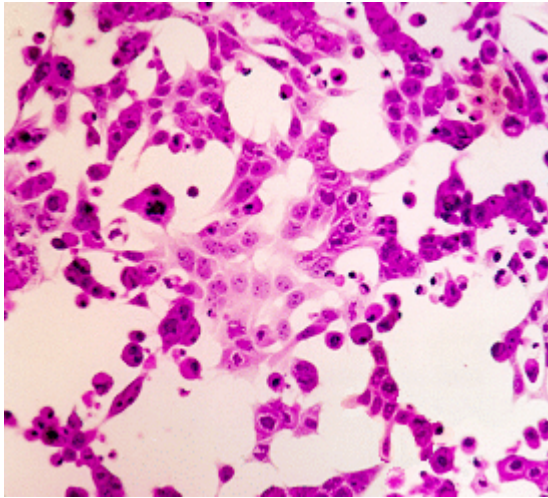
Alıntı: S.Bilge Dağalp



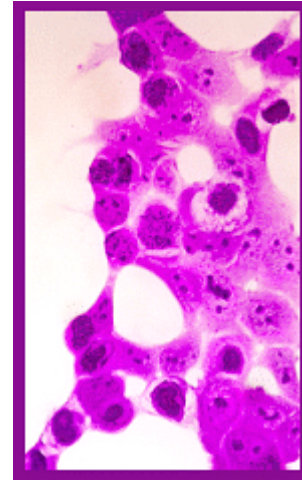
## Herpesvirus CPE

Alıntı: S.Bilge Dağalp

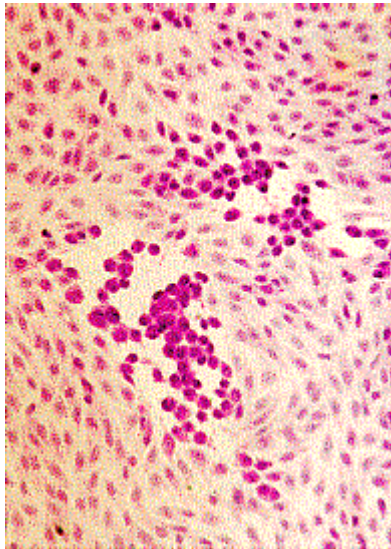




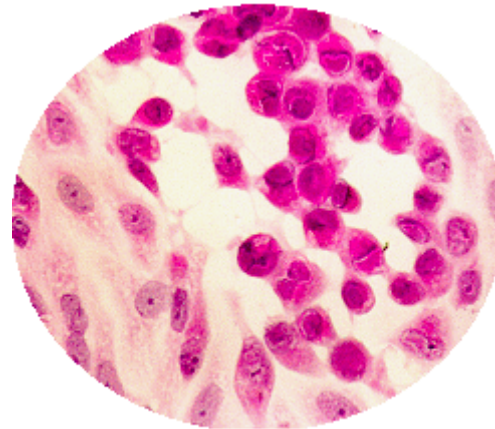
Adenovirus



enterovirus

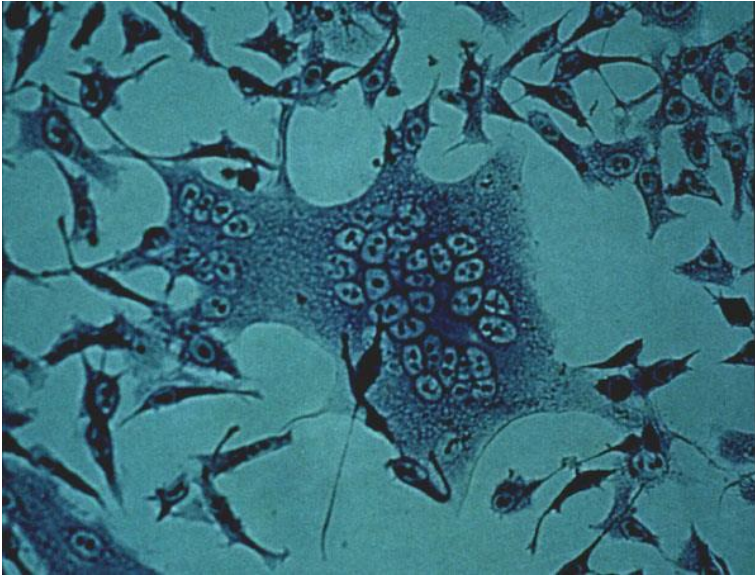


Herpesvirus

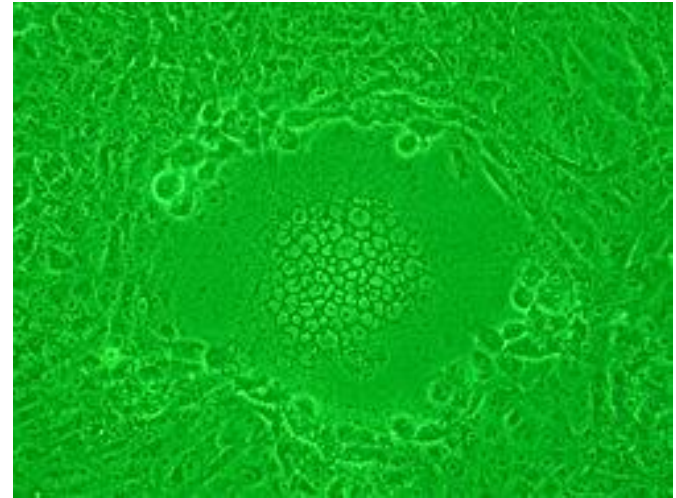




## Syncytia oluşumu

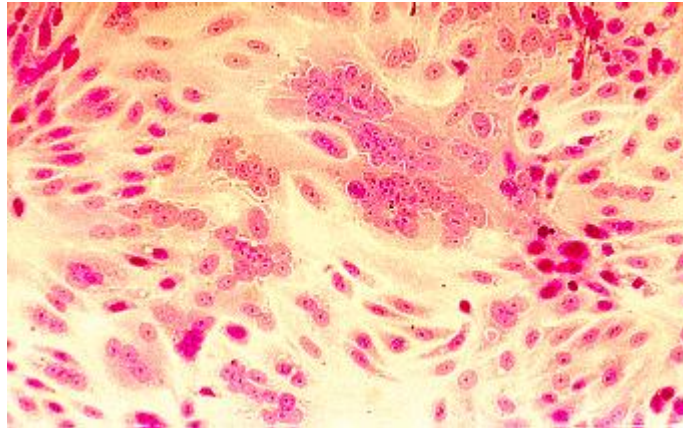


measles virus [www.tau.ac.il](http://www.tau.ac.il)



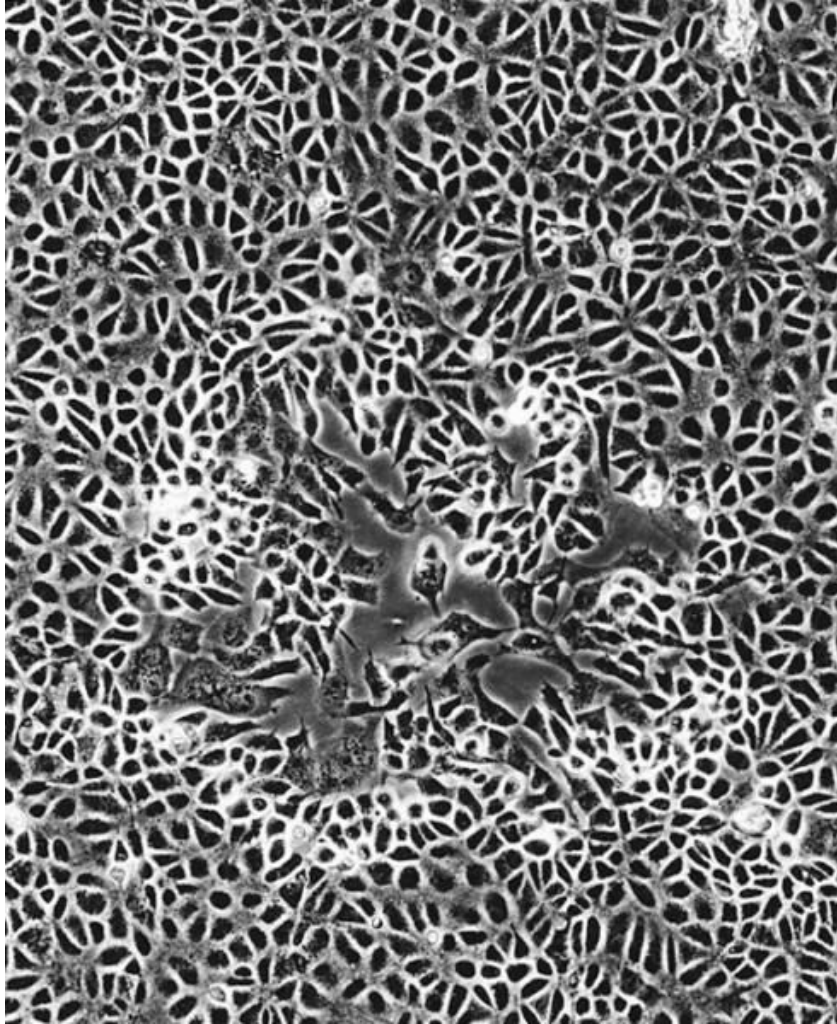
[HSV-1](https://en.wikipedia.org)

<https://en.wikipedia.org>

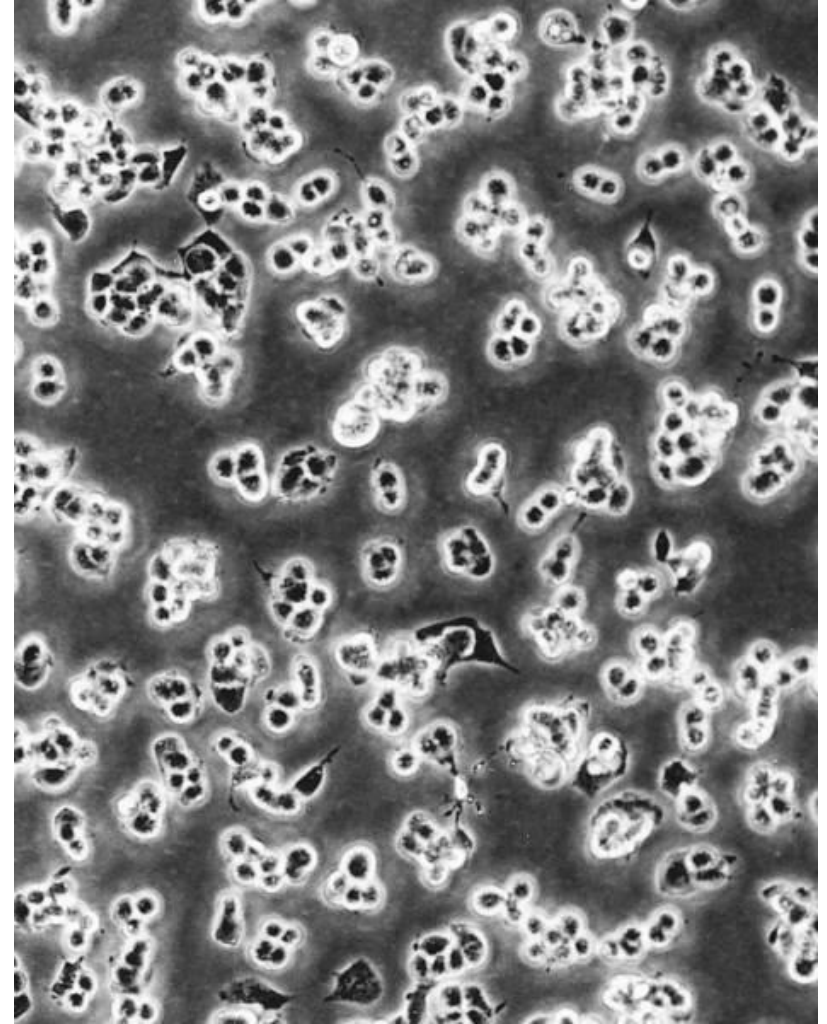


RSV (Courtesy of Linda Stannard, University of Cape Town, SA)

# CPE: Maymun Börek (BSC40) HK de vaccinia



Düşük dozlu enfeksiyon  
Tek plak



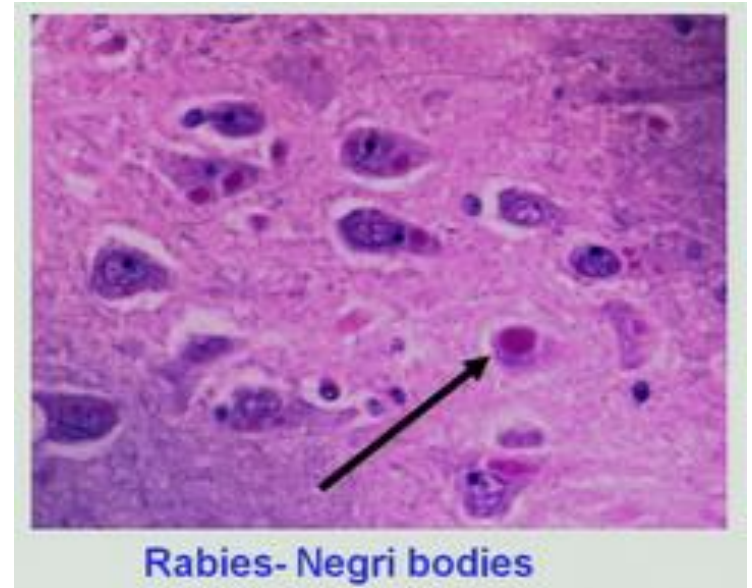
Yüksek dozlu, 48 saat



# Sitoloji: inkluzyon cisimcikleri



[vet.uga.edu](http://vet.uga.edu)



<http://infectionnet.org>;  
<http://virology-online.com>

Soru:

Her virus cpe yapar mı?

**Cevap:**

**HAYIR!!!!**

**Soru:**

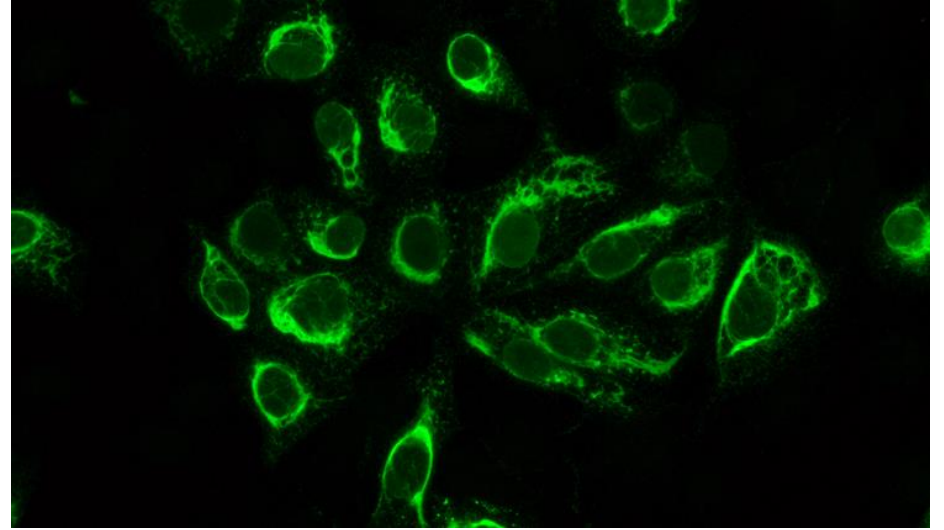
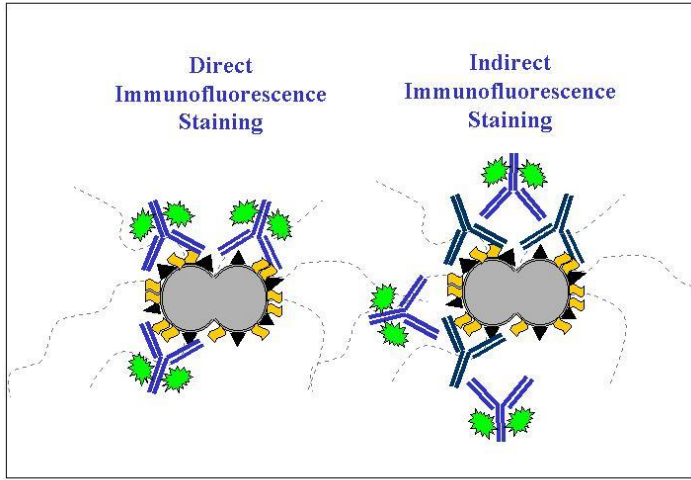
**O zaman virus varlığı nasıl tespit edilebilir ?**



# Hücre Kültüründe CPE yapmayan virusların tespiti

- Elektron mikroskopi
- İmmunositokimyasal (IFT, IPT) teknikler
- Hemadsorbsiyon
- Interferens
- Metabolik inhibisyon
- PCR

# İmmunofloresan Testi



<http://www.euroimmunblog.com>

[www.life.umd.edu](http://www.life.umd.edu)

# İmmunoperoksidaz Testi

1. Antijen adsorbe edilir  
(doku kültürü/doku kesiti)

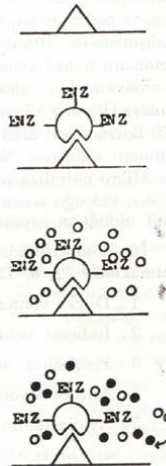
YIKAMA

2. Enzimle işaretli spesifik antikor  
ilave edilir

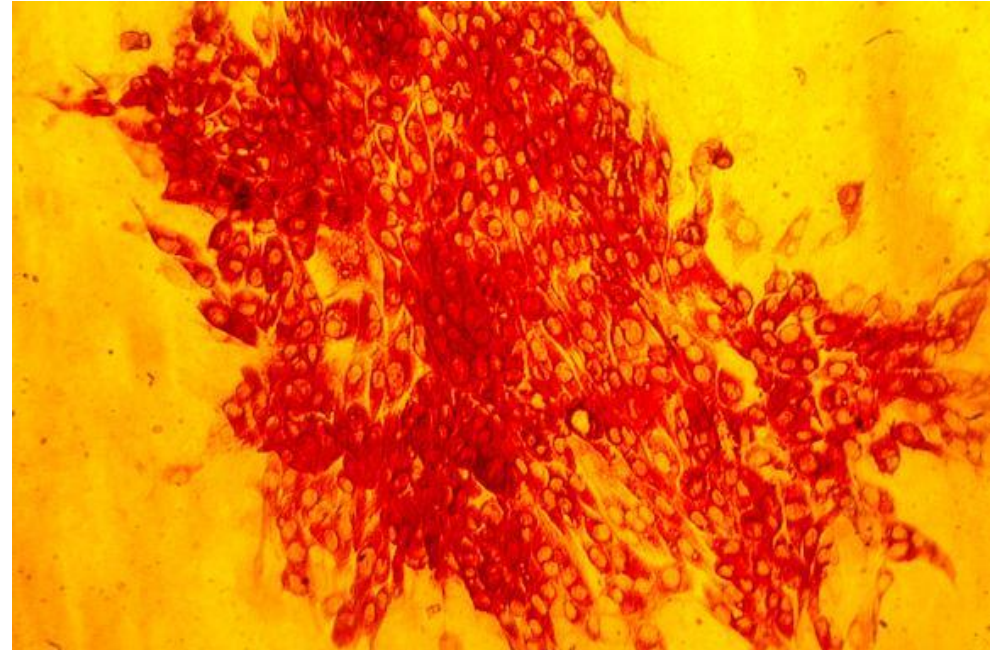
YIKAMA

3. Substrat ilave edilir

4. Inkubasyon sonunda değişen substratın  
değerlendirilmesi(gözle, mikroskopik)



Şekil 1. Direkt Yöntem



# Hemadsorpsiyon

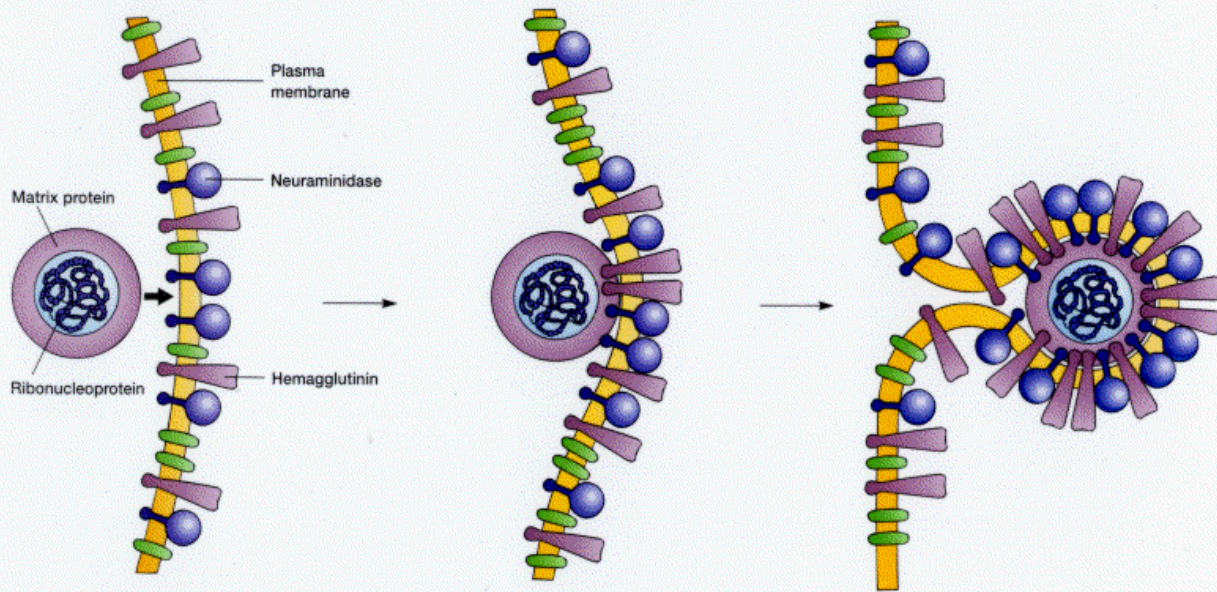
**Tanım:** Stoplazma membranından tomurcuklanarak çoğalan viruslar ile enfekte hücrelere, eritrositlerin adsorbe olması olayıdır.

Hemadsorbsiyonun oluşum mekanizması **VİRUSUN ZARLANMA PROSEDÜRÜ** ile ilişkilidir.

**Zarsız viruslarda**, NA ve viral proteinler birleşerek, nükleokapsidi oluşturur ve oluşan virus aralıklı (parvovirus) yada lizis (picorna) sonucu dışarıya dökülür.

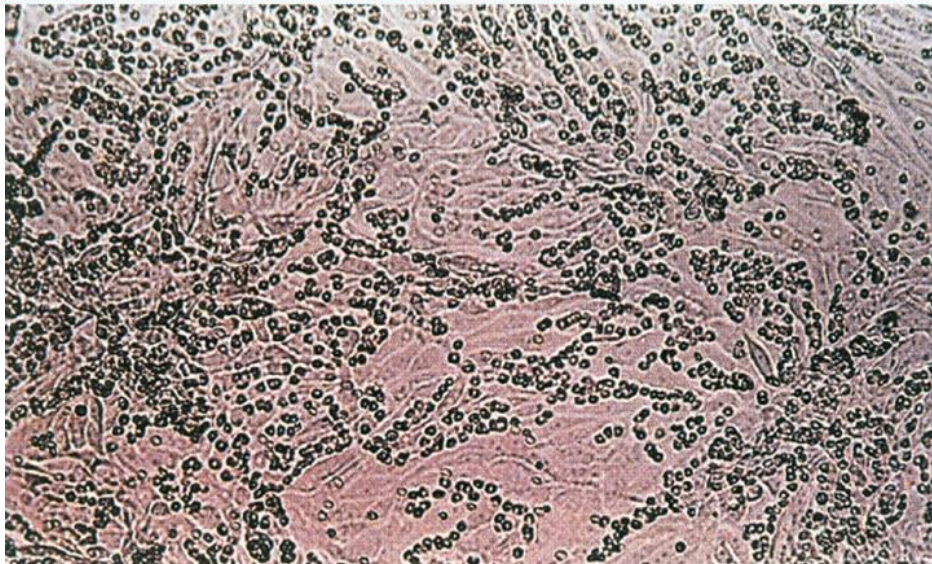
**Zarlı viruslarda** ise, oluşan nükleokapsit uygun hücre membranını kullanarak zarlanır. Çoğu zarlı virusda zarlanma hücre membranından tomurcuklanma yolu ile olur.





**81** Release of Influenza Virus  
Figure 18.8

Prescott et al. *Microbiology, 3rd*. Copyright © 1996 Times Mirror Higher Education Group, Inc., Dubuque, Iowa. All Rights Reserved.



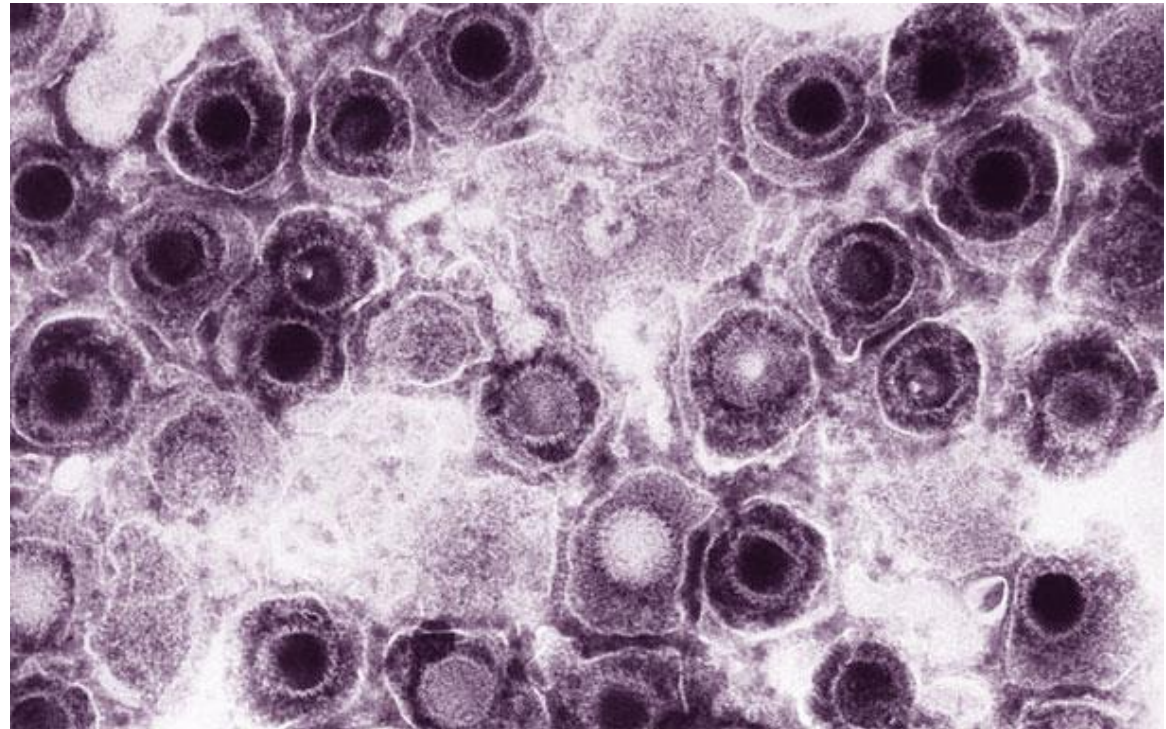
Murray et al: *Medical Microbiology*, 6th Edition.  
Copyright © 2009 by Mosby, an imprint of Elsevier, Inc. All rights reserved.



# Elektronmikroskopi(EM)



<https://www.iww.tu-clausthal.de/dienstleistungen/elektronenmikroskopie/>

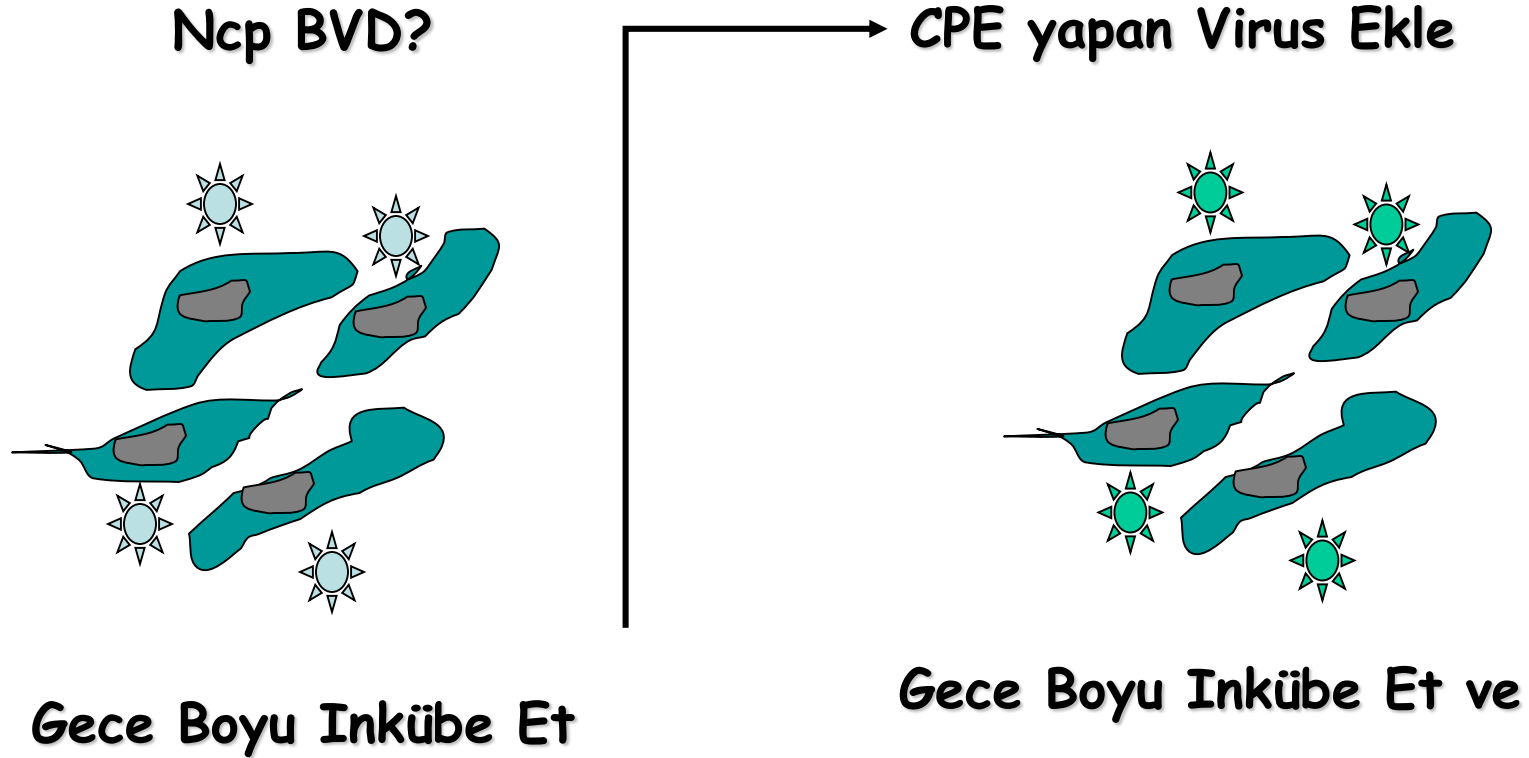


<http://blogs.discovermagazine.com/notrocketscience/2012/05/15/sleeper-viruses-explain-why-hiv-evolves-more-slowly-between-people-than-within-them/#.WLVn4TuLTb1>

# INTERFERON ve INTERFERENZ

İnterferens (engelleme) basit olarak, organizmaya giren aynı veya farklı tür virusların bağışıklık sisteminden farklı olarak birbirlerini tamamen veya kısmen engellemesi şeklinde açıklanabilir. Bu olay bazı viruslarda görülür ve bu engelleme ya virusların hücre içerisinde replikasyon sırasında birbirine yakın proteinlerin kullanılması veya daha çok interferonlar ile gerçekleşir.

**İnterferon Issac ve Linderman'ın Keşfi (1957), ilk olarak influenza virusu için gösterilmiş...**



**ENFEKSIYON YOK!!**



# Interferon

*“Interferonlar, değişik uyarıcıların varlığında hücre tarafından sentezlenen ve salgılanan, diğer hücreleri aktif virus enfeksiyonundan koruyan proteinlerdir”.*

**DeSomer and Cocito 1968**

İnterferonların molekül ağırlıkları 18-20 kDa arasında değişen ve 160 aminoasitli polipeptid lerdir. İnterferonlar konakçı türe özgüdür, virusa spesifik değildir. Virus enfekte hücrelerden serbest kalır ve diğer hücrelerin spesifik reseptörlerine bağlanarak antiviral proteinlerin sentezini aktive eder ve bu yolla viral replikasyonu inhibe eder. İnterferonlar viral enfeksiyondan hemen sonra salgılanır ancak hızla azalır.

## IFN hangi ajanlar tarafından indüklenir

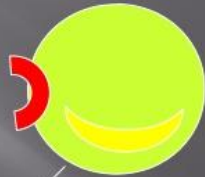
- Viruslar DNA (aktif) ve RNA (aktif ve inaktif)
- rickettsia
- bakteri (öz. gram-negative)
- canlı/inaktif mycoplasma
- protozoa
- Nükleik asitler öz. dsRNA

# How Does It Prevent Viral Replication?

virus



cells



(Other stimuli:  
exogenous ds RNA,  
LPS, bacterial  
components)

# How Does It Prevent Viral Replication?

virus



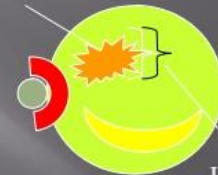
interferon



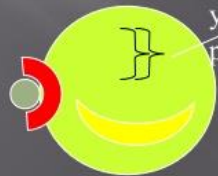
# How Does it Prevent Viral Replication?

No replication

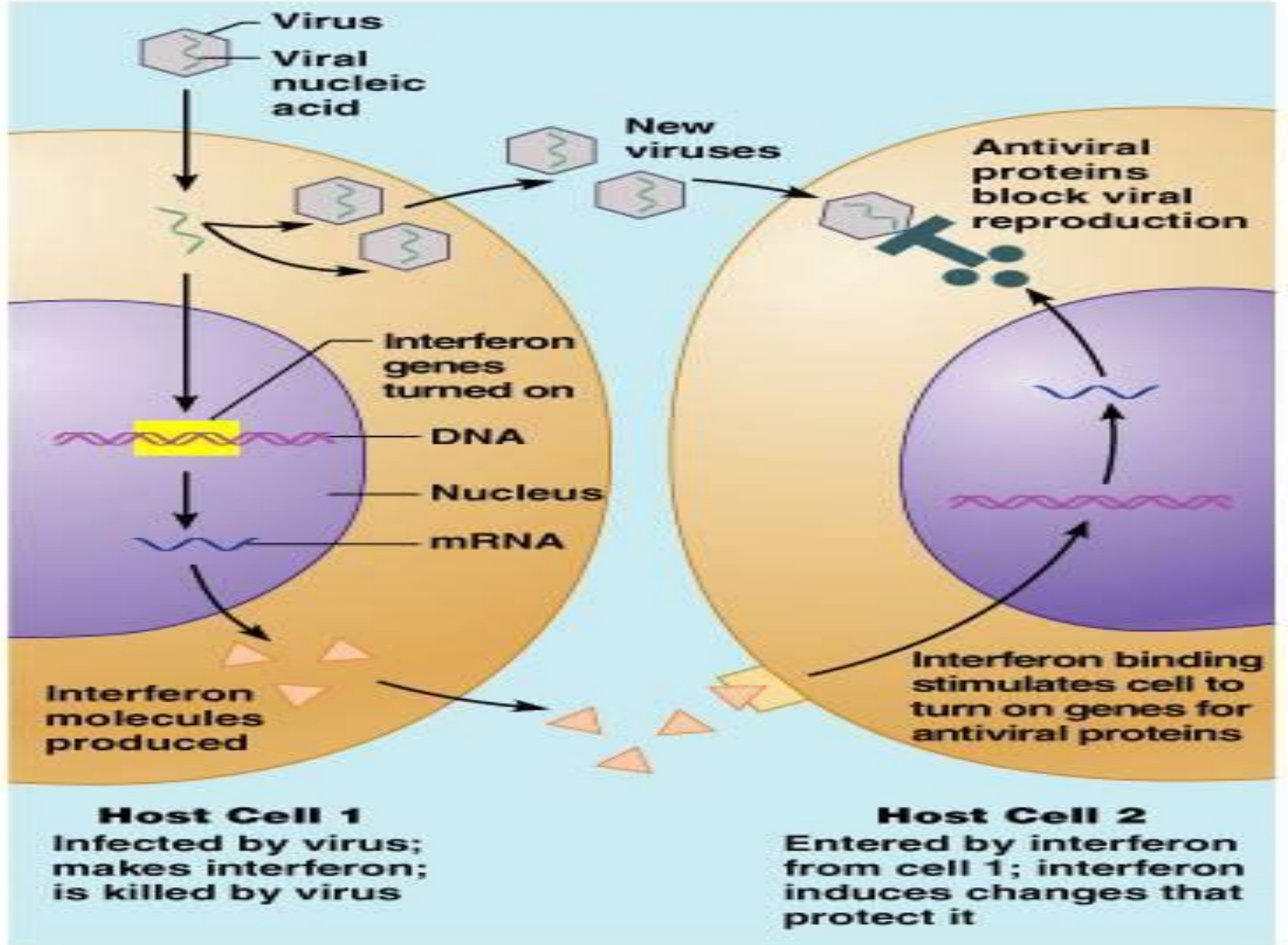
virus



Inhibitor



proteins



# İnterferon Tipleri

- II tipe ayrılır.

## Tip I:

- IFN alfa (a) lökositler tarafından yapılır.
- IFN beta (b) fibroblastlar tarafından yapılır.

## Tip II:

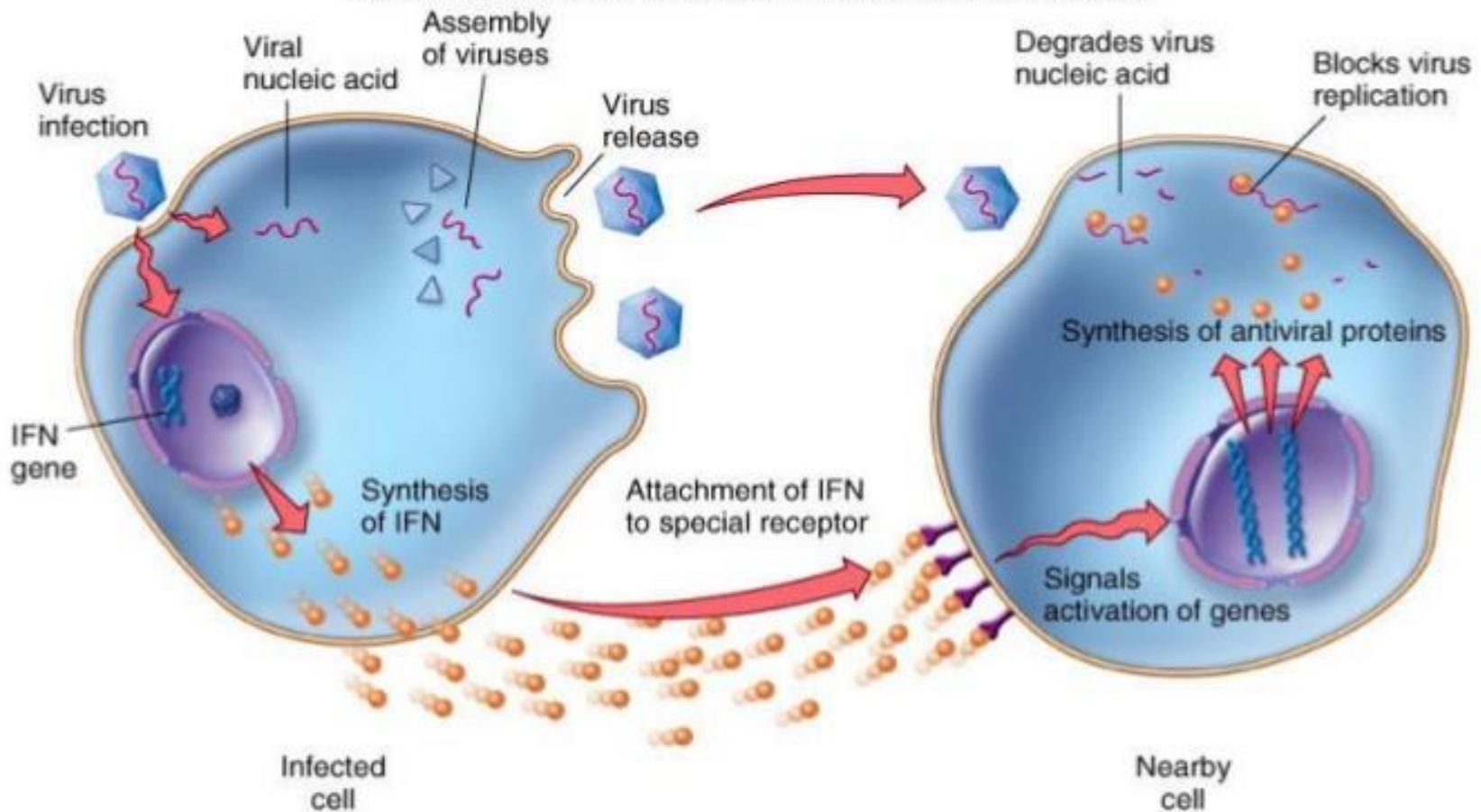
- IFN gamma (g) T lenfositler ve NK hücreleri tarafından yapılır.
- 2 reseptörlüdürler (biri a/b için ve diğeri g için)

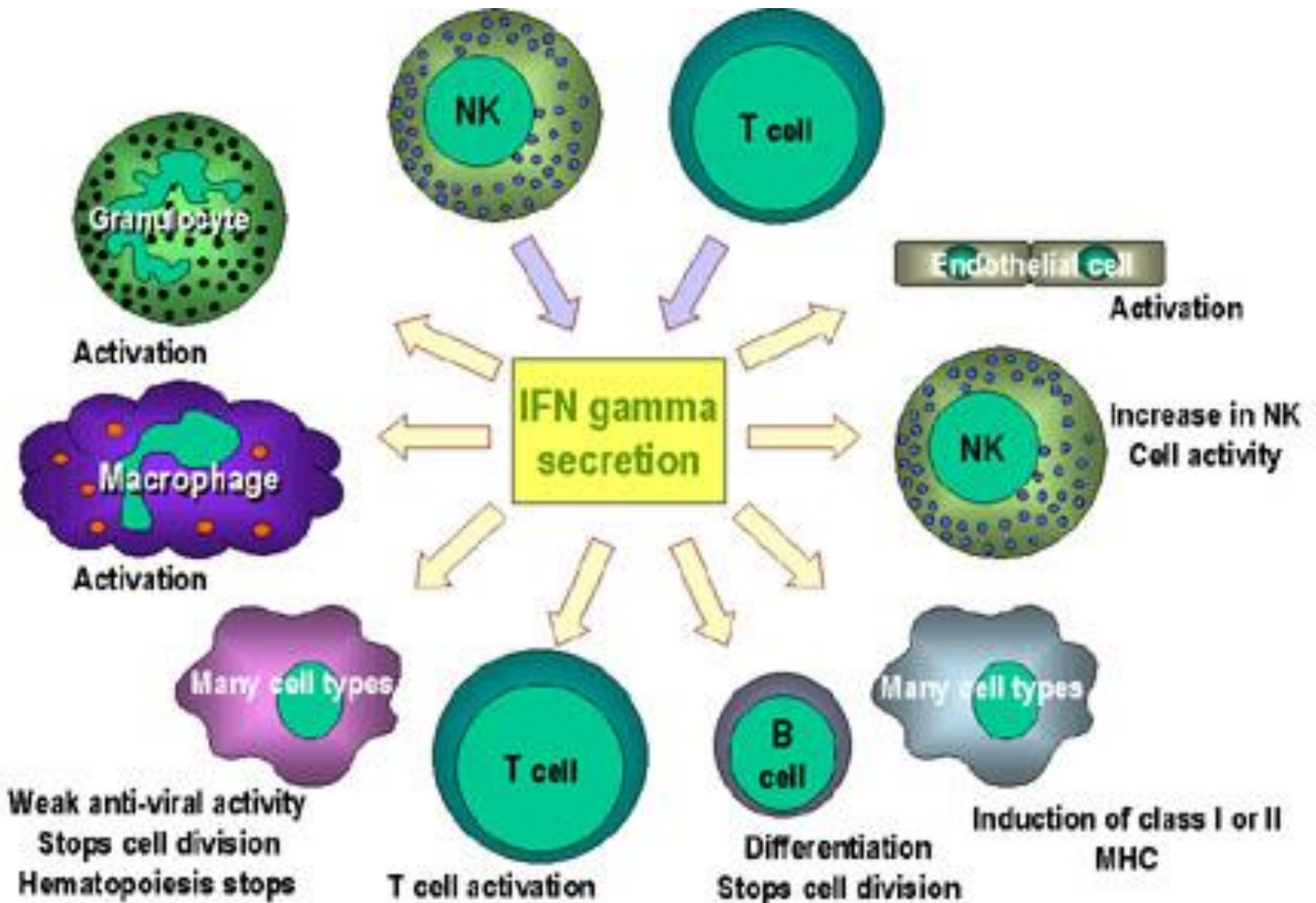
<b>Özellik</b>	<b>İnterferon <math>\alpha</math></b>	<b>İnterferon <math>\beta</math></b>	<b>İnterferon <math>\gamma</math></b>
<b>Kaynak</b>	lökosit	fibroblast	T lenfosit, NK cells
<b>Neden olan etki</b>	Viral infeksiyon	Viral infeksiyon	Antijen (veya mitojen)
<b>Alttip sayısı</b>	22	1	1
<b>Aktivitesi</b>	antiviral	antiviral	immunmodulatör
<b>Mekanizması</b>	Virus nükleikasiti parçalamak Virus replikasyonunu engellemek	Virus nükleikasiti parçalamak Virus replikasyonunu engellemek	MHC antijenlerin arttırılması, makrofaj ve sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonu



# Interferon $\alpha$ and $\beta$ Function

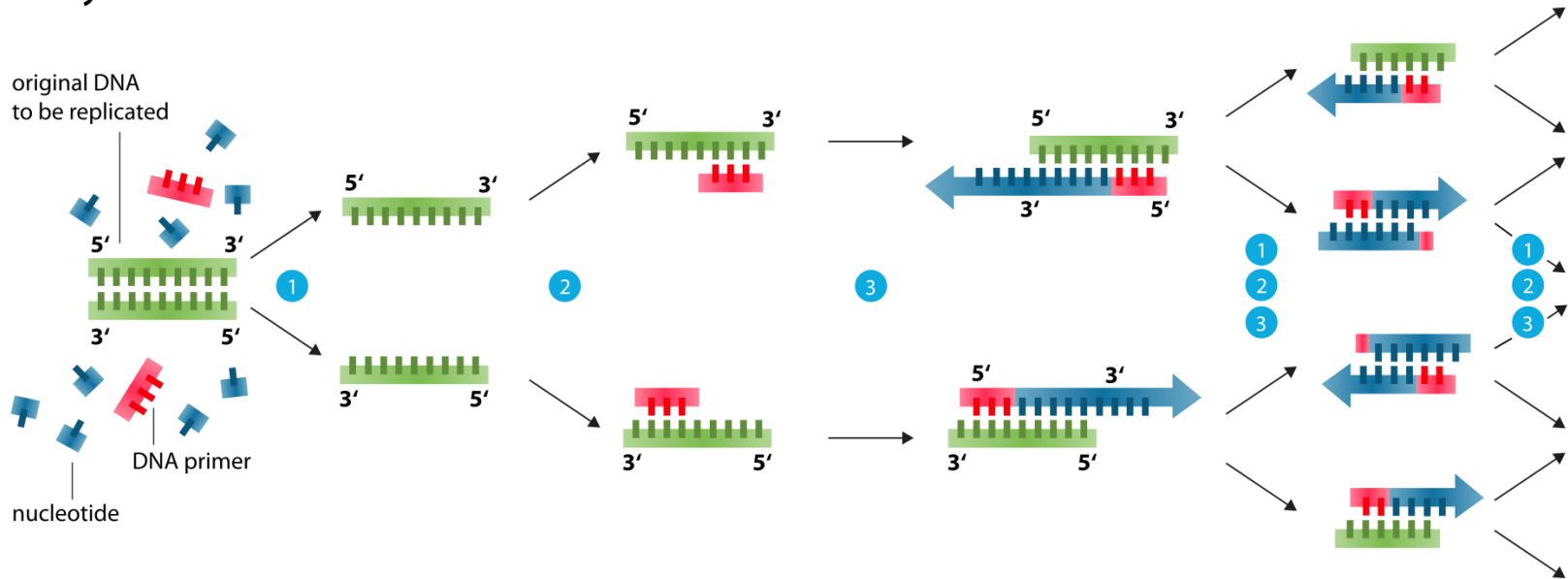
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.







# Polymerase chain reaction - PCR



- 1 **Denaturation** at 94-96°C
- 2 **Annealing** at ~68°C
- 3 **Elongation** at ca. 72 °C

