



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**VİRÜS TİTRESİNİN HEMAGLUTİNASYON TESTİ, PLAK
TESTİ VE REAL-TİME RT-PCR İLE EŞ ZAMANLI OLARAK
BELİRLENMESİ VE TEST SONUÇLARI ARASINDAKİ
KORELASYONUN SAPTANMASI**

DİLEK DEMİRCAN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. DENİZ DURALI

İSTANBUL – 2017



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**VİRÜS TİTRESİNİN HEMAGLUTİNASYON TESTİ, PLAK
TESTİ VE REAL-TİME RT-PCR İLE EŞ ZAMANLI OLARAK
BELİRLENMESİ VE TEST SONUÇLARI ARASINDAKİ
KORELASYONUN SAPTANMASI**

DİLEK DEMİRCAN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. DENİZ DURALI

İSTANBUL – 2017

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi

Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()

Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji

Tez Sahibi : Dilek DEMİRCAN

Tez Başlığı : Virüs Titresinin Hemaglutinasyon Testi, Plak Assay ve Real-Time PCR ile Eş Zamanlı Olarak Belirlenmesi ve Test Sonuçları Arasındaki Koorelasyonun Saptanması

Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi

Sınav Tarihi : 13.01.2017

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Yrd.Doç.Dr. Deniz DURALI

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr.Mustafa HASÖKSÜZ

İstanbul Üniversitesi

Yrd.Doç.Dr. Özlem GÜVEN

İstanbul Medipol Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun .19../.01../ 2017.. tarih ve .2017...../.03..... - ..07... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Nesrin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dilek DEMİRCAN



TEŞEKKÜR

İstanbul Medipol Üniversitesi Rektörü sayın Prof.Dr.Sabahattin AYDIN'a yüksek lisans öğrenimimde vermiş oldukları destekten dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Tez çalışmamın yürütülmesinde ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Deniz DURALI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans öğreniminde ve tez çalışmamda bilgi ve deneyimlerinden yararlanma fırsatı bulduğum hocam Yrd. Doç. Dr. Özlem GÜVEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmamı gerçekleştirdiğim TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü kurumunun müdürü sayın Prof. Dr. Şaban TEKİN ve alt proje ekibi olan TÜBİTAK ATL sorumlusu ve ekip çalışanlarına çok teşekkür ederim.

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ATCC: American Type Culture Collection

BSA V: Bovine Serum Albumin Fraction V

BSL-3 : Biosafety Laboratory-3

CMC: Carboxyl Metil Celulosa

CO₂ : Karbondioksit

CT : Cycle Time

CPE : Cytopathic Effect

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

EDTA : Etilendiamin Tetraasetik Asit

EID₅₀ :Effective Infectious Dose Fifty

FBS : Fetal Bovine Serum

HAU : Hemaglutinasyon Ünitesi

HEPES : (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

KH₂PO₄ : Potasyum dihidrojen fosfat

K₂HPO₄: Potasyum hidrojen fosfat

MC : Methyl Cellulose

MDCK : Madin Darby Canine Kidney

NaHCO₃: Sodyum bikarbonat

NaOH: Sodyum hidroksit

PBS: Phosphate Buffered Saline

PFU : Plak Forming Unit

RBC : Red Blood Cell

RT-PCR : Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction

TCID₅₀: Tissue Culture Infective Dose Fifty



RESİM LİSTESİ

Resim 4.3.1: Hemaglutinasyon Süreci

Resim 4.3.1.2: Mikrotitre Plakasında Pozitif ve Negatif Hemaglutinasyon Sonuçları

Resim 4.3.2.1.1: Altı-oyuklu Plaklarda Agar Kaplama ve %1.2, %0.6 ve %0.3 Avicel RC-581 İçeren Kaplamalar Altında Paralel Plak Tahlilleri

Resim 4.3.2.1.2: Altı-oyuklu Plaklarda Agar Altında ve %1.2 Avicel RC-581'de Paralel Plak Tahlilleri

Resim 4.3.2.1.3: Aynı Konsantrasyonda (%1,2) Üç Farklı Avicel (CL-661, RC-591 ve RC-581) Kullanılarak Hazırlanan Kaplamaların Altındaki Paralel Plak Tahlilleri

Resim 4.3.2.2: Metilselüloz ve Avicel RC-581 Altında Paralel Plak Tahlilleri

Resim 4.3.2.3: MDCK Hücrelerinde Influenza Virüsleri Tarafından Oluşturulan Plaklar %1.2 Avicel RC-581 Kaplaması Altındadır

Resim 6.1.1: Sıfırıncı Günde MDCK Hücreleri (x200 Büyütme)

Resim 6.1.2: Beşinci Günde Kontrol Grubu MDCK Hücreleri (200 Büyütme)

Resim 6.1.3: Beşinci Günde Influenza Virüsü ile Enfekte MDCK Hücreleri (x200 Büyütme)

Resim 6.2.1.1: Beşinci Günde Kontrol Grubu MDCK Hücreleri (x200 Büyütme)

Resim 6.2.1.2: Beşinci Günde Agaroz ile Kaplı MDCK (x200 Büyütme)

Resim 6.2.1.3: Beşinci Günde Agaroz ile Kaplı Influenza Virüsü ile Enfekte MDCK (x200 Büyütme)

Resim 6.2.2.1: Beşinci Günde Kontrol Grubu MDCK Hücreleri (x40 Büyütme)

Resim 6.2.3.1: Beşinci Günde %0.015 Avicel ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.3.2: Beşinci Günde %0.3 Avicel ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.3.3: Beşinci Günde %0.45 Avicel ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.3.4: Beşinci Günde %0.6 Avicel ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.3.5: Beşinci Günde %0.8 Avicel ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.3.6: Beşinci Günde %1.2 Avicel ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.3.7: Beşinci Günde %1.8 Avicel ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.3.8: Beşinci Günde %2.1 Avicel ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.3.9: Beşinci Günde %2.4 Avicel ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.3.10: Beşinci Günde %3 Avicel ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.3.11: Beşinci Günde %3.6 Avicel ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.3.12: Beşinci Günde %4.2 Avicel ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.3.13: Beşinci Günde %4.8 Avicel ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.4.1: Beşinci Günde %0.125 CMC ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.4.2: Beşinci Günde %0.25 CMC ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.4.3: Beşinci Günde %0.5 CMC ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.4.4: Beşinci Günde %0.75 CMC ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.4.5: Beşinci Günde %1 CMC ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.4.6: Beşinci Günde %1.25 CMC ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.4.7: Beşinci Günde %1.5 CMC ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.4.8: Beşinci Günde %1.75 CMC ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.4.9: Beşinci Günde %2 CMC ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.4.10: Beşinci Günde %2.5 CMC ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.4.11: Beşinci Günde %3 CMC ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.4.12: Beşinci Günde %3.5 CMC ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.4.13: Beşinci Günde %4 CMC ile Kaplı MDCK (x40 Büyütme)

Resim 6.2.5.1.1: Kaplama Olarak Üst Sıra İlk Kuyu ve Alt Sıra %1.2 Avicel, Üst Sıra Son İki Kuyu %2 CMC Kullanılarak Yapılan Plak Testi

Resim 6.2.5.1.2: Kaplama Olarak Sadece Üst Sıra İlk İki Kuyuda %1 CMC Kullanılarak Yapılan Plak Testi

Resim 6.2.5.1.3: Kaplama Olarak Üst Sırada %2 CMC, Alt Sırada %1 CMC Kullanılarak Yapılan Plak Testi

Resim 6.2.5.1.4: Kaplama Olarak Üst Sırada İki Kuyu ve Alt Sırada %2.4 Avicel, Üst Sıra Sağdaki Son Kuyuda %1.2 Avicel Kullanılarak Yapılan Plak Testi

Resim 6.2.5.2.1: Kaplama Olarak %2 CMC Kullanılarak Yapılan Plak Testi

Resim 6.2.5.2.2: Kaplama Olarak %1.2 Avicel Kullanılarak Yapılan Plak Testi

Resim 6.3.1: Realtime RT-PCR Sonucu Elde Edilen Pik Görüntüleri

Resim 6.4.1.1: Farklı Virüs Pasajlarının Hemaglutinasyon Testinde Karşılaştırılması

Resim 6.4.2.1: Yedinci Pasaja ait Virüsün Hemaglutinasyon Test Görüntüsü

TABLO LİSTESİ

Tablo 6.1.4: Influenza Virüsü İle Enfekte Edilen MDCK'lar ve Kontrol Olarak Kullanılan MDCK'lar

Tablo 6.2.1.4: Agaroz Kaplama Kullanılarak Yapılan Plak Testi

Tablo 6.2.4.14: Kaplama Olarak Kullanılabilecek Farklı Polimerlerin Farklı Konsantrasyonlarda Ayarlanıp MDCK Hücre Morfolojisine Etkisinin Test Edilmesi

Tablo 6.2.5.3: Avicel ve CMC'nin İki Farklı Konsantrasyonlarını Kullanarak Plak Testi Uygulamasında Karşılaştırılması

Tablo 6.3.2: Realtime RT-PCR Sonucu Elde Edilen Veriler

Tablo 6.4.3: Hemagglutinasyon Testi, Plak Testi, Real-Time RT-PCR Testi Aynı Anda 7. Pasaja Ait Virus Dilusyonu İle Çalışıldığında Oluşan Bağlantı

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Tez Onayı.....	i
Beyan.....	ii
Teşekkür.....	iii
Kısaltmalar ve Simgeler Listesi.....	iv
Resim Listesi.....	vi
Tablo Listesi.....	ix
İçindekiler.....	x
1-ÖZET.....	1
2-ABSTRACT.....	3
3-GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
4-GENEL BİLGİLER.....	6
4.1-Influenza A Virüsleri.....	6
4.1.1-Sınıflandırılması.....	6
4.1.2-Genom Organizasyonu.....	6
4.1.3-Yüzey Glikoproteini Hemaglutinin (HA).....	6
4.2-Influenza Virüsünün Çoğaltılması.....	7
4.3-Influenza Virüsünün Titrasyon Ve Enfektivitesinin Ölçümünde Kullanılan Testler.....	7
4.3.1-Hemaglutinasyon Testi.....	7
4.3.1.1-Kırmızı Kan Hücrelerinin Toplanması ve Hazırlanması.....	9

4.3.1.2-Sonuçların Yorumlanması.....	9
4.3.1.3- Notlar.....	11
4.3.2-Plak Testi.....	12
4.3.2.1-Avicel ve Agar Kaplamaların Karşılaştırılması.....	14
4.3.2.2-Avicel ve MC Kaplamaların Karşılaştırılması.....	16
4.3.2.3-Farklı Influenza Türlerine Göre Plak Oluşumu.....	18
4.3.3-Realtime RT-PCR.....	19
5-METOT VE MATERYAL.....	22
5.1-Kullanılan Kimyasal Maddeler, Biyolojik Örnekler Ve Ekipmanlar.....	22
5.2-Solusyonların Hazırlanması.....	23
5.3-Influenza Virüs Stoğunun Mdck Hücrelerinde Üretimi.....	24
5.3.1-Virüs Enfeksiyonu İçin MDCK Hücrelerinin Hazırlanması.....	24
5.3.2-MDCK Hücrelerin Altkültürü.....	25
5.3.3-MDCK Hücrelerine Virüs Ekimi.....	26
5.3.4-Virüs Stoklama İşlemi.....	26
5.4-Virüs Titrasyonunun Ve Enfektivitesinin Belirlenmesi.....	27
5.4.1-Plak Testi.....	27
5.4.1.1-Kullanılan Kimyasal Maddeler, Biyolojik Örnekler ve Ekipmanlar.....	27
5.4.1.2-Solusyonların Hazırlanması.....	29
5.4.1.3-Plak Testinde Kaplama Olarak Agaroza Kullanımı.....	31
5.4.1.3.1-Virüs Dilüsyonlarının Hazırlanması.....	32

5.4.1.4-MDCK Hücrelerinde Kaplama Olarak Farklı Konsantrasyonlardaki CMC ve Avicel Kullanımı.....	33
5.4.1.4.1-Yedi Pasajlama Sonucu Elde Edilen Virüsün Plak Testinde Enfektivitesinin Hesaplanması.....	36
5.4.1.4.1.1-Virüs Dilüsyonlarının Hazırlanması.....	38
5.4.1.4.2-Farklı Virüs Dilüsyonlarının Kaplama Olarak 2% CMC Ve 1,2% Avicel Kullanarak İnfektivitesinin Hesaplanması.....	39
5.4.1.4.2.1-Plak Testi İçin Virüs Dilüsyonlarının Hazırlanması.....	41
5.4.2-Real-Time Rpci Yöntemi İle Virüs Titrasyonunun Belirlenmesi.....	42
5.4.2.1-Kullanılan Kimyasal Maddeler, Biyolojik Örnekler Ve Ekipmanlar.....	42
5.4.2.2-Pasaj-7'ye ait Virüs Süspansiyonundan Total RNA İzolasyonu.....	44
5.4.2.3-Realtime RT-PCR Uygulaması.....	45
5.4.3-Hemaglutinasyon Testini Kullanarak Virüs Titrasyonunun Belirlenmesi.....	46
5.4.3.1-Kullanılan Kimyasal Maddeler, Biyolojik Örnekler ve Ekipmanlar.....	46
5.4.3.2-Hemaglutinasyon Testi.....	47
6-BULGULAR.....	49
6.1-Influenza Virus Stoğu İle Enfekte Edilen Mdck'lar Ve Kontrol Olarak Kullanılan Mdck'lar.....	49
6.2-Plak Testi.....	50
6.2.1-Plak Testinde Kaplama Olarak AgaroZ Kullanımı.....	50
6.2.2-Plak Testinde Kaplama Olarak Farklı Konsantrasyonlarda CMC Ve Avicel Kullanımı.....	52
6.2.3-MDCK Hücrelerinde Kaplama Olarak Farklı Avicel Konsantrasyonları.....	52
6.2.4-MDCK Hücrelerinde Kaplama Olarak Farklı CMC Konsantrasyonları.....	59

6.2.5-Yedi Pasajlama Sonucu Elde Edilen Virüsün Plak Testinde Enfektivitesinin Hesaplanması.....	67
6.2.5.1-Farklı Virüs Dilüsyonlarıyla Enfekte Edilen MDCK'lara Kaplama Olarak Farklı Konsantrasyonlarda CMC ve Avicel Kullanarak Plak Testi Uygulaması.....	67
6.2.5.2-Farklı Virüs Dilüsyonlarının Kaplama Olarak 2% CMC ve %1.2% Avicel Kullanarak Plak Testinde Uygulaması.....	69
6.3-Yedi Pasajlama Sonucu Elde Edilen Virüsün Realtime Rt-Pcr Yöntemi İle Titrasyonunun Belirlenmesi.....	72
6.4-Yedi Pasajlama Sonucu Elde Edilen Virüsün Hemaglutinasyon Testi Yöntemi İle Titrasyonunun Belirlenmesi.....	73
6.4.1-Yedi Pasajlama Sonucu Elde Edilen Virüsün Bir Alt Ve Bir Üst Pasajla Karşılaştırılması.....	73
6.4.2-Yedi Pasajlama Sonucu Elde Edilen Virüsün Üçlü Olarak Çalışılması.....	74
7-TARTIŞMA	76
8-SONUÇ.....	83
9-KAYNAKLAR.....	84
10-ETİK KURUL ONAYI.....	92
11-ÖZGEÇMİŞ.....	95

1. ÖZET

VİRÜS TİTRESİNİN HEMAGLUTİNASYON TESTİ, PLAK TESTİ VE REAL-TİME RT-PCR İLE EŞ ZAMANLI OLARAK BELİRLENMESİ VE TEST SONUÇLARI ARASINDAKİ KORELASYONUN SAPTANMASI

Virüslerin titrasyonu ve enfektivitesi hemagglütinasyon testi, plak testi ve real-time RT-PCR ile belirlenir. Virolojide bu testlerin kullanım alanları çok farklıdır. Hemagglütinasyon testi, tip A influenza virüsleri gibi hemagglütinasyon özelliği gösteren etkenlerini görüntülemek için embriyonlu tavuk yumurtasının amniyoallantoik sıvısı ya da hücre kültürü izolatları kullanılarak yapılan bir testtir. Canlı ve inaktif virüsler HA testiyle tespit edilebilir. Bu test bir dereceye kadar sayısal olup 1 hemagglütinasyon ünitesi (HAU) yaklaşık olarak 5-6 log virüse denk gelmektedir. Yapılması ucuz ve nispeten basittir. Birçok faktör (eritrosit kalitesi, laboratuvar sıcaklığı, laboratuvar donanımı, kullanıcının teknik uzmanlığı) test her çalıştırıldığında yorumlanmasında bir takım farklılıklara neden olabilir. Plak testi, tek tabakalı hücre kültüründe enfeksiyöz virüslerin belirlenmesinde kullanılan en yaygın yöntemdir. Bu testte her enfeksiyöz virüs partikülü plak olarak bilinen enfekte hücrelerin lokalize bir alanı altında çoğalır. Plaklar, genel hücresel boyalar tarafından tespit edilen ölü/yıkılmış hücrelerin alanı olarak ya da immün boyama ile tespit edilen enfekte hücrelerin alanı olarak gözlemlenir. Real-time RT-PCR (rRT-PCR) tekniği rutin gözetim, salgın değerlendirme ve araştırma için 2000'li yılların başından beri influenza virüsünün saptanması için kullanılmaktadır. rRT-PCR'in bazı avantajları: yüksek hassasiyet, yüksek özgüllük, hızlı sonuç verme, ölçeklenebilirlik, maliyeti ve niceliksel niteliğidir. Bununla birlikte, rRT-PCR tavuk embriyolarından ve hücre kültüründen elde edilen virüs izolasyonlarından daha ucuzdur ve çok sayıda numuneye birlikte uygulanabilir. Fakat, influenza virüsünün yüksek genetik değişkenliği, hassasiyeti düşürebilir ve yanlış negatif sonuç olasılığını artırabilir. Çalışmamızda Influenza A H1N1/pdm/09/California suşu kullanılarak virüs titresinin en doğru şekilde belirlenmesini sağlayacak olan üç farklı yöntemin (hemagglütinasyon testi, plak testi ve realtime RT-PCR) sonuçları arasındaki

ilişkinin saptanması ve özellikle enfektivitenin belirlenmesine yönelik uygulanan plak testinde kullanılan farklı metodların karşılaştırılması amaçlanmıştır. Plak testinde agar kaplamının kullanıldığı yöntemde sıcaklığa duyarlılıkları nedeniyle hücrelerin ölmesi sonuç alınamamasına neden olmuştur. Uygulanan CMC ve Avicell içerikli ortamların ise plak oluşumuna izin verdiği gözlemlendi. CMC kaplama ortamına kıyasla, Avicel içeren ortamda önemli ölçüde daha büyük plaklar oluştu. Plak boyutu Avicel konsantrasyonunda azalma ile arttı, çok seyreltilmiş Avicel kaplamaları bile lokalize plak oluşumunu sağladı. Sonuç olarak, düşük viskoziteye sahip oldukları için Avicel kaplamaların, özellikle 96 oyuklu kültür plakalarında metilselüloz kaplamalara göre daha kolay kullanılabilir; ayrıca daha hızlı ve daha duyarlı bir yöntem olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Hemagglütinasyon, Tip A İnfluenza, İnfluenza deteksiyonu, Virüs titresi, Real-time RT-PCR, Virus kantitasyonu, Plak testi, Virüs enfektivitesi

Bu çalışma TÜBİTAK ARDEB 1003 "Tersine Genetik ve Sentetik Biyoloji Yöntemleri kullanılarak Hücre Temelli İnfluenza Prototip Aşı Geliştirilmesi" projesi tarafından 213S159 nolu proje ile desteklenmiştir.

2. ABSTRACT

IDENTIFICATION OF VIRUS TITRE AT THE SAME TIME AS HEMAGGLUTINATION TEST, PLAQUE TEST AND REAL-TIME RPCR AND DETERMINATION OF THE COHERENCE BETWEEN TEST RESULTS

Virus titration and infectivity are determined by using hemagglutination assay, plaque assay and real-time RT-PCR. These tests are used in various purposes in virology. Hemagglutination assay is carried out to visualize factor showing hemagglutination features by using amnion allontoic fluid or cell culture isolates. It can differentiate live or inactive viruses. HA assay is quantitative test and one unit of hemagglutination (HAU) approximately corresponds to 5-6 log viruses. It is labor friendly and not costly method. Assay results are affected by several factors including erythrocytes, external temperature, laboratory equipments, and expertise of researcher. Plaque test is most commonly used method to determine infectious viruses in monolayer cell culture. In this test each infectious virus particle is proliferate and forms local areas called plaques. Plaques appear as death/destroyed cell areas that can detect with cellular dyes and immunostaining. Real-time RT-PCR (rRT-PCR) has been being used for routine surveillance, epidemic evaluation and research of influenza virus since 2000s. rRT-PCR offers important advantages including high sensitivity and specificity, scalability, low cost, and quantification. In addition, rRT-PCR costs less that chicken embryos and viruses obtained from cell culture and is suitable for working with high number of samples. However, high genetic variation of influenza virus can affect sensitivity and increase possibility of false negative results. In this study, our aims were to determine relationship between results of three methods that is used to determine virus titration (hemagglutination assay, plaque assay and real-time RT-PCR) and to compare different plaque assays that are used for detection of infectivity by using Influenza A H1N1/pdm/09/Californiastrain. Agar coating method in plaque assay resulted in no data because of cell death due to heat-sensitivity of cells. It is observed that mediums containing CMC and Avicel allow plaque formation. Avicel containing mediums

allowed bigger plaque formation compared to CMC containing medium. Also with decrease in Avicel concentration plaque size increased. Even highly diluted Avicel coats allowed plaque formation. As a result, we showed that Avicel coats are more suitable for 96-well plate compared to methylcellulose coats due to their low viscosity. Also they provide faster and more sensitive method.

Key words:Hemagglutination, Type A influenza, Influenza detection, Virus titer, Real-time RT-PCR,Virus quantitation, Plaque assay, Virus infectivity

This study was supported by TÜBİTAKARDEB 1003 “Development of Cell Based Influenza Prototype Vaccine Using the Reverse Genetics and Synthetic Biology Methods” Project under the No. 213S159project

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Mevsimsel influenza suşları için yapılan rutin testlerin yanısıra, ortaya çıkanyeni virüslerin hızla saptanması için mevcut surveyans sistemlerinin kapasitesini arttırmaya yönelik yeni yöntemlerin geliştirilmesi önem taşımaktadır. Ayrıca, sağlık durumu ciddi olan bireyler için hızlı tanı ve teşhis gereklidir. Mevcut testlerin prediktif değerlerindeduyarlılık, özgüllük ve doğruluk sorunları bulunmaktadır. In vitro koşullarda influenza virus replikasyonunun izlenmesi için hızlı ve hassas metodlara gerek vardır. Çalışmamızda farklı temellere dayanan üç yöntem karşılaştırılmıştır. Bunlar; 1) hemagglutinasyon (HA) deneyi, kültür süpernatanlarındaki virüs enfektivite titresinin ölçülmesi esasına dayanır, Egawa ve ark. (9), 2) Plak deneyi, hücre kültüründe hücre tabakasında oluşan plak tahlilleri antiviral maddelerin ve bulaşıcı virüslerin ölçümü için en yaygın yöntemdir. Bu testte, enfekte olmuş hücrelerde lokalize bölgelerin her biri enfeksiyona neden olan virüsün o bölgede çoğaldığını ifade eden plak olarak tanımlanır, Maramorosch ve ark. (10), 3) Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), geleneksel virüs kültürü yöntemi ile kıyaslandığında influenza virüsünün klinik teşhisinde yüksek hassasiyette olup teşhis süresi kısadır. Özellikle, realtime RT-PCR influenza virüslerinin belirlenmesi için yüksek hassasiyette ve özgüllükte olduğundan altın standart method olarak kabul edilmektedir, DSÖ (11), Pabbaraju ve ark. (12). Bu tezin amacı, Influenza A H1N1/pdm/09/California suşu kullanılarak virüs titresinin en doğru şekilde belirlenmesini sağlayacak üç farklı yöntemin (hemagglutinasyon testi, plak testi ve realtime RT-PCR) sonuçları arasındaki ilişkinin saptanmasıdır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Influenza A Virüsleri

4.1.1. Sınıflandırılması

Influenza virüsleri beş cins içeren Orthomyxoviridae ailesindedir. Bunlar; Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C, Thogotovirus, ve Isavirus'dür, Wittwer ve ark. (13). Influenza virüsleri hemagglutinin (HA) ve nörominidaz (NA) proteinlerinin antijenik özelliklerine göre alttiplere sınıflandırılır. Güncel verilere göre, 16 HA alttipi (H1-16) ve 9 NA alttipi (N1-9) tanımlanmıştır. Geçtiğimiz yüzyıllarda Influenza A virüslerinden H1N1, H3N2, H2N2 ve H1N2 alttipleri insanlarda görülürken; şu anda insanlarda sadece H1N1, H3N2 alttipleri Influenza B virüsleri ile birlikte görülmektedir. Diğer virüs alttiplerinden (H5N1, H7N7, H9N2) sporadik olarak insanları enfekte etmektedir fakat sınırlı bulaşma yeteneklerinden ötürü insanlar arasında geniş çaplı salgınlara neden olmamaktadır, Wittwer ve ark. (13).

4.1.2. Genom Organizasyonu

Influenza A ve B virüs genomu negatif anlamlı sekiz adet tek sarmallı RNA segmenti içerir, Arne ve ark. (14). Üç en büyük segment ve beşinci büyük segment viral replikasyon mekanizmasını kodlar. Bunlar; polimeraz proteinleri PB2, PB1, PA ve nükleoprotein proteini NP'dir. Dördüncü ve altıncı büyük segmentler yüzey glikoproteinleri HA ve NA'yı kodlar. Yedinci büyük segment matriks proteini M1 ve iyon kanal proteini M2'yi kodlar. En küçük segment interferon antagonisti NS1'i kodlar, Arne ve ark. (14).

4.1.3. Yüzey glikoproteini: Hemagglutinin (HA)

Hemagglutinin (HA) proteini, konak özgüllüğü ve patojenitenin temel belirleyicisidir. Swayne ve Halvorson (15), Ito ve Kawaka (16), Öncül protein (HA0), posttranslasyonel olarak HA1 ve HA2 alt birimlerine parçalanır. Yüksek patojeniteli influenza virüslerinin HA proteinleri, HA yarıma bölgelerinde birden fazla bazik aminoasit içerirler. İlgili motifler ubiquitin proteazlar tarafından tanınır ve bu virüsler sistemik enfeksiyona yol açar. Buna karşılık, avirulan influenza

virüslerinin HA proteinleri yarıma bölgesinde tek bazik aminoasit içerir. Bu bölge solunum ve / veya bağırsakta bulunan sınırlı sayıdaki proteazlar tarafından parçalanır ve bu virüsler de lokalize enfeksiyonlara neden olur.

4.2. Influenza Virüsünün Çoğaltılması

Birçok insan influenza virüsü, embriyonlu tavuk yumurtasından izole edilemediği için çoğaltılma işlemi hücre kültürleri kullanılarak yapılır. Virüs çoğaltımı için bir çok primer ve devamlı hücre hatları kullanılmaktadır. En sık kullanılan primer kültürler Cynomolgus ya da Rhesus maymun böbrek kültürleridir. En sık kullanılan devamlı hücre hatları ise Madin–Darby Canine Kidney (MDCK) hücreleridir. Tobita ve ark. (17), Devamlı hücre hattı kullanmanın en büyük avantajı kullanım esnekliğidir. Nitelikli ve tamamen onaylı hücre hattı dondurulmuş durumdan alınabilir, çoğaltılabilir ve herhangi bir zamanda kullanılabilir olmalıdır.

Influenza virüsünün çoğaltılmasındaki diğer bir önemli husus ise medyumun içine tripsin ilave edilmesidir. Tripsin, HA molekülünün aktivasyonu için yarılmasını sağlar, Klenk ve ark. (18). Hücre kültüründe çoğaltılan influenza virüslerinin HA proteini eksojen tripsin ilavesi olmadan HA1 ve HA2 olarak ayrılamaz böylece sonraki replikasyon siklusları için enfeksiyöz olmaz.

Virüs örnekleri ile inokule edilen hücre kültürleri, influenza virüsünün devamlılığı için 35°C'de nemli bir CO2 inkübatöründe inkübe edilmelidir. Kuşların vücut sıcaklığı ~42°C, domuzun ~39°C, insanın ~37°C olduğundan; 35°C sıcaklık tüm bu konaklardan gelen influenza virüsünün çoğaltımı için en uygun sıcaklıktır, Forrest ve Webster (19).

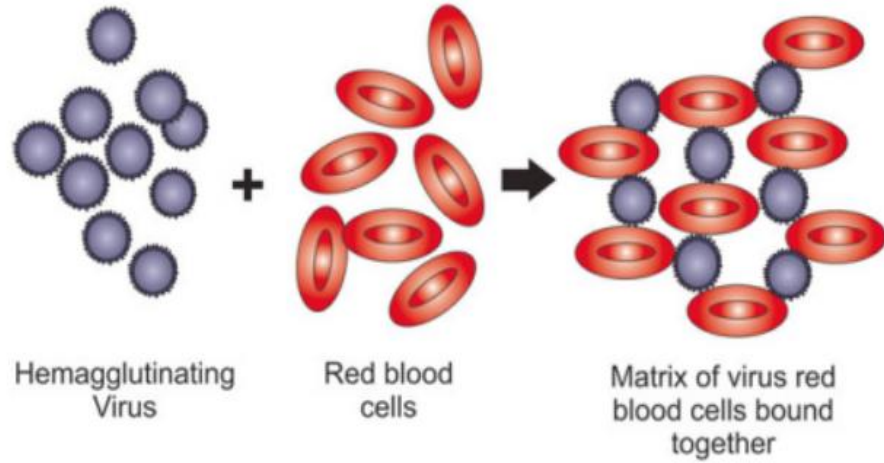
4.3. Influenza Virüsünün Titrasyon Ve Efektivitesinin Ölçümünde Kullanılan Testler

4.3.1. Hemagglütinasyon Testi

Influenza virüsünün biyolojik karakteristiğine dayanan birkaç titrasyon belirleme yöntemi vardır. Örneğin; virüsün, farklı türlerin kırmızı kan hücrelerini aglütine etme yeteneği gibi, Hirst, (20). Enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan virüs partiküllerinin kırmızı kan hücrelerini aglütine etme yeteneğine dayanan teste hemagglütinasyon

testi denir. Genellikle, hemagglütinasyon testlerinde tavuk, hindi gibi kuş kırmızı kan hücreleri (eritrositleri) kullanılır. Kuş eritrositleri küçük ve nukleusludur. Eritrositler virüs yokluğunda V-formlu mikrotiter plakaların dip kısmına düğme şeklinde çökmektedir. Böylece virüs dilüsyonunun bitiş noktasını belirlemeyi sağlar. Nukleussuz memeli eritrositleri (insan, kobay, at vb.) U-formlu mikrotiter plakanın kontrol kuyularının dip kısmına halka formu oluşturarak çöker ve bu forma “halo” denir. Dilüsyonun bitiş noktasını okumak ise zordur.

Influenza virüs partiküllerinin yüzey antijeni olan hemagglutinin proteini memeli ve kuş eritrositlerinin üzerindeki N-asetilnöraminik asit içeren proteinlere bağlanabilme özelliğine sahiptir. Grimes (21), Webster ve ark. (22), Yeterince yüksek konsantrasyonda olan influenza virüsü eritrositlerle birleştirildiği takdirde aglutinasyon reaksiyonu meydana gelir ve difüz bir kafes oluşturur (Şekil 1). Hemagglutinasyon testi, hücre kültür süpernatanın veya embriyonlu tavuk yumurtalarından elde edilen amniotik allantoik sıvısının kullanıldığı klasik tanı testidir.



Resim 4.3.1: Hemagglutinasyon Süreci. Virüs kırmızı kan hücrelerine bağlanır ve kırmızı kan hücrelerini birbirine bağlayarak matriks oluşturur. Bu durum seyreltik çözelti (genellikle PBS) içerisinde kırmızı kan hücrelerinin çökmesini önler, Grimes (21), Webster ve ark. (22).

HA bir tanımlama testi değildir. Diğer virüs türleri (örneğin, paramiksovirusler, adenovirus-127) ve bazı bakteriler hemagglutinasyon özelliğine sahiptirler, Flint ve ark. (23), Swayne ve Senne (24). Virüsün türü ya da alttürünün belirlenmesi isteniyorsa HA, bir hemagglutinasyon-inhibisyon deneyi ile takip edilmelidir. HA testi mutlaka canlı bir virüs varlığına işaret etmez, Grimes (21). Aynı zamanda, deşrede olmuş ya da inaktif ve artık infeksiyöz olmayan virüs partiküllerini de saptayabilmektedir. Genel olarak, HA testi ile influenza virüsünün varlığını tespit etmek için hücre kültüründe tek bir pasaj sonrası üst sıvısı yeterli olmaktadır, Flint ve ark. (23), Swayne ve Senne (24). Ekstra pasajlar laboratuarda çapraz-kontaminasyon riskini arttırmaktadır.

4.3.1.1.Kırmızı Kan Hücrelerinin Toplanması Ve Hazırlanması

HA testinde kullanılmak için belirli patojenleri içermeyen tavukların kırmızı kan hücreleri tercih edilmektedir. Horozlardan toplanan kırmızı kan hücreleri hemagglütinasyona müdahale edebilecek hormonlar içerebilir. Genellikle tavuk eritrositleri kullanılır çünkü diğer türlerle karşılaştırıldıklarında çökme süresi daha kısa ve çökme görüntüsü genellikle daha net olmaktadır, Webster ve ark. (22). Bazı kuş gribi virüsleri tavuk eritrositlerinde hemagglütinasyona neden olmayabilirken kobay ve hindi eritrositlerini hemaglutine edebilir.

Eritrositler taze olarak hazırlanmalıdır. Kırmızı kan hücreleri 5-7 günden sonra hemoliz olmaya başlar ve HA testinde yanlış sonuçlara neden olur, Barrett ve Inglis (25). Testte kullanılacak eritrosit süspansiyonunun her bir kuyucuğa muntazam dağılımı için kullanımdan önce hafifçe karıştırılması gerekir.

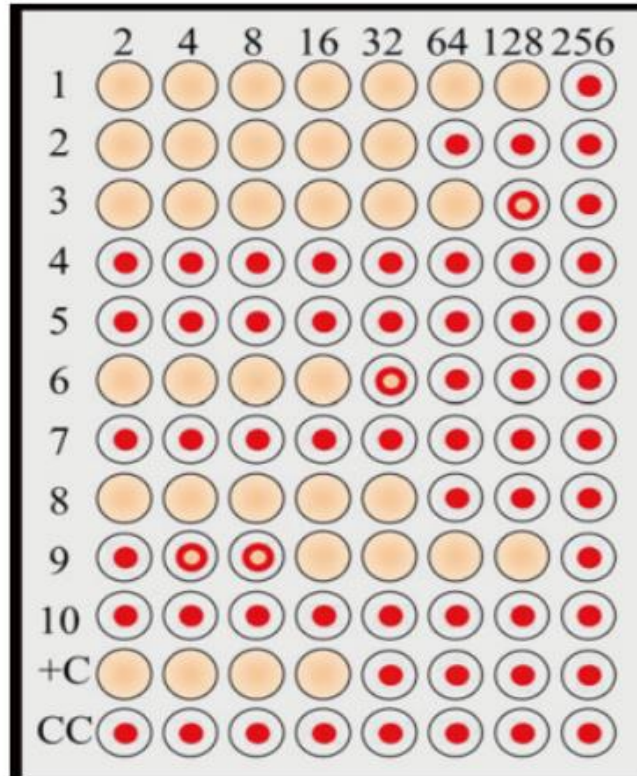
Antikoagulan solusyon içeren kapaklı steril bir şişe hazır bulunmalıdır. Hacimsel oran olarak antikoagulanın eritrosit süspansiyonuna oranı 1:3 olmalıdır. Eğer Alsever's solusyonu kullanılacaksa bu oran 1:1 olmalıdır. Horozun kalbinden ya da kanat veninden alınan 3-5ml kan yeterli olmaktadır.

4.3.1.2.Sonuçların Yorumlanması

HA test plağı,eritrositlerin hücre kontrol kuyularında kuyu diplerinde katı düğme formu oluşturduğu zaman okunmalıdır (Hemagglütinasyon negatif). Plak yaklaşık

45° hareket ettirildiğinde eritrositler gözyaşı damlası gibi akacaktır, Webster ve ark. (22), DSÖ (26). Tamamlanmamış hemagglütinasyon gözyaşı oluşturmeyen düğme şeklinde de gözlemlenebilir ve bulanık ya da tamamlanmamış halka görünümünde olabilir. (Tamamlanmamış hemagglütinasyon V-tabanlı plaklarda gözlemlenmeyebilir.) Tamamlanmamış hemagglütinasyon genellikle eritrositlerde kısmi çökme gösterir ve virüs partikülleri bir kısım eritrositin çökmesine izin vermiş demektir. Tamamlanmamış reaksiyonlar negatif olarak yorumlanmalıdır.

Virüs titrasyonunun bitiş noktası en seyreltik olan kuyudur ve burada tam hemagglütinasyon görülür (Başlangıç dilüsyonu 1:2). Dilüsyonun bitiş noktası 1HA ünitesi (HAU) olarak kabul edilir ve HAU/50ul sayısı en yüksek dilüsyonda resiprokaldır. Örneğin; Plakta 6. kuyuya kadar tam hemagglütinasyon görülmüş ise dilüsyonun bitiş noktası 1:64 olarak kabul edilir ve 64HAU/50ul olarak ifade edilir.



Resim 4.3.1.2: Mikrotiter Plakasında Pozitif ve Negatif Hemagglütinasyon Sonuçları. Örnek numaraları plakanın sol tarafına yazılmıştır, (+C pozitif kontrol ifade eder. Antijen kullanılmıştır. CC ise eritrosit kontrolüdür.) Seyreltme faktörü plakanın üst kısmında belirtilmiştir. Her numune için belirtilen sonuçlar şu

şekildedir: (1) pozitif hemagglütinasyon 128 HAU; (2) pozitif hemagglütinasyon 32 HAU; (3) pozitif hemagglütinasyon 64 HAU ve tamamlanmamış hemagglütinasyon 128 HAU; (4) negatif hemagglutinasyon; (5) negatif hemagglutinasyon; (6) pozitif hemagglutinasyon 16 HAU ve tamamlanmamış hemagglutinasyon 32 HAU; (7) negatif hemagglutinasyon; (8) pozitif hemagglutinasyon 32 HAU; (9) pozitif hemagglutinasyon 128 HAU ayrıca 2,4 ve 8 HAU kuyularında prozon etkisi görülmektedir; (10) negatif hemagglutinasyon, Webster ve ark. (22), DSÖ (26).

4.3.1.3. Notlar;

Enfeksiyöz ya da potansiyel olarak enfeksiyöz özellikte olabilecek materyaller ile yapılacak tüm çalışmalar Sınıf II Biyolojik Güvenlik Kabini içerisinde yapılmalıdır. Virüs içeren orijinal örnek tüpünden alikot alırken aerosol-resistanlı pipet uçları ve aseptik teknik her zaman kullanılması gerekmektedir. Pipet yüzeyinde taşınan malzeme laboratuvar kontaminasyonunun temel kaynağıdır.

Test plaklarının sonuçları çok bekletilmeden hemen okunmalıdır, Grimes (21). Influenza virüsünün üzerinde yer alan nöraminidaz proteini virüs hücre arasındaki bağları kırar. Bunun sonucunda virüs ve eritrosit tarafından oluşan kafes parçalanmaya başlar. Bazı virüs suşları çok yüksek nöraminidaz etkinliğine sahiptir ve uygun hemagglütinasyona izin vermezler. Bu virüsler ile karşılaşıldığı zaman nöraminidaz aktivitesini azaltmak için deney 4°C sıcaklıkta yapılmalıdır ve plaka okunmadan önce inkübasyon periyodu 45-60 dakika civarında olmalıdır.

Eğer eritrositler kontrol kuyularında çökmediyse olası nedenleri aşağıda belirtildiği gibidir;

- Eritrositler oda sıcaklığına gelmemiştir,
- Eritrosit süspansiyon kalitesi kötüdür ya da hemoliz olmuştur,
- PBS kalitesi kötüdür ya da uygun pH'da değildir,
- Kuyular viral antijenler ile kontamine olmuştur.

Pozitif kontrol negatif ise olası nedenleri şunlardır;

- Kontrol kuyusuna pozitif kontrol antijeni eklenmemiştir,

- Eritrositler 30 dakikadan fazla bekletilince çökmüştür.

Eğer örneğin olduğu ilk kuyularda hemagglütinasyon negatif (en yüksek virüs konsantrasyonunun olduğu kuyular) ve son kuyularda ise hemagglütinasyon pozitif ise (virüs konsantrasyonunun düşük olduğu kuyular) bu duruma prozon etkisi denir. Prozon etkisi bir yüksek doz etkisidir. Bu sebeple reaksiyonlar ilk kuyularda zayıf ya da negatif olabilir ve yüksek dilüsyonlarda kuvvetlidir. Virüs konsantrasyonunun yüksek olduğu kuyularda oransal olarak reseptörleri eritrositlerin üzerinde bulunan mevcut reseptörlerden fazla olduğundan çapraz bağlar oluşturamaz ve kafes görüntüsü oluşmaz. Bu da eritrositlerin kuyunun dibine çökerek tam ya da tamamlanmamış düğme görüntüsü oluşumuna neden olur. Dilüsyon serileri yeteri kadar seyreltilmediyse reaksiyon yanlış negatif olarak yorumlanmalıdır (Şekil 2). Dilüsyon oranının 2^8 olması, çok yüksek virüs konsantrasyonuna bağlı yanlış negatif hemagglutinasyonu önlemek için yeterli olmaktadır.

4.3.2. Plak Testi

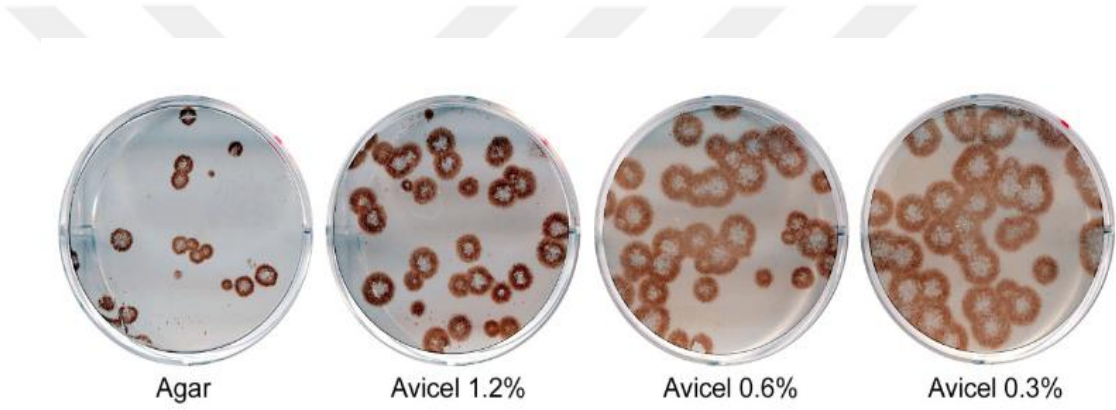
Plak testi, agar veya agaroz ile kaplanmış hücre tabakasında virüslerin oluşturduğu plaklara dayanan bir testtir, Tobita ve ark. (27), Tobita (28). Virüslerle enfekte olan hücrelerin ölümü sonucu sitopatik etki (CE) oluşur ve hücre tabakasının üzerinde lize olan hücreler dairesel zonlar oluşturur. Bu dairesel zonların her birine plak oluşumu denir. Sadece enfeksiyöz virüs partikülleri konak hücreleri enfekte eder ve plak oluşturur. Plak oluşum üniteleri (PFU), hücre tabakası (genellikle MDCK hücreleri kullanılır) üzerinde oluşan plak sayılarını kullanarak örnekteki enfeksiyöz virüs miktarının kantitatif ölçümüdür. Virüs stoğunun yüksek bir dilüsyonunda her plak, tek bir virüs partikülü tarafından enfekte olan hücrelerin oluşturduğu zon ile temsil edilir. Böylece virüs stoğunun titresini mililitre başına PFU olarak hesaplanabilir. Plak deneyi virüs süspansiyonundan on kat seri dilüsyonlar oluşturularak gerçekleştirilir ve daha sonra hücre tabakası enfekte edilir. Enfekte edilmiş hücre tabakalarını içeren her bir kuyu agaroz ile örtülür. Daha sonra agaroz kaldırılır, virüs etanol ile inaktive edilir ve plakları gözlemleyebilmek için hücre tabakalarının bulunduğu kuyulara kristal viyole ilave edilir.

Herpes virüsleri ve poxvirüsler gibi bazı virüslere standart sıvı kültür ortamı altında plak tahlili yapılabilir çünkü bu virüslerin direkt hücre-hücre dağılımı lokalize plakların oluşmasını sağlar. Fakat, influenza gibi birçok virüs sıvı ortamda lokalize plaklar oluşturamaz. Bunun nedeni, bu virüslerin enfekte ettikleri hücrelerden etkili bir şekilde ayrışması ve kültür kaplarındaki sıcaklık gradyanlarından kaynaklanan sıvı ortamın konveksiyonel akışı ile hücre tabakası üzerinde yayılmasıdır. Bu durumda, enfekte hücrelerin büyük pürüzlü odakları oluşur ve bu da sayılamaz. Kültür kaplarında sıvı hareketini önlemek ve viral yayılımı kontrol etmek için özel kaplama maddeleri kullanılır. En yaygın yöntem, kültür ortamını bir agar (veya agaroz) jel ile katılaştırmaktır. Bununla birlikte, katı jel kaplamalar, yüksek verimli analizler için gerekli olan 48 ve 96 gözlü kültür plakalarında kullanılamaz. Katı jellere alternatif olarak, çözünebilir hidrofilik polimerler, metilselüloz (MC), karboksimetilselüloz, kitre sakızı vb. gibi viskoz çözeltileri kullanılabilir, Maramorosh ve ark. (29).

Son zamanlarda, sıvı ortamda 96 gözlü formatta nöraminidaz inhibitörlerine karşı influenza virüsü duyarlılığına odak azaltma tahlili geliştirilmiştir, Matrosovich ve ark. (30). MC yüklemeleri altında bu tahlilin gerçekleştirilmesine yönelik çabalar, yüksek viskoziteli metilselüloz içeren ortam nedeniyle cesaret kırıcı olmuştur. Aşağıda tarif edileceği gibi, bu problem, mikrokristalin selüloz Avicel™ RC / CL (FMC Biyopolimer) süspansiyonlarına dayanan yeni kaplama ortamı kullanarak çözülmüştür. Avicel RC / CL, dağılmayı kolaylaştırmak için sodyum karboksimetilselülozla harmanlanmış, suda çözünmeyen selüloz mikropartiküllerinin koloidal bir formudur. Avicel'in mikropartikülleri, farmasötik süspansiyonlar ve emülsiyonların hazırlanmasında kullanılan tuzotropik jeller ve süspansiyonlar oluşturmak için suya kolayca dağıtılır, Knipe ve ark. (31), Fmc (32). Avicel'in bu özellikleri ve Avicel içeren süspansiyonların nispeten daha düşük viskozitede olması influenza virüsünün plak analizinde uygun bir örtme ortamı olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

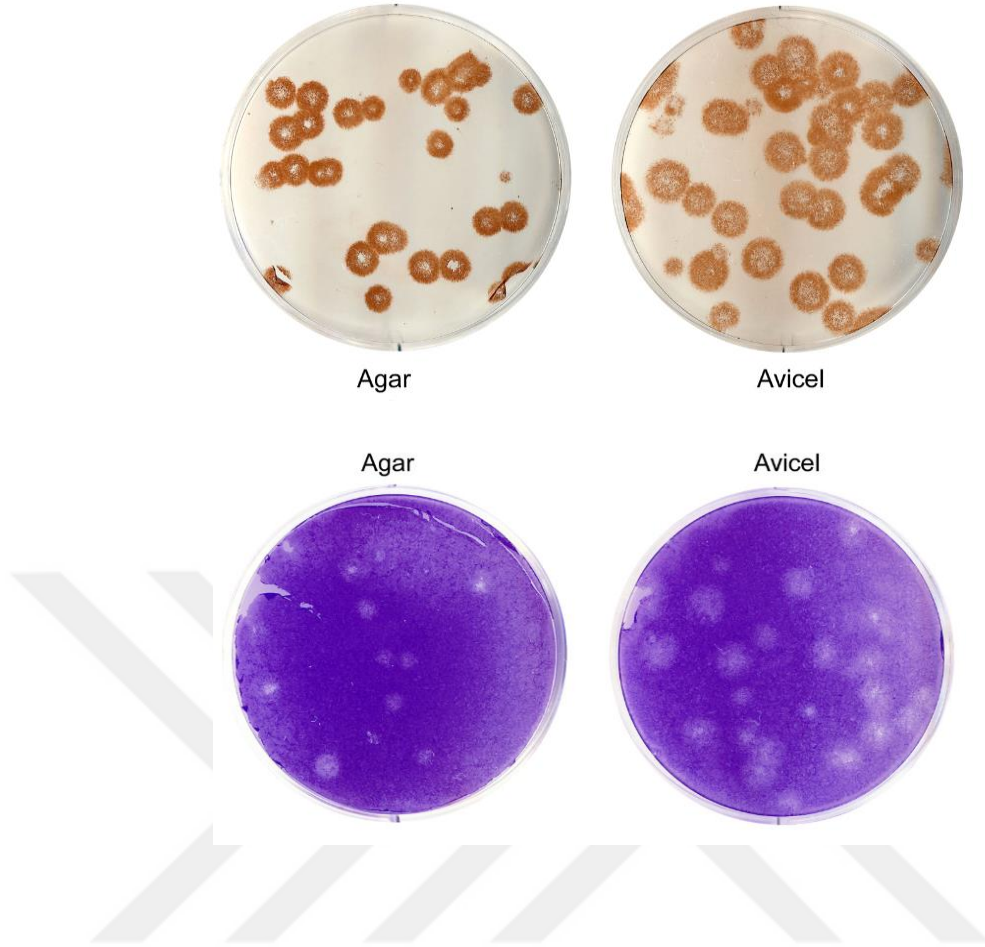
4.3.2.1. Avicel ve Agar Kaplamalarının Karşılaştırılması

İlk olarak, Avicel tabanlı kaplama medyası ile standart agar kaplaması, 6 oyuklu plakalarda plak tahlilinde karşılaştırılmıştır. (Resim 4.3.2.1.1), farklı günlerde gerçekleştirilen birkaç tekrar deneyinde elde edilen sonuçları göstermektedir. Tüm bu deneylerde, standart agar kaplamayla karşılaştırıldığında, Avicel içeren kaplamalar altında daha büyük plaklar oluşmuştur. Plak boyutu Avicel konsantrasyonundaki azalma ile artmış, ancak seyreltilmiş Avicel kaplamalarıyla bile iyi lokalize plakların oluşması sağlanmıştır. Avicel'in altında, agar altında olduğundan çok daha fazla plak oluşmuş; muhtemelen, ısıtılmış agar kaplaması ile virüsün kısmen inaktive edilmesinden kaynaklanıyordu.



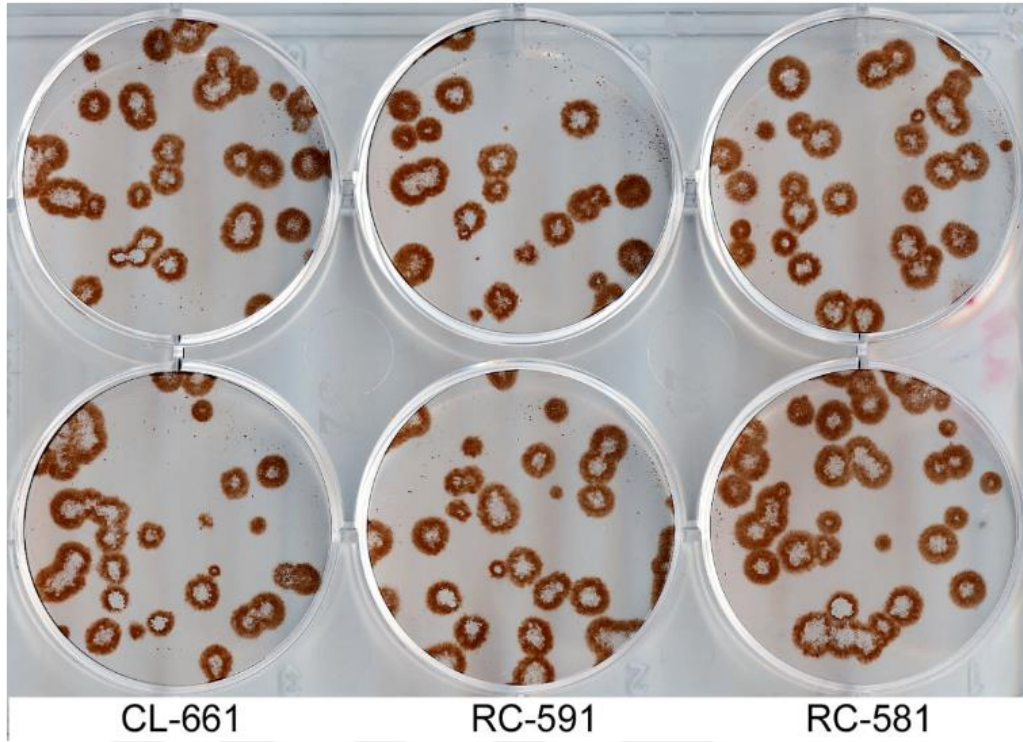
Resim 4.3.2.1.1: Altı oyuklu plaklarda Agar kaplama ve % 1.2, % 0.6 ve % 0.3 Avicel RC-581 içeren kaplamalar altında paralel plak tahlilleri. MDCK hücreleri influenza virüsü A / Memphis / 14/96-M (H1N1) ile enfekte edilmiş ve aminoetilkarbazol substrat (AEC) kullanılarak immünboyama yapılmıştır, Knipe ve ark. (31), Fmc (32).

Resim 4.3.2.1.2. Agar ve Avicel kaplamaları altında, enfekte ve tahrip olmuş hücreleri ortaya çıkarmak için yaygın olarak kullanılan iki yöntem sırasıyla immün boyama ve kristal mor ile boyama yöntemleri paralel olarak gösterilmektedir. Avicel kaplaması boyama yönteminden bağımsız olarak agar kaplamadan daha iyi sonuç vermiştir.



Resim 4.3.2.1.2: 6 oyuklu plakalarda Agar altında (solda) ve% 1.2 Avicel RC-581'de (sağda) paralel plak tahlilleri. MDCK hücrelerinde A / Memphis / 14/96-M (H1N1) ile enfeksiyon. Tekrarlanan kültürler ya AEC ile immün boyalı (üstte) ya da kristal mor renkli boya ile boyanmış (altta) kültürlerdir, Knipe ve ark. (31), Fmc (32).

FMC BioPolymer üç farklı hidrofilik mikrokristal selüloz türü, Avicel CL-661, Avicel RC-591 ve Avicel RC-581 üretir, Knipe ve ark. (31), Fmc (32). Aynı deneyde bu üç türün %1,2 , %0,6, %0,3 konsantrasyonları kullanılarak karşılaştırılmıştır. Plak boyutunun Avicel tipinden bağımsız olduğu ve plakların sayısının da Avicel tipine ve de konsantrasyona bağlı olmadığı gözlenmiştir.

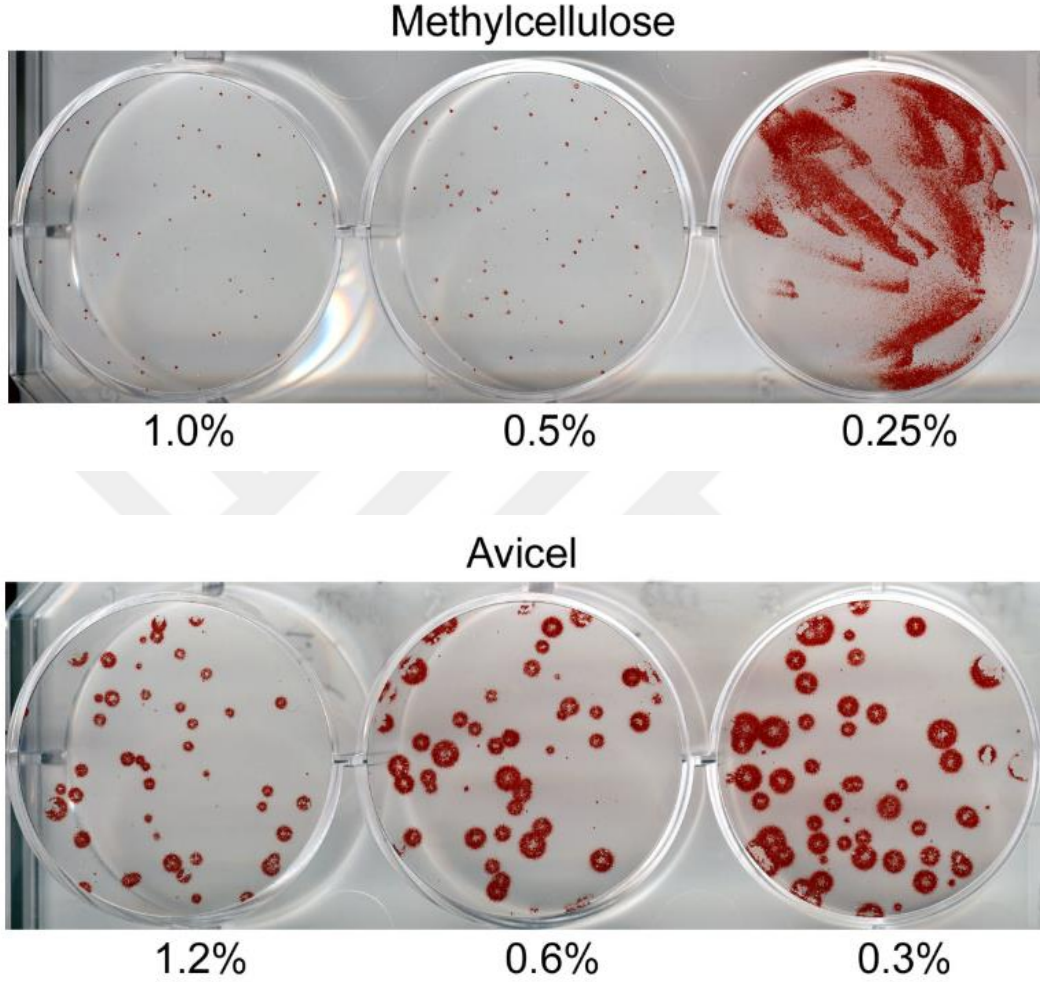


Resim 4.3.2.1.3. Aynı konsantrasyonda (% 1.2) üç farklı Avicel (CL-661, RC-591 ve RC-581) kullanılarak hazırlanan kaplamaların altındaki paralel plak tahlilleri. MDCK hücrelerinde A / Memphis / 14/96-M (H1N1) ile enfeksiyon. 6 kuyucuklu plakada her biri üst üste olan iki kopya kuyusu gösterilmiştir. İmmun-boyama (AEC), Knipe ve ark. (31), Fmc (32).

4.3.2.2. Avicel Ve Metilselüloz Kaplamalarının Karşılaştırılması

Genetik olarak modifiye edilmiş MDCK-SIAT1 hücrelerinin kısmen neden olduğu influenza virüsü yayılımındaki azalma sebebiyle % 1 metilselüloz kaplamanın altında oldukça küçük plaklar oluşturmaktadır, (Resim 4.3.2.2.1), Matrosovich ve ark. (30). MC konsantrasyonunu % 0.5'e düşürmek, plak boyutunda sadece bir miktar artışa neden olurken, % 0.25 MC kullanımı, büyük bir kuyruklu yıldız biçimli odak oluşumuyla sonuçlanmıştır. Odakların bu garip biçimi, virüs soyunun hücre tek katmanının üzerinde kaplama ortamının konveksiyonel hareketi ile taşındığını göstermiştir, % 0,25'lik MC ile bu şekilde bir hareketin engellenemediği sonucuna varılmıştır, Gambaryan ve ark. (33). Aksine, en seyreltilmiş Avicel bazlı örtücülüğün (% 0.3) bile, viral plakların nispeten sınırsız radyal büyümesine izin verirken, kültür ortamındaki konveksiyonel akışları etkin bir şekilde önlediği görülmüştür. Sonuç

olarak, Avicel'in altında oluşturulan plaklar MC altında oluşturulan plaklardan büyük ölçüde daha büyük olduğu gözlemlenmiştir. Her iki kaplama ile yapılan plak tahlili birbiri ile karşılaştırıldığında plak sayısında fark görülmemiş.



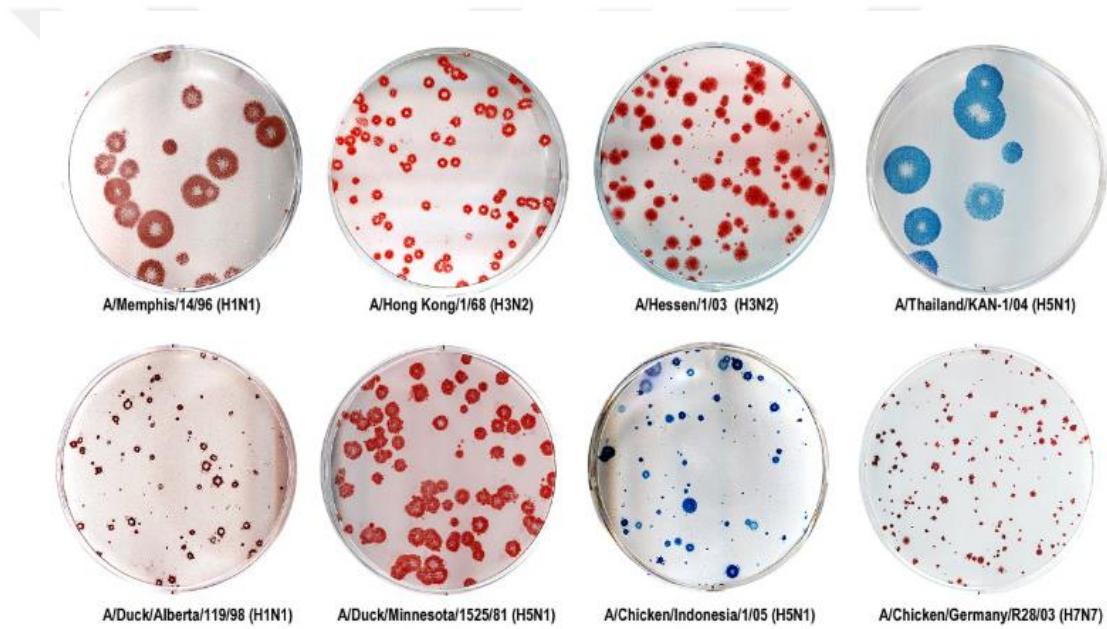
Resim 4.3.2.2:Metilselüloz (üst panel) ve Avicel RC-581 (alt panel) altında paralel plak tahlilleri. Sayılar, MC ve Avicel kaplamadaki konsantrasyonları göstermektedir. A / Memphis / 14/96-M (H1N1); 6 oyuklu plakalarda MDCK-SIAT1 hücreleri; Immüno-boyama (AEC), Matrosovich ve ark. (30).

Avicel süspansiyonları plak deneylerinde kullanılan metilselüloz çözeltilerinden daha az viskozdur, Marmorosh ve ark. (29). Örneğin, su içindeki % 1.2 Avicel süspansiyonları 100-200 mPa.s aralığında viskoziteye sahip iken, Knipe ve ark. (31), su içindeki % 2 MC çözeltilisinin viskozitesi 3000-5000 mPa.s'dır, MC (34).Yapılan

çalışmalarda, test edilen en yoğun Avicel kaplama ortamı bile (% 1.2) en az konsantr MC ortamından daha az viskoz olduğu gözlemlenmiş.

4.3.2.3.Farklı İnfluenza Virüs Türlerine Göre Plak Oluşumu

Avicel kaplaması altında plak oluşturabilme kabiliyeti için dört HA'ya ve üç NA antijenik alt türüne ait sekiz insan ve kuş gribi virüsünü test edilmiş, (Resim4.3.2.3.1). Oldukça patojenik H5N1 ve H7N7 kuş virüsleri dahil tüm virüsler kolayca sayılabilir plaklar üretmiştir. Böylece, Avicel kaplamaları, antijenik alt tiplerine ve konakçı türlerine bakılmaksızın çeşitli influenza virüsü suşlarının plak testi için uygun görülmüş.



şekil 4.3.2.3: MDCK hücrelerinde influenza virüsleri tarafından oluşturulan plaklar % 1.2 Avicel RC-581 kaplaması altındadır. En üst sıra, soldan sağa: insanlardan izole edilen virüsler A / Memphis / 14/96-M (H1N1), A / Hong Kong / 1/68 (H3N2), A / Hessen / 1/03 (H3N2) ve A / Tayland / KAN-1/04 (H5N1). Alt satırda, soldan sağa: kuş virüsleri), A / Duck / Alberta / 119/98, A / Duck / Minnesota / 1525/81 (H5N1), A / Tavuk / Endonezya / 1/05 (H5N1) ve A / Tavuk / Almanya / R28 / 03 (H7N7) .True Blue (mavi) veya AEC (kırmızı) ile immün boyama, Knipe ve ark. (31), Fmc (32).

4.3.3. Real-Time RT-PCR

Gerçek zamanlı ters transkripsiyon-PCR (rRT-PCR), ilk olarak 2001 yılında canlı kuş piyasasındaki kanatlı hayvanları test ederken klinik örneklerde AI virüsünü saptamada kullanıldı, Spackman ve ark. (35), Spackman (36). Daha sonra 2002'de tavuklarda ve hindilerde kullanım için geçerliliği onaylanan ticari kanatlı hayvanlarda düşük patojenik (LP) kuş gribi virüsü (AIV) salgınını kontrol etme amaçlı kullanıldı, Akey (37). O zamandan sonra, ABD'de sayısız veteriner teşhis laboratuvarının testi uyguladığı standart bir protokol geliştirildi. Ardından, sayısız türde AI virüsü enfeksiyonunun saptanması için sayısız salgın sırasında rRT-PCR, dünya çapında bir tanı testi olarak kullanıldı ve gerektiğinde modifikasyonlar yapıldı, Spackman ve ark. (35), Spackman (36), Akey (37), Cattoli ve ark. (38), Slomka ve ark. (39). RRT-PCR, muhtemelen yabani kanatlı hayvanları izleme ve gözlem için en yaygın kullanılan tarama testidir. Bununla birlikte, niceliksel özelliğinden dolayı, rRT-PCR, virüs izolasyonuna alternatif olarak araştırma için ideal görülmüştür, Lee ve Suarez (40).

RRT-PCR'nin birincil ve en güvenilir uygulaması, herhangi bir A tipi influenza virüsünün saptanmasıdır (örneğin, alt tip tanımlamasına karşı). Pan-tip A influenza tespiti için moleküler testlerin çoğunluğu nispeten korunmuş matriks (M) veya nükleoprotein genlerini hedef alır. Influenzadaki en büyük genetik çeşitlilik kuş türlerinde bulunur ve tüm olası izolatları saptayacak tek bir rRT-PCR testinin tasarlanmasını zorlaştırır. Bu durumda, hangi AIV rRT-PCR testini kullanacağı konusunda özgür olan laboratuvarların kritik rolü (belirli bir testi kullanmak için birçok veteriner teşhis laboratuvarı gerekir) kanatlı örneklerin AIV gözetiminde, doğru rRT-PCR testini seçmektir; literatürden birini seçme, ticari bir test kullanma veya kurum içi bir test geliştirme olabilir. Çok çeşitli hayvan türlerinde A tipi influenza'nın tespiti için sayısız test yayımlanmış; fakat, birkaçı için yeterli düzeyde geçerlilik verisi mevcuttur. Bir test seçerken, hedef türlerin ilgili suşları ve soyları ile ilgili geçerlilik verileri olan bir test bulmak çok önemlidir. Sonuçta, her laboratuvar hangi testin ihtiyaçlarına en uygun olduğunu belirlemek zorundadır.

Polimeraz zincir reaksiyonu ile DNA seviyesinde saptama için viral RNA amplifikasyonunun genel prensibi geleneksel PCR da olduğu gibi gerçek zamanlı

PCR'da da aynıdır. İki yöntem arasındaki fark PCR ürününün (amplifikon) nasıl tespit edildiğidir. Gerçek zamanlı PCR ile PCR ürünü, termal döngü vasıtasıyla (yani, her PCR döngüsü sırasında ürünün varlığı saptanır) reaksiyon ilerledikçe bir flüorojenik prob veya nükleik asit bağlama boyası ile görselleştirilir. Gerçek zamanlı PCR için çok sayıda kimyasal bulunmaktadır.

A tipi influenza testi için, çift etiketli proplar veya Taqman propları olarak da adlandırılan hidroliz propları kullanılır. Hidroliz / çift etiketli prob sisteminde, hedefe spesifik PCR primerlerine ek olarak, amplifikasyon hedefini tamamlayan bir diziye sahip bir DNA probu bir ucunda (genellikle 5' ucunda) bir flüorojenik haberci boya ve diğer ucunda (genellikle 3' ucunda) söndürücü boya ile etiketlenir. Haberci boya ışığın belli dalga boyunda uyarılır (gerçek zamanlı PCR vasıtasıyla). Uyarılan bu boya farklı bir dalga boyunda floresan yaymasına sebep olur ve bu daha sonra gerçek zamanlı PCR tarafından saptanır. Söndürücü boya haberci boyanın yakınıdaysa haberci boya tarafından üretilen herhangi bir ışığı absorbe eder. Böylece gerçek zamanlı PCR aleti tarafından algılanmasını engeller (arka plan flüoresan seviyesinde kaydedilir). Prob, PCR reaksiyonunun uzatılması aşamasında PCR amplifikonuna bağlandığında, haberci boyası, probun 5' ucundan taq polimeraz ile parçalanır (5' ekzonükleaz aktivitesinden ötürü) haberci boyasının söndürücü boyadan ayrılmasına izin verir, Holland ve ark. (41), Wright ve ark. (42). Haberci (reporter) boya yeterince kesildiğinde, amplifikasyonun log fazındaki amplifikon konsantrasyonu ile doğrudan ilişkili olan bir flüoresan sinyali üretilir. Floresan sinyali her devirde izlendiğinden, PCR ürünündeki herhangi bir artış kaydedilir ve amplifikasyon meydana geldiğinde gerçek zamanlı olarak görüntülenebilir. Doğası gereği, gerçek zamanlı PCR, doğal olarak nicelikseldir.

Önemli olan, bu yöntemle, bir diziye özgü prob kullanıldığından, dizinin spesifik probunu bağlayamadıkça ürün görselleşmediğinden test özgüllüğü yüksektir; bu nedenle primerler tepkimeye spesifik olmayan bir şekilde reaksiyon gösteriyor olsa bile, sinyal üretme reaksiyonu gerçekleştirmez (tüm reaksiyon ürünlerinin elektroforez ile tespit edildiği geleneksel PCR yöntemlerinin aksine). Devamında, primerler veya proplar arasındaki uyumsuzluklar, hassaslığın azalmasına hatta test

başarısızlığına yol açabilir. Neyse ki, RT-PCR, konumlarına bağlı olarak birkaç uyuşmazlığı tolere edecek kadar başarılıdır, Kim ve ark. (43).



5. METOT VE MATERYAL

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Biyolojik Örnekler Ve Ekipmanlar

Influenza A H1N1/pdm/09/California suşu (ATCC)

MDCK (madin darby canine kidney) hücre hattı (ATCC)

T-75 Doku Kültürü Flaskı (Corning) (kat# CLS430641, Sigma)

1X DMEM(dulbecco modified eagle medium) (Laboratuvarda hazırlandı)

DMEM GIBCO (+4500mg/L Glucose, -Pyruvate, - NaHCO₃) (kat# 52100-047)

HEPES SIGMA (≥ 99,5 % titration) (kat# H3375)

NaHCO₃ SIGMA (Cell Cultered Tested) (kat# S5761)

NaOH (kat# 71463, Sigma)

FBS (Fetal Bovine Serum) (kat# F4135, Sigma)

BSAV 7,5% ((Bovine Albumin Fraction)(kat# 15260037, Thermo Fisher)

Penicilin/Streptomisin(kat# 4333-100, Sigma)

1X PBS (phosphate buffered saline) (Laboratuvarda hazırlandı)

Trypsin-EDTA (kat# T4049-500, Sigma)

TPCK-Trypsin (kat# T1426-250, Sigma)

NaCl (kat# 433209, Sigma)

K₂HPO₄ (kat#105101, Merck Millipore)

KH₂PO₄ (kat# 104873, Merck Millipore)

Falcon tüpler (50mL, 15mL)

0,22 um filtre (kat# SCGPU05RE, Merck Millipore)

Pipetgun (axygen) ve 5mL, 10mL, 25mL 'lik dispenser pipet uçları (ISOLAB)

Steril cam şişeler (250mL, 500mL, 1000mL)

CO₂'li inkübatör (New Brunswick)

ESCO Class 2 Biyogüvenlik Kabini

Inverted Mikroskop

Su banyosu

Hassas Terazi

pH metre

5.2. Solusyonların Hazırlanması

1X DMEM Hazırlanışı: 1 Litre otoklavlanmış distile su için;

DMEM = 13,4 gr

HEPES = 5,96 gr

NaHCO₃= 2gr

pH = 7,2 (NaOH) ayarlanır.

0,22 um filtre kullanılarak hazırlanan DMEM steril cam şişeye süzülür.

1X PBS Hazırlanışı: 1 Litre distile su için;

NaCl= 8,75 gr

Fosfat Tamponu (500 mM) = 20ml

Hazırlandıktan sonra cam şişelere alınır ve otoklavlanır.

Fosfat Tamponu (500 mM) Hazırlanışı:

K₂HPO₄, 400 ml distile su içinde 34,8 gr çözülür

KH₂PO₄, 200 ml distile su içinde 13,6 gr çözülür

KH₂PO₄, K₂HPO₄'ün üzerine pH= 7,2 olana kadar eklenir.

Virüs Ekim Besiyeri Hazırlanışı: TPCK-Trypsin 20mg/10ml olacak şekilde Complete DMEM'de çözülür. 0,22um filtreden geçirilir, alikotlanır ve -20 de muhafaza edilir.

Complete DMEM (482,5 ml DMEM için) Hazırlanışı:

-5ml Penisilin/Streptomisin (Final Konsantrasyon 100U/ml penisilin – 100mg/ml streptomisin)

-12,5 ml BSA V (7,5%) (Final Konsantrasyon 0,2%)

Virüs ekim besiyeri hazırlamak için 500 ml Complete DMEM için 0,5 ml TPCK-Trypsin (Final Konsantrasyonu 2ug/ml) kullanılır.

Hücre Ekim Besiyeri Hazırlanışı:

450 ml 1X DMEM için 50 ml FBS (Final Konsantrasyon 10%) kullanılır.

5.3. Influenza Virüs Stoğunun MDCK Hücrelerinde Üretimi

5.3.1 Virüs Enfeksiyonu için MDCK Hücrelerinin Hazırlanması

-T-75 doku kültürü flaskına 20ml önceden ısıtılmış (37°C) hücre ekim besiyeri eklenir.

-Dondurulmuş MDCK hücreleri (1×10^7 hücre/vial) hızlı bir şekilde 37°C su banyosunda çözüldükten sonra içinde hücre ekim besiyeri bulunan T-75 doku kültürü flaskına ilave edilir.

-T-75 flaskı 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatörde 2-3 saat inkübasyona bırakılır.

-T-75 flaskı inkübatörden alınır ve inverted mikroskop altında hücrelerin flaskına tutunup tutunmadığı kontrol edilir. Hücrelerin %50'sinin T-75 flaskına tutunduğundan emin olunur. Eğer hücreler T-75 flaskına tutunmadıysa yeni bir vial ile 1-4 basamakları tekrarlanır.

-%50 hücrelerin tutunduğundan emin olduktan sonra hücre ekim besiyeri aspire edilir ve taze hücre ekim besiyerinden 20ml T-75 flaskına ilave edilir.

-Flask inkübatöre kaldırılır. Hücre yoğunluğu %80 olana kadar 3-4 gün inkübe edilir.

5.3.2. MDCK Hücrelerin Altkültürü

-Hücrelerin çoğalmaya bırakıldığı T-75 doku kültürü flaskı inkübatörden alınır ve inverted mikroskop altında hücrelerin morfolojileri ve yoğunluğu kontrol edilir. Hücrelerin flaskın tabanında homojen dağılımlı olarak sıkıca tutunmuş olması gerekir ve hücre ekiminin ardından 3-4 gün içinde %80 hücre yoğunluğuna ulaşmış olması gerekir.

-Hücre kültür süpernatanı pipet yardımıyla aspire edilir.

-Flaskın içerisine 10ml PBS eklenir ve 4-5 kere hafifçe altüst ettikten sonra aspire edilir. Besiyerin içerisinde yer alan FBS'den kurtulmak için yıkama yapılır. FBS Tripsin-EDTA inhibitörü olduğu için FBS uzaklaştırılır.

-T-75 flaskı için 5ml, T-225 flaskı için 10ml Tripsin-EDTA ilave edilir. Flask yaklaşık 15 dakika 37°C inkübatöre kaldırılır.

-İnkübatörden alınan flaska bir elin avuç içiyle hafifçe vurulur ve inverted mikroskop altında hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edilir.

-Hücreler yüzeyden ayrılmışlar ve hareketli fakat hücre kümeleri de mevcut ise bunun için yaklaşık 10 defa pipetaj yapılır (hücre süspansiyonu pipete çekilir ve flask duvarından tekrar flaska verilir) ve mikroskop altında tekrar kontrol edilir. Hücrelerin tane tane ayrıldığını görene kadar bu işlem tekrarlanır.

-Hemositometre kullanarak hücreler sayılır ve hücre süspansiyonundaki hücre sayısı hesaplanır.

-Yeni doku kültürü flaskı alınır. T-75 için 20ml, T-225 için 60ml taze hücre ekim besiyeri eklenir.

-Hücreler, final konsantrasyonu 5×10^4 /ml olacak şekilde 20ml taze ekim besiyeri bulunan flaska ilave edilir.

-Flask, 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatöre kaldırılır. Hücre yoğunluğu %80 olana kadar 3-4 gün inkübe edilir.

5.3.3. MDCK Hücrelerine Virüs Ekimi

-T-75 flaskı 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatörden alınır. Inverted mikroskop altında hücrelerin yeterli yoğunluğa ulaşıp ulaşmadığı kontrol edilir. Virüs ile enfekte etmek için MDCK hücrelerinin en az 80% yoğunluğa sahip olması gerekmektedir.

-Hücre kültür süpernatanı pipet yardımıyla aspire edilir.

-Tek tabaka MDCK hücrelerinin bulunduğu T-75 flaskı 3 kez PBS ile yıkanır. FBS den kurtulmak için bu işlem uygulanır.

--80 de bulunan virüs alikotlarından 1 vial alınır. İçerisinde virüs bulunan vial buzda muhafaza edilir, aksi takdirde oda sıcaklığında virüs RNA'sı degrades olabilir.

-Virüs süspansiyonundan 500ul alınarak tek tabaka hücrelerin üzerine pipetlenir.

-T-75 flaskı kapağı kapatıldıktan sonra dairesel hareketler ile hafifçe sallanır. Amaç virüs süspansiyonunun her noktaya ulaşmasıdır.

-T-75 flaskı 35°C ve 5% CO₂ olan inkübatöre kaldırılır. En az bir saat inokulasyon için beklenir.

-Bir saatin ardından TPCK-Tripsinli Virüs ekim besiyerinden 12ml eklenir.

-T-75 flaskı 35°C ve 5% CO₂ olan inkübatöre kaldırılır. Üç gün inkübe edilir.

-Üç günün sonunda hücrelerin morfolojilerini gözlemek için inverted mikroskop altında bakılır.

5.3.4. Virüs Stoklama İşlemi

-Virüs süspansiyonu ile enfekte edilen MDCK hücreleri üç gün sonunda inverted mikroskop altında gözlenir. Sitopatik etki görülmüş ise virüs sıvısı toplanır. Eğer hücre morfolojileri halen sağlıklı ise inkübasyon süresi bir iki gün daha uzatılabilir.

-T-75 flaskı 35°C ve 5% CO₂ olan inkübatörden alınır. MDCK hücrelerinin öldüğünü ve ölen hücrelerin yüzeyden ayrılıp virüs besiyeri içerisinde yüzdükleri gözlemlenince bu üst sıvı toplanır.

-1ml'lik viallere T-75 flaskından alınan virüs besiyeri alikotlanır. Çok bekletilmeden -80'e taşınır. Burada muhafaza edilir.

5.4. Virüs Titrasyonunu Ve Enfektivitesinin Belirlenmesi

5.4.1. Plak Testi

5.4.1.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler, Biyolojik Örnekler Ve Ekipmanlar

6-well plate (Corning) (kat# CLS3516, Sigma)

MDCK (madin darby canine kidney) hücre hattı (ATCC)

Virüs süspansiyonu (7.pasaja ait) (H1N1/pdm/09/California suşu)

T-75 Doku Kültürü Flaskı (Corning) (kat# CLS430641, Sigma)

Avicel (kat# RC-591, NF – FMC)

Sodium CMC (carboxymethyl cellulose) (kat# SC591, Marmara Blander Tabulose)

2X DMEM (Plak Besiyeri) (Laboratuvarda hazırlandı)

DMEM GIBCO (+4500mg/L Glucose, -Pyruvate, - NaHCO₃) (kat# 52100-047)

HEPES SIGMA (≥ 99,5 % titration) (kat# H3375)

Falcon tüpler (50mL, 15mL)

NaHCO₃ SIGMA (Cell Cultered Tested) (kat# S5761)

NaOH (kat# 71463, Sigma)

Virüs Dilüsyon Solusyonu (Laboratuvarda hazırlandı)

10% Formaldehit (kat# F8775, Sigma)

1% Kristal Viyole (kat#HT90132, Sigma)

Trypan Blue (kat# T8154, Sigma)

1X PBS (phosphate buffered saline) (Laboratuvarda hazırlandı)

Penicilin/Streptomisin (kat# 4333-100, Sigma)

Trypsin-EDTA (kat# T4049-500, Sigma)

TPCK-Trypsin (kat# T1426-250, Sigma)

Agarose, Ultrapure (kat# 15510-019, Gibco)

Distile su

Alüminyum folyo

Steril cam şişeler (1000mL, 500mL, 200mL)

Ependorf tüpler (1,5mL, 500µl)

Pipetgun (axygen) ve 5mL, 10mL, 25mL 'lik dispenser pipet uçları (ISOLAB)

Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı (ISOLAB) ve manyetik balıkları

Ayarlanabilir pipetörler (1000µl, 100µl, 10µl) ve filtreli pipet uçları

CO₂'li inkübatör (New Brunswick)

ESCO Class 2 Biyogüvenlik Kabini

Hemositometre

Inverted mikroskop

Su Banyosu

Hassas Terazı

pH metre

Mikrodalga fırın

5.4.1.2. Solusyonların Hazırlanması

2X DMEM(Plak Besiyeri)Hazırlanışı : 1 Litre otoklavlanmış distile su için;

DMEM = 26,8 gr

HEPES = 11,92 gr

NaHCO₃ = 4 gr

pH = 7,2 (NaOH)ayarlanır.

0,22 um filtre kullanılarak hazırlanan 2X DMEM steril cam şişeye süzülür.

Virüs Dilüsyon Solusyonu Hazırlanışı : 495 ml 1X DMEM için 5ml Penisilin/Streptomisin (Final Konsantrasyon 100U/ml penisilin – 100mg/ml streptomisin) kullanılır.

10% Formaldehit Hazırlanışı : %36 Formaldehit stoğundan 5,56ml + 14,44 ml distile su ile 10%' luk formaldehit hazırlanır.

1% Kristal Viyole Hazırlanışı : 500µl kristal viyole stoğundan + 49,5ml distile su ile 1%'lik kristal viyole hazırlanır.

5.4.1.3. Plak Testinde Kaplama Olarak AgaroZ Kullanımı

6-well plakların her birine hücre sayısı 800.000 olacak şekilde hücre ekildi. Bunun için aşağıdaki yol izlendi;

-T-75 flaskında pasajları devam eden MDCK hücreleri 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatörden alınır.

-Inverted mikroskop altında hücre yoğunluğu ve morfolojisi kontrol edilir.

-T-75 flaskındaki hücre ekim besiyeri pipet yardımıyla aspire edilir.

-Ardından PBS ile üç kez yıkanır.

-Trypsin-EDTA solusyonundan 6ml alınarak flaskın içine pipetlenir. Flask dairesel hareketler ile hafifçe sallanır. Amaç Trypsin-EDTA'nın her noktaya ulaşmasını sağlamaktır.

-T-75 flaskı 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatöre kaldırılır. 10 dakika kadar inkübe edilir.

-Flask inkübatörden alınır ve inverted mikroskop altında incelenir. Tripsin-EDTA etkisi ile hücreler tutundukları yüzeyden ayrılır.

-İçerisinde 6ml Tripsin-EDTA bulunan flaska 4ml hücre ekim besiyeri eklenir. Yaklaşık 10 kez total 10ml'lik süspansiyon pipete çekilir ve flaskın duvarına pipet ucunu dayayarak geri bırakılır. Amaç hücrelerin tane tane ayrılmasıdır.

-Hücre süspansiyonunun tümü 50ml'lik falcona pipetlenir.

-1,5ml 'lik bir ependorfa 990ul hücre ekim besiyeri eklenir. 1:100 kat dilüsyon oluşturmak için 50ml'lik falconda bulunan hücre süspansiyonundan 10ul alınarak ependorfa eklenir. Pipet yardımıyla süspansiyon karıştırılarak homojenize edilir.

-Hemositometre kullanılarak hücre sayımı yapılır. Yeni bir 500ul'lik ependorfa 10ul 100 kat dilüsyonu yapılan süspansiyondan alınır ve eklenir. 10ul de tripan mavisi eklenir. Pipet yardımıyla süspansiyon karıştırılarak homojenize edilir. Buradan alınan 10ul süspansiyon hemositometre üzerine damlatılır ve lamel ile kapatılır.

-Inverted mikroskop altında hücre sayımı yapılır.

-En ortada karede 90 adet hücre sayıldı.

-Hesaplama şu şekilde olmaktadır.

Bir ml'deki hücre sayısı = (Hücre sayısı x 10^4 x dilüsyon miktarı) / başlangıç mililitresi

Hücre sayısı= (90 x 10^4 x 100 x 2) /10

= 18,000,000 hücre/ml bulunmaktadır.

6-well plaklara aşağıdaki yol izlenerek kuyu başına 800.000 olacak şekilde hücre ekildi;

-6-well plakların her bir kuyusuna 3ml hücre ekim besiyeri eklendi.

-Elimizdeki falconda mililitresinde 18 milyon hücre olan süspansiyonumuz mevcut. Kuyu başına 800.000 hücre olacak şekilde hesapladığımızda yaklaşık 22,5ul hücre süspansiyonu kuyu başına eklendi.

-Plaklar hücrelerin homojen olarak dağılması için hafifçe elde sallandıktan sonra inverted mikroskop altında kontrol edildi.

-Plaklar 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatöre kaldırıldı ve overnight bırakıldı.

-Ertesi gün plaklar 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatörden alındı ve inverted mikroskop altında kontrol edildi.

-Burada önemli olan hücrelerin tam tabaka her yeri kaplamış olması gerekmektedir.

- Distile su içersinde 0.6% agarose çözeltisi hazırlanır. 121°C'de 20 dakika otoklavlanır.

-Kullanılacağı zaman 65°C su banyosunda eritilir.

-Plak medyumunu 37°C su banyosunda ısıtılır.

56°C'ye getirilmiş 0.6% agarose stoğundan, seyreltici olarak 2X DMEM kullanılarak 1:1 oranında çözelti hazırlanır. Böylece son konsantrasyon 0.3% olur.

Plakların içerisinde bulunan hücre ekim besiyerleri aspire edilir.

-Plakların her birine 3ml PBS pipetlenir. Elde hafifçe çalkalanır ve PBS aspire edilir. Bu işlem üç kez tekrarlanır.

- -80'de stoklanan virüs süspansiyonlarından 7.pasajın viali alındı. Virüs buz içerisinde tutulur.

-Bu 7.pasaja ait virüs süspansiyonundan seri dilüsyonlar oluşturuldu ve bu dilüsyonlar kullanıldı.

5.4.1.3.1. Plak Testi İçin Virüs Dilüsyonlarının Hazırlanması

7 adet 1,5ml'lik ependorf hazırlanır.

Üzerlerine 1/10, 1/10², 1/10^{2,5}, 1/10³, 1/10^{3,5}, 1/10⁴, 1/10^{4,5} yazılır.

1 nolu tüp 1/10 için; 10ul 7.pasaj virüs süspansiyonu + 90 ul virüs dilüsyon solusyonu hazırlanır.

2 nolu tüp $1/10^2$ için; 100ul $1/10$ süspansiyonu + 900ul virüs dilüsyon solusyonu hazırlanır.

3,4,5,6 ve 7 nolu ependorflara 200ul virüs dilüsyon solusyonu eklenir. Ardından 2 nolu tüpten 92ul alınır ve 3 nolu tüpe eklenir. Pipetleme yapılır ve homojen karışım oluşur ve bu 3 nolu tüpten de 92ul alınır 4 nolu tüpe aktarılır pipetleme yapılır. Bu işlem 7 nolu tüpe kadar aynı şekilde devam eder. Bu şekilde ikişer tane olmak üzere virüs dilüsyonları hazırlanır.

-Her bir dilüsyondan 200ul olacak şekilde süspansiyonlar tek tabaka MDCK üzerine pipetlenir.

-Plaklar 37°C ve 5% CO_2 olan inkübatöre kaldırıldı. Bir saat inkübasyona bırakıldı.

-Bir saat sonunda plaklar 37°C ve 5% CO_2 olan inkübatörden alındı.

-Plakların her bir kuyusundan inokulum aspire edilir.

-Son konsantrasyonları $1,2\%$ Avicel, 2% CMC olacak şekilde her biri 1:1 oranda 2X DMEM ile homojen olacak şekilde karıştırılır.

-Her bir kuyuya hazırlanan konsantrasyonlardan 3ml eklenir. Her biri için bir kontrol kuyusu (virüssüz sadece Avicel ya da CMC) ve bir adet hücre kontrol kuyusu (virüssüz ve overlay yok sadece hücre ekim besiyeri var) bırakılır.

-Plaklar 37°C ve 5% CO_2 olan inkübatöre kaldırıldı. Beş gün inkübe edildi.

-Beş günün sonunda plaklar 37°C ve 5% CO_2 olan inkübatörden alındı.

-Her kuyunun üst sıvısı pipet yardımıyla aspire edildi. Kuyular PBS ile yeterince temizlenene kadar yıkanır.

-Her bir kuyuya 1ml 10% formaldehit olacak şekilde pipetleme yapılır. Plaklar alüminyum folyo ile sarılır. 1saat oda sıcaklığında bekletilir.

-Bir saat sonra formaldehit aspire edilir ve her bir kuyuya 1% 'lik kristal viyole pipetlenir. Oda sıcaklığında 20 dakika bekletilir.

-20 dakikanın sonunda kuyulardan kristal viyole boyasının uzaklaştırılması için distile su ile yıkaması yapılır.

-Oluşan plaklar gözlemlendi ve sayıldı.

5.4.1.4.MDCK Hücrelerinde Kaplama Olarak Farklı Konsantrasyonlardaki CMC ve Avicel Kullanımı

200 ml cam şişelerden birine konsantrasyonu 4,8% olan Avicel ve diğerine konsantrasyonu 4% olan CMC hazırlandı.

200 ml distile su için 8,4 gr Avicel tartıldı. 200 ml distile su için 8 gr CMC tartıldı. İçlerine manyetik balık atıldı. Isısı arttırılan manyetik karıştırıcıda homojenize olması için bir gün boyunca karışmaya bırakıldı. Ertesi gün otoklavlandı.

6-well plakların her birine hücre sayısı 800.000 olacak şekilde hücre ekildi. Bunun için aşağıdaki yol izlendi;

-T-75 flaskında pasajları devam eden MDCK hücreleri 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatörden alınır.

-Inverted mikroskop altında hücre yoğunluğu ve morfolojisi kontrol edilir.

-T-75 flaskındaki hücre ekim besiyeri pipet yardımıyla aspire edilir.

-Ardından PBS ile üç kez yıkanır.

-Trypsin-EDTA solusyonundan 6ml alınarak flaskın içine pipetlenir. Flask dairesel hareketler ile hafifçe sallanır. Amaç Trypsin-EDTA'nın her noktaya ulaşmasını sağlamaktır.

-T-75 flaskı 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatöre kaldırılır. 10 dakika kadar inkübe edilir.

-Flask inkübatörden alınır ve inverted mikroskop altında incelenir. Trypsin-EDTA etkisi ile hücreler tutundukları yüzeyden ayrılır.

-İçerisinde 6ml Tripsin-EDTA bulunan flaska 4ml hücre ekim besiyeri eklenir. Yaklaşık 10 kez total 10ml'lik süspansiyon pipete çekilir ve flaskın duvarına pipet ucunu dayayarak geri bırakılır. Amaç hücrelerin tane tane ayrılmasıdır.

-Hücre süspansiyonunun tümü 50ml'lik falcona pipetlenir.

-1,5ml 'lik bir ependorfa 990ul hücre ekim besiyeri eklenir. 1:100 kat dilüsyon oluşturmak için 50ml'lik falconda bulunan hücre süspansiyonundan 10ul alınarak ependorfa eklenir. Pipet yardımıyla süspansiyon karıştırılarak homojenize edilir.

-Hemositometre kullanılarak hücre sayımı yapılır. Yeni bir 500ul'lik ependorfa 10ul 100 kat dilüsyonu yapılan süspansiyondan alınır ve eklenir. 10ul de tripan mavisi eklenir. Pipet yardımıyla süspansiyon karıştırılarak homojenize edilir. Buradan alınan 10ul süspansiyon hemositometre üzerine damlatılır ve lamel ile kapatılır.

-Inverted mikroskop altında hücre sayımı yapılır.

-En ortada karede 120 adet hücre sayıldı.

-Hesaplama şu şekilde olmaktadır.

Bir ml'deki hücre sayısı = (Hücre sayısı x 10^4 x dilüsyon miktarı) / başlangıç mililitresi

Hücre sayısı= (120 x 10^4 x 100 x 2) /10

= 24,000,000 hücre/ml bulunmaktadır.

6-well plaklara aşağıdaki yol izlenerek kuyu başına 800.000 olacak şekilde hücre ekildi.

-6-well plakların her bir kuyusuna 3ml hücre ekim besiyeri eklendi.

-Elimizdeki falconda mililitresinde 24 milyon hücre olan süspansiyonumuz mevcut. Kuyu başına 800.000 hücre olacak şekilde hesapladığımızda yaklaşık 33,3 ul hücre süspansiyonu kuyu başına eklendi.

-Plaklar hücrelerin homojen olarak dağılması için hafifçe elde sallandıktan sonra inverted mikroskop altında kontrol edildi.

-Plaklar 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatöre kaldırıldı ve overnight bırakıldı.

-Ertesi gün plaklar 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatörden alındı ve inverted mikroskop altında kontrol edildi.

-Burada önemli olan hücrelerin tam tabaka her yeri kaplamış olması gerekmektedir.

Hazırlanan Avicel ve CMC konsantrasyonlarının hücre morfolojisine etkisinin gözlemlenmesi;

56°C'ye getirilmiş 4,8% Avicel stoğundan, seyreltici olarak 2X DMEM kullanılarak aşağıdaki konsantrasyonlar hazırlandı;

Avicel;

0% , 0,015%, 0,3%, 0,45%, 0,6%, 0,8%, 1,2%, 1,8%, 2,1%, 2,4%, 3%, 3,6%, 4,2%, 4,8%

56°C'ye getirilmiş 4% CMC stoğundan, seyreltici olarak 2X DMEM kullanılarak aşağıdaki konsantrasyonlar hazırlandı;

CMC;

0%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, 1,25%, 1,5%, 1,75%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%

6-well plakların her bir kuyusuna hazırlanan her konsantrasyondan 3ml eklendi.

Ardından plaklar 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatöre kaldırıldı ve üç gün inkübasyona bırakıldı.

Bulgularda görüldüğü üzere buradan 1,2% Avicel, 2,4% Avicel, 1% CMC, 2% CMC konsantrasyonlarının hücre morfolojisine etkilerinin minimum olduğu gözlemlendi ve deneye bu konsantrasyonlar üzerinden devam edildi.

5.4.1.4.1. Yedi Pasajlama Sonucu Elde Edilen Virüsün Plak Testinde İnfektivitesinin Hesaplanması

-İçerisinde MDCK hücrelerinin çoğaltıldığı T-75 flaskı 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatörden alınır.

-Inverted mikroskop altında hücre yoğunluğu ve morfolojisi kontrol edilir.

-T-75 flaskındaki hücre ekim besiyeri pipet yardımıyla aspire edilir.

-Ardından PBS ile üç kez yıkanır.

-Tripsin-EDTA solusyonundan 6ml alınarak flaskın içine pipetlenir. Flask dairesel hareketler ile hafifçe sallanır. Amaç Tripsin-EDTA'nın her noktaya ulaşmasını sağlamaktır.

-T-75 flaskı 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatöre kaldırılır. 10 dakika kadar inkübe edilir.

-Flask inkübatörden alınır ve inverted mikroskop altında incelenir. Tripsin-EDTA etkisi ile hücreler tutundukları yüzeyden ayrılır.

-İçerisinde 6ml Tripsin-EDTA bulunan flaska 4ml hücre ekim besiyeri eklenir. Yaklaşık 10 kez total 10ml'lik süspansiyon pipete çekilir ve flaskın duvarına pipet ucunu dayayarak geri bırakılır. Amaç hücrelerin tane tane ayrılmasıdır.

-Hücre süspansiyonunun tümü 50ml'lik falcona pipetlenir.

-1,5ml 'lik bir ependorfa 990ul hücre ekim besiyeri eklenir. 1:100 kat dilüsyon oluşturmak için 50ml'lik falconda bulunan hücre süspansiyonundan 10ul alınarak ependorfa eklenir. Pipet yardımıyla süspansiyon karıştırılarak homojenize edilir.

-Hemositometre kullanılarak hücre sayımı yapılır. Yeni bir 500ul'lik ependorfa 10ul 100 kat dilüsyonu yapılan süspansiyondan alınır ve eklenir. 10ul de tripan mavisi eklenir. Pipet yardımıyla süspansiyon karıştırılarak homojenize edilir. Buradan alınan 10ul süspansiyon hemositometre üzerine damlatılır ve lamel ile kapatılır.

-Inverted mikroskop altında hücre sayımı yapılır.

-En ortada karede 160 adet hücre sayıldı.

-Hesaplama şu şekilde olmaktadır.

Bir ml'deki hücre sayısı = (Hücre sayısı x 10^4 x dilüsyon miktarı) / başlangıç mililitresi

$$\begin{aligned} \text{Hücre sayısı} &= (160 \times 10^4 \times 100 \times 2) / 10 \\ &= 32,000,000 \text{ hücre/ml bulunmaktadır.} \end{aligned}$$

6-well plaklara aşağıdaki yol izlenerek kuyu başına 800.000 olacak şekilde hücre ekildi.

-6-well plakların her bir kuyusuna 3ml hücre ekim besiyeri eklendi.

-Elimizdeki falconda mililitresinde 32 milyon hücre olan süspansiyonumuz mevcut. Kuyu başına 800.000 hücre olacak şekilde hesapladığımızda yaklaşık 25 ul hücre süspansiyonu kuyu başına eklendi.

-Plaklar hücrelerin homojen olarak dağılması için hafifçe elde sallandıktan sonra inverted mikroskop altında kontrol edildi.

-Plaklar 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatöre kaldırıldı ve overnight bırakıldı.

-Ertesi gün plaklar 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatörden alındı ve inverted mikroskop altında kontrol edildi.

-Burada önemli olan hücrelerin tam tabaka her yeri kaplamış olması gerekmektedir.

-Plakların içerisinde bulunan hücre ekim besiyerleri aspire edilir.

-Plakların her birine 3ml PBS pipetlenir. Elde hafifçe çalkalanır ve PBS aspire edilir. Bu işlem üç kez tekrarlanır.

- -80'de stoklanan virüs süspansiyonlarından 7.pasajın viali alındı. Virüs buz içerisinde tutulur.

-Bu 7.pasaja ait virüs süspansiyonundan seri dilüsyonlar oluşturuldu ve bu dilüsyonlar kullanıldı. Amaç virüsün konsantrasyonunun yüksek olabileceğini düşünerek seyreltmek ve seyreltilmiş süspansiyonları kullanmaktır.

5.4.1.4.1.1. Plak Testi İçin Virüs Dilüsyonlarının Hazırlanması

5 adet 1,5ml'lik ependorf hazırlanır.

Üzerlerine 1/10, 1/10², 1/10³, 1/10⁴, 1/10⁵ yazılır.

Her birine 540ul virüs dilüsyon solusyonu eklenir.

7.pasaja ait virüs stoğundan 60ul süspansiyon çekilir ve birinci tüpe pipetlenir.

Birinci tüp pipetlenip karıştırıldıktan sonra buradan 60ul çekilir ve ikinci tüpe pipetlenir.Bu işlem beşinci tüpe gelinceye kadar devam eder. 4'er adet bu şekilde virüs dilüsyonları hazırlandı.

-Her bir dilüsyondan 500ul olacak şekilde süspansiyonlar tek tabaka MDCK üzerine pipetlenir.

-5 adet kuyu kontrol amaçlı bırakıldı ve virüs yerine 500ul 1X DMEM eklendi.

-Plaklar 37°C ve 5% CO2 olan inkübatöre kaldırıldı. Bir saat inkübasyona bırakıldı.

-Bir saat sonunda plaklar 37°C ve 5% CO2 olan inkübatörden alındı.

-Plakların her bir kuyusundan inokulum aspire edilir.

-Son konsantrasyonları 1,2% Avicel, 2,4% Avicel, 1% CMC, 2% CMC olacak şekilde her biri 1:1 oranda 2X DMEM ile homojen olacak şekilde karıştırılır.

-Her bir kuyuya hazırlanan konsantrasyonlardan 3ml eklenir. Her biri için bir kontrol kuyusu (virüssüz sadece Avicel ya da CMC) ve bir adet hücre kontrol kuyusu (virüssüz ve overlay yok sadece hücre ekim besiyeri var) bırakılır.

-Plaklar 37°C ve 5% CO2 olan inkübatöre kaldırıldı. Beş gün inkübe edildi.

-Beş günün sonunda plaklar 37°C ve 5% CO2 olan inkübatörden alındı.

-Her kuyunun üst sıvısı pipet yardımıyla aspire edildi. Kuyular PBS ile yeterince temizlenene kadar yıkanır.

-Her bir kuyuya 1ml 10% formaldehit olacak şekilde pipetleme yapılır. Plaklar alüminyum folyo ile sarılır. 1saat oda sıcaklığında bekletilir.

-Bir saat sonra formaldehit aspire edilir ve her bir kuyuya 1%'lik kristal viyole pipetlenir. Oda sıcaklığında 20 dakika bekletilir.

-20 dakikanın sonunda kuyulardan kristal viyole boyasının uzaklaştırılması için distile su ile yıkaması yapılır.

-Oluşan plaklar gözlemlendi ve sayıldı.

5.4.1.4.2. Farklı Virüs DilüsyonlarınınKaplama Olarak 2% CMC Ve 1,2% Avicel Kullanarak İnfektivitesinin Hesaplanması

-İçerisinde MDCK hücrelerinin çoğaltıldığı T-75 flaskı 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatörden alınır.

-Inverted mikroskop altında hücre yoğunluğu ve morfolojisi kontrol edilir.

-T-75 flaskındaki hücre ekim besiyeri pipet yardımıyla aspire edilir.

-Ardından PBS ile üç kez yıkanır.

-Tripsin-EDTA solusyonundan 6ml alınarak flaskın içine pipetlenir. Flask dairesel hareketler ile hafifçe sallanır. Amaç Tripsin-EDTA'nın her noktaya ulaşmasını sağlamaktır.

-T-75 flaskı 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatöre kaldırılır. 10 dakika kadar inkübe edilir.

-Flask inkübatörden alınır ve inverted mikroskop altında incelenir. Tripsin-EDTA etkisi ile hücreler tutundukları yüzeyden ayrılır.

-İçerisinde 6ml Tripsin-EDTA bulunan flaskta 4ml hücre ekim besiyeri eklenir. Yaklaşık 10 kez total 10ml'lik süspansiyon pipete çekilir ve flaskın duvarına pipet ucunu dayayarak geri bırakılır. Amaç hücrelerin tane tane ayrılmasıdır.

-Hücre süspansiyonunun tümü 50ml'lik falcona pipetlenir.

-1,5ml 'lik bir ependorfa 990ul hücre ekim besiyeri eklenir. 1:100 kat dilüsyon oluşturmak için 50ml'lik falconda bulunan hücre süspansiyonundan 10ul alınarak ependorfa eklenir. Pipet yardımıyla süspansiyon karıştırılarak homojenize edilir.

-Hemositometre kullanılarak hücre sayımı yapılır. Yeni bir 500ul'lik ependorfa 10ul 100 kat dilüsyonu yapılan süspansiyondan alınır ve eklenir. 10ul de tripan mavisi eklenir. Pipet yardımıyla süspansiyon karıştırılarak homojenize edilir. Buradan alınan 10ul süspansiyon hemositometre üzerine damlatılır ve lamel ile kapatılır.

-Inverted mikroskop altında hücre sayımı yapılır.

-En ortada karede 90 adet hücre sayıldı.

-Hesaplama şu şekilde olmaktadır.

Bir ml'deki hücre sayısı = (Hücre sayısı x 10^4 x dilüsyon miktarı) / başlangıç mililitresi

Hücre sayısı= $(80 \times 10^4 \times 100 \times 2) / 10$

= 16,000,000 hücre/ml bulunmaktadır.

6-well plaklara aşağıdaki yol izlenerek kuyu başına 800.000 olacak şekilde hücre ekildi.

-6-well plakların her bir kuyusuna 3ml hücre ekim besiyeri eklendi.

-Elimizdeki falconda mililitresinde 32 milyon hücre olan süspansiyonumuz mevcut. Kuyu başına 800.000 hücre olacak şekilde hesapladığımızda yaklaşık 50 ul hücre süspansiyonu kuyu başına eklendi.

-Plaklar hücrelerin homojen olarak dağılması için hafifçe elde sallandıktan sonra inverted mikroskop altında kontrol edildi.

-Plaklar 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatöre kaldırıldı ve overnight bırakıldı.

-Ertesi gün plaklar 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatörden alındı ve inverted mikroskop altında kontrol edildi.

-Burada önemli olan hücrelerin tam tabaka her yeri kaplamış olması gerekmektedir.

-Plakların içerisinde bulunan hücre ekim besiyerleri aspire edilir.

-Plakların her birine 3ml PBS pipetlenir. Elde hafifçe çalkalanır ve PBS aspire edilir. Bu işlem üç kez tekrarlanır.

-80'de stoklanan virüs süspansiyonlarından 7.pasajın viali alındı. Virüs buz içerisinde tutulur.

-Bu 7.pasaja ait virüs süspansiyonundan seri dilüsyonlar oluşturuldu ve bu dilüsyonlar kullanıldı.

5.4.1.4.2.1. Plak Testi İçin Virüs Dilüsyonlarının Hazırlanması

7 adet 1,5ml'lik ependorf hazırlanır.

Üzerlerine $1/10$, $1/10^2$, $1/10^{2.5}$, $1/10^3$, $1/10^{3.5}$, $1/10^4$, $1/10^{4.5}$ yazılır.

1 nolu tüp $1/10$ için; 10ul 7.pasaj virüs süspansiyonu + 90 ul virüs dilüsyon solusyonu hazırlanır.

2 nolu tüp $1/10^2$ için; 100ul $1/10$ süspansiyonu + 900ul virüs dilüsyon solusyonu hazırlanır.

3,4,5,6 ve 7 nolu ependorflara 200ul virüs dilüsyon solusyonu eklenir. Ardından 2 nolu tüpten 92ul alınır ve 3 nolu tüpe eklenir. Pipetleme yapılır ve homojen karışım oluşur ve bu 3 nolu tüpten de 92ul alınır 4 nolu tüpe aktarılır pipetleme yapılır. Bu işlem 7 nolu tüpe kadar aynı şekilde devam eder. Bu şekilde ikişer tane olmak üzere virüs dilüsyonları hazırlanır.

-Her bir dilüsyondan 200ul olacak şekilde süspansiyonlar tek tabaka MDCK üzerine pipetlenir.

-3 adet kuyu kontrol amaçlı bırakıldı ve virüs yerine 200ul 1X DMEM eklendi.

-Plaklar 37°C ve $5\% \text{CO}_2$ olan inkübatöre kaldırıldı. Bir saat inkübasyona bırakıldı.

-Bir saat sonunda plaklar 37°C ve $5\% \text{CO}_2$ olan inkübatörden alındı.

-Plakların her bir kuyusundan inokulum aspire edilir.

-Son konsantrasyonları 1,2% Avicel, 2% CMC olacak şekilde her biri 1:1 oranda 2X DMEM ile homojen olacak şekilde karıştırılır.

-Her bir kuyuya hazırlanan konsantrasyonlardan 3ml eklenir. Her biri için bir kontrol kuyusu (virüssüz sadece Avicel ya da CMC) ve bir adet hücre kontrol kuyusu (virüssüz ve overlay yok sadece hücre ekim besiyeri var) bırakılır.

-Plaklar 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatöre kaldırıldı. Beş gün inkübe edildi.

-Beş günün sonunda plaklar 37°C ve 5% CO₂ olan inkübatörden alındı.

-Her kuyunun üst sıvısı pipet yardımıyla aspire edildi. Kuyular PBS ile yeterince temizlenene kadar yıkanır.

-Her bir kuyuya 1ml 10% formaldehit olacak şekilde pipetleme yapılır. Plaklar alüminyum folyo ile sarılır. 1saat oda sıcaklığında bekletilir.

-Bir saat sonra formaldehit aspire edilir ve her bir kuyuya 1%'lik kristal viyole pipetlenir. Oda sıcaklığında 20 dakika bekletilir.

-20 dakikanın sonunda kuyulardan kristal viyole boyasının uzaklaştırılması için distile su ile yıkaması yapılır.

-Oluşan plaklar gözlemlendi ve sayıldı.

5.4.2. Real-Time RT-PCR Yöntemi İle Virüs Titrasyonunun Belirlenmesi

5.4.2.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler, Biyolojik Örnekler Ve Ekipmanlar

RNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel)

Beta-mercaptoethanol (Kat# M6250, Sigma)

Virüs süspansiyonu (7.pasaj) (H1N1/pdm/09/California suşu)

70% EtOH

One-step quantitative RT-PCR probe hydrolysis (e.g., Tagman) kit

BIORAD I Tag Universal Probes One-Step Kit (cat# 172-5140)

Influenza A Forward ve Reverse Primerler (40µM), (Sentegen)

InfA Forward (5'GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C3')

InfA Reverse (5'AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA3')

Influenza A dual-labeled Probes (10µM), (Sentegen)

(TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG)

Steril distile su (RNase ve DNase free)

Pozitif kontrol (standart)

Mikrosantrifüj (Eppendorf)

Nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific)

Vortex (ISOLAB)

ESCO Class 2 Biyogüvenlik Kabini

Real-Time PCR (96-well formatında thermocycler reaksiyon bloğu ile) (BIORAD)

Laboratuvar kalemi

1,5 mikrosantrifüj tüpleri ve 96-well 0.2 PCR reaksiyon tüplerini koymak için buz dolu köpük

20µl ve 200µl ayarlanabilir pipetörler ve filtreli pipet uçları

0.2 PCR reaksiyon plakı ve kapakları

Steril, nuclease-free 1.5 ml mikrosantrifüj tüpleri

Kullan-at pudrasız eldivenler

5.4.2.2. Pasaj-7'ye ait Virüs Süspansiyonundan Total RNA İzolasyonu

--80'den alınan 7.pasaja ait virüs süspansiyonu buza alınır. Vial içerisindeki 1ml virüs süspansiyonu eridiğinde 2000 g'de 5 dakika santrifüj edilir. Eğer pellet oluşmuyorsa 13.000 g'de 30 saniye santrifüj edilir.

-Vial üzerindeki süpernatant aspire edilir ve pellet ile çalışılır.

-Her örnek için 350µl RA1 + 3,5µl Beta-mercaptoethanol karışımı eklenir. Kaç örnek çalışılacak ise ona göre mix hazırlanabilir.

-Menekşe renkli filtreli tüplere RNA ve lizat karışımı aktarılır. 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilir.

-Alt fazı tutulur ve filtreli kısmı atılır. Böylece tuz artıklarını ve istenmeyen hücre komponentleri uzaklaştırılır.

-Alttaki tüpte kalan hücre lizatı (RNA) üzerine 350µl 70% EtOH eklenir ve pipetleme yapılır.

-Hücre lizatı (RNA) bu sefer mavi filtreli tüplere alınır ve 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilir. Alt kısmı atılır yeni toplayıcı tüpler alınır ve filtreli kısım ile devam edilir.

-Her örnek için 350µl MDB (Membrane Desalting Buffer) eklenir, 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilir.

-DNA'yı parçalamak için her örnek için (90µl DNase Buffer + 10µl DNase) karışım hazırlanır. DNase -20'de muhafaza edilir. Örnek başına karışımdan 95µl dağıtılır ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.

-RA2'den 200µl eklenir ve 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilir.

-RA3'den 600µl eklenir ve 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilir.

-RA3'den 200µl eklenir ve 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilir.

-Mavi filtreli kısımları RNase-free 1,5ml'lik ependorflara alınır ve üzerine kullanımına göre 40-60µl RNase-free H2O eklenir, 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilir.

Elde edilen viral RNA'nın Nanodrop ölçümü yapıldı.

RNA = 72,3 ng/µl

A260/280 oranı = 2,17

A260/230 oranı = 2,04

5.4.2.3. Realtime RT-PCR Uygulaması

-Buz dolu köpük içersine kullanılacak tüpler (iTag universal probes reaction mix (2X), iScript reverse transcriptase, forward and reverse primers, fluorogenic probe, virüs RNA'sı, nuclease-free H2O) alınır.

-96-well plakası UV ışık altında 15 dakika steril edilir ardından buz içerisine alınır.

-Reaksiyon mixi hazırlamak için steril nuclease-free 1.5ml mikrosantrifüj tüpü buz içerisine alınır. İki adet pozitif kontrol, İki adet negatif kontrol ve iki adet örnek için reaksiyon aşağıdaki gibi hazırlanır.

iTag universal probes reaction mix = 10µl x 7 = 70µl

iScript reverse transcriptase = 0,5µl x 7 = 3,5µl

Influenza A forward primer = 1µl x 7 = 7µl

Influenza A reverse primer = 1µl x 7 = 7µl

Influenza A Probe = 3,5µl x 7 = 3,5µl

hazırlanır ve her tüpe 13µl dağıtılır.

-Reaksiyonlar 20µl olarak hazırlanır.

-Negatif kontrollere nuclease-free H2O'dan her bir tüpe 7µl eklenerek 20µl'ye tamamlanır.

-Pozitif kontrolün nanodrop sonucu 34ng/μl olduğundan 4,9μl H₂O, 2,1μl standart eklenir.

-Örneği çalıştığımız tüpe virüs RNA'sı nanodrop sonucu 72ng/μl olduğundan 6μl H₂O, 1μl örnekten eklenir.

-Her örnek pipetaj yapılarak homojen karışımı sağlanır.

-96-well plakanın kapakları kapatılır ve Realtime PCR cihazına alınır.

-Bilgisayardan reaksiyon ile ilgili bilgiler aşağıdaki gibi girilir.

Real-Time PCR Sistemi; Bio-Rad iq5, MiniOpticon, Chromo4, Myiq için setting/scan mode standart seçilir.

Reverse transkripsiyon reaksiyonu = 50°C'de 10 dakika

Polimeraz aktivasyonu ve DNA denatürasyonu = 95°C'de 1-3 dakika

Amplifikasyon için;

Denatürasyon = 95°C'de 2-15 saniye

Enileme/Uzama + Plaka okuma = 60°C'de 15-30 saniye

Siklus Sayısı = 35-40

-Reaksiyon bittikten sonra program sonlandırılır ve sonuç kaydedilir.

5.4.3. Hemagglutinasyon Testini Kullanarak Virüs Titrasyonunun Belirlenmesi

5.4.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Biyolojik Örnekler Ve Ekipmanlar

BD Vacutainer K2E (EDTA) 10.0mL (cat# 367525)

0 Rh+ insan kanı

50mL'lik ve 15mL'lik falcon tüpler

PBS (1X) (Laboratuvarda hazırlandı)

10µl, 100µl, 1000µl'lik ayarlanabilir pipetör ve pipet uçları (Eppendorf)

Santrifüj cihazı (Beckman coulter)

ESCO Class 2 Biyogüvenlik Kabini

96-well u-formlu plaka (not tc-treated) (Corning)

Virüs süspansiyonu (7.pasaj) (H1N1/pdm/09/California suşu)

5.4.3.2. Hemaglutinasyon Testi

-8mL 0 Rh+ insan kanı EDTA'lı Vacutainer tüpe alınır. Kanın EDTA ile karışması ve pıhtılaşmayı önlemesi için 5-6 kez altüst edilir.

-Kan 15mL'lik falcon tüpe alınır. Oda sıcaklığında 1,200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.

-Tüp içerisinde üç katman oluşur. En altta (kırmızı kısım) kırmızı kan hücreleri, orta katman (beyaz kısım) (buffy coat) beyaz kan hücreleri ve plateletler, en üst kısım (sarı kısım) plasmadır.

-Plasma ve buffy coat aspire edilir.

-15mL'lik falconda sadece (kırmızı kısım) kırmızı kan hücreleri kalmıştır. Kırmızı kan hücrelerinin yıkanması için falconun tepesine kadar PBS eklenir. 5-6 kez altüst edilir.

-1,200rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.

-Süpernatant aspire edilir. Tekrar PBS ile yıkanır.

-Bu işleme süpernatantın rengi şeffaf oluncaya kadar devam edilir.

-1:100 dilüsyon hazırlanır. 50mL falcon tüp içerisine 0,5µl kırmızı kan hücresi + 49,5mL PBS eklenir ve 5-6 kez altüst edilir.

-7. Pasaja ait virüs materyali -80'den alınır. Buz içerisinde tutulur RNA'nın degrades olmaması için.

-96-well u-shaped plaka hazırlanır.

-Yukarıdan aşağı yada soldan sağa ne tarafa doğru dilüsyon yapılacaksa üzerine işaretlenir.

-Negatif kontrol olarak son kuyular kullanılır ve bu kuyulara virüs konmaz.

-Yukarıdan aşağı çalışıldı. Kaç sütun çalışılacak ise işaretlenir, en üst sıra sadece virüs örneği için en alt sıra negatif kontrol için ayrılır.

-En üst sıra hariç her kuyuya 50µl PBS eklenir.

-100µl'şer virüslü materyal en üst sıraya eklenir. Buradan alınan 50µl ile aşağı doğru 1:2 dilüsyon yapılır. Her kuyu değiştirmedepipetaj yapılması gerekir. En son sıraya virüs eklenmez.

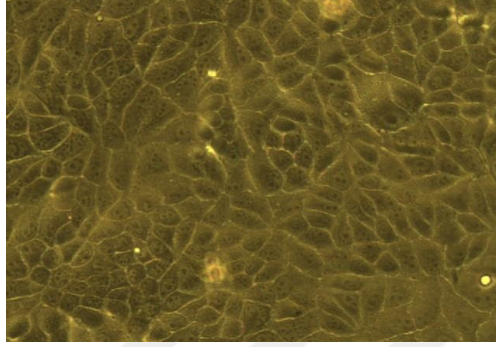
-Her kuyuya 50µl eritrosit süspansiyonu eklenir.

-Plaka kapağı kapatılır ve elimize alınır, 10 saniye sağa-sola yukarı-aşağı hareketlerle karışımı sağlanır.

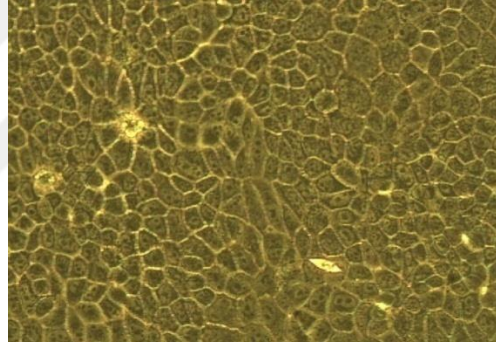
-Bir saat oda sıcaklığında inkübe edilir. Sonuç gözlemlenir.

6. BULGULAR

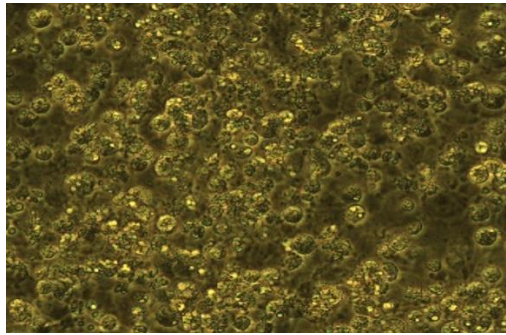
6.1. Influenza Virüs Stoğu İle Enfekte Edilen MDCK'lar Ve Kontrol Olarak Kullanılan MDCK'lar



Resim 6.1.1: Sıfırıncı Günde MDCK Hücreleri (x200 Büyütme)



Resim 6.1.2: Beşinci Günde Kontrol Grubu MDCK Hücreleri (x200 Büyütme)



Resim 6.1.3: Beşinci Günde Influenza Virüsü ile Enfekte MDCK Hücreleri (x100 büyütme)

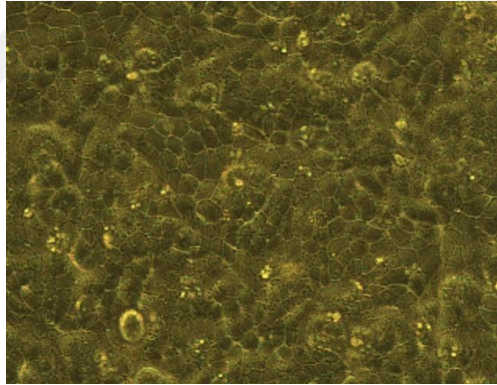
Tablo 6.1.4: Influenza Virüsü İle Enfekte Edilen MDCK'lar ve Kontrol Olarak Kullanılan MDCK'lar

	Kontrol MDCK Hücreleri	Virüs ile Enfekte MDCK Hücreleri
0.gün	Sağlıklı Hücreler	Sağlıklı Hücreler
5.gün	Sağlıklı Hücreler	Ölü Hücreler

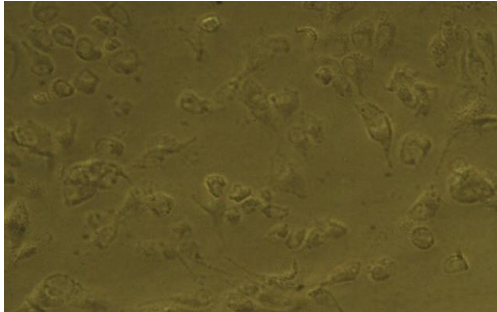
MDCK hücrelerinin influenza virüsü ile başarılı bir şekilde enfekte olduğu gösterilmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılan enfekte edilmemiş MDCK'lar da bunu onaylamaktadır.

6.2.Plak Testi

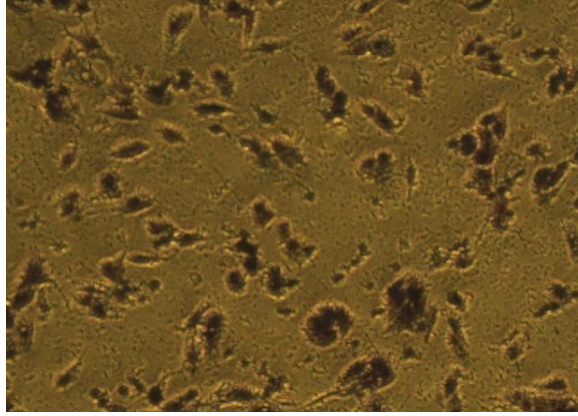
6.2.1. Plak Testinde Kaplama Olarak Agaroz Kullanımı



Resim 6.2.1.1:Beşinci Günde Kontrol Grubu MDCK Hücreleri (x200 Büyütme)



Resim 6.2.1.2:Beşinci Günde Agaroz ile Kaplı MDCK (x200 Büyütme)



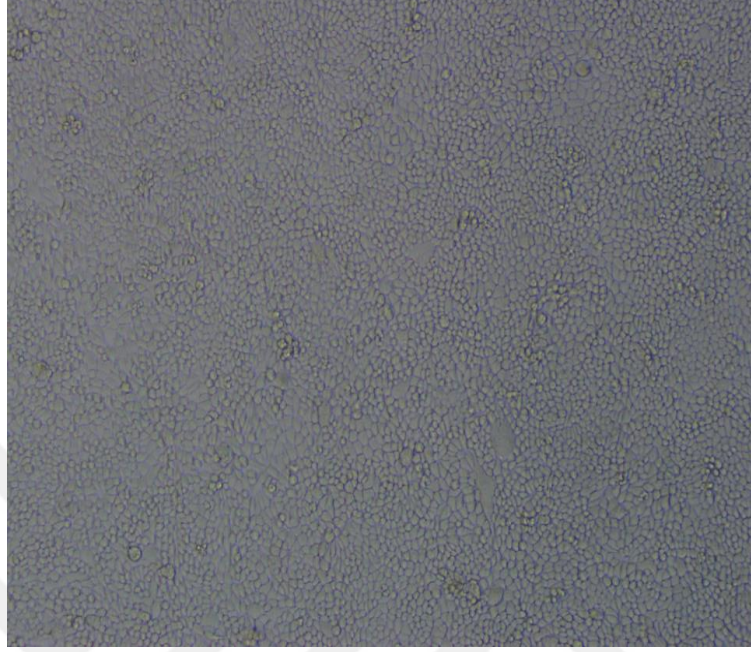
Resim 6.2.1.3: Beşinci Günde Agaroz ile Kaplı Influenza Virüsü ile Enfekte MDCK (x200 Büyütme)

Tablo 6.2.1.4: Agaroz Kaplama Kullanılarak Yapılan Plak Testi

	Agaroz ile Kaplı MDCK Hücreleri	Kontrol MDCK Hücreleri	Agaroz ile Kaplı + Virüs ile Enfekte MDCK Hücreleri
0.gün	Sağlıklı Hücreler	Sağlıklı Hücreler	Sağlıklı Hücreler
5.gün	Ölü Hücreler	Sağlıklı Hücreler	Ölü Hücreler

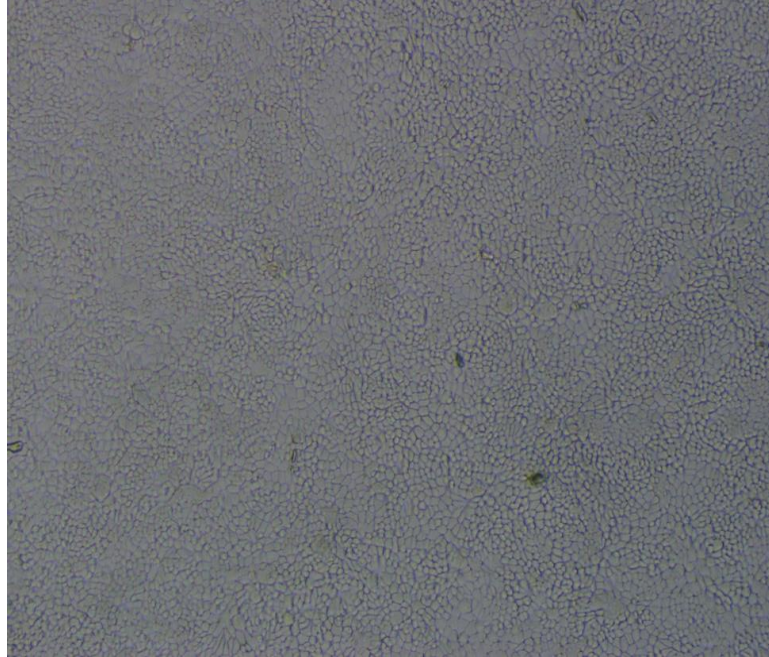
MDCK hücrelerinin agaroz kullanılan tüm plakalarda öldüğü gösterilmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılan MDCK + Agaroz plakalarındaki hücrelerin 5. günün sonunda ölmesi bunun yanında sadece MDCK hücrelerinin bulunduğu kontrol plakalarında hücrelerin yaşaması bize şu bilgiyi verdi. Agaroz kaplama kullanılarak yapılan plak testleri doğru sonuçlar vermemektedir.

6.2.2. Plak Testinde Kaplama Olarak Farklı Konsantrasyonlarda CMC Ve Avicel Kullanımı

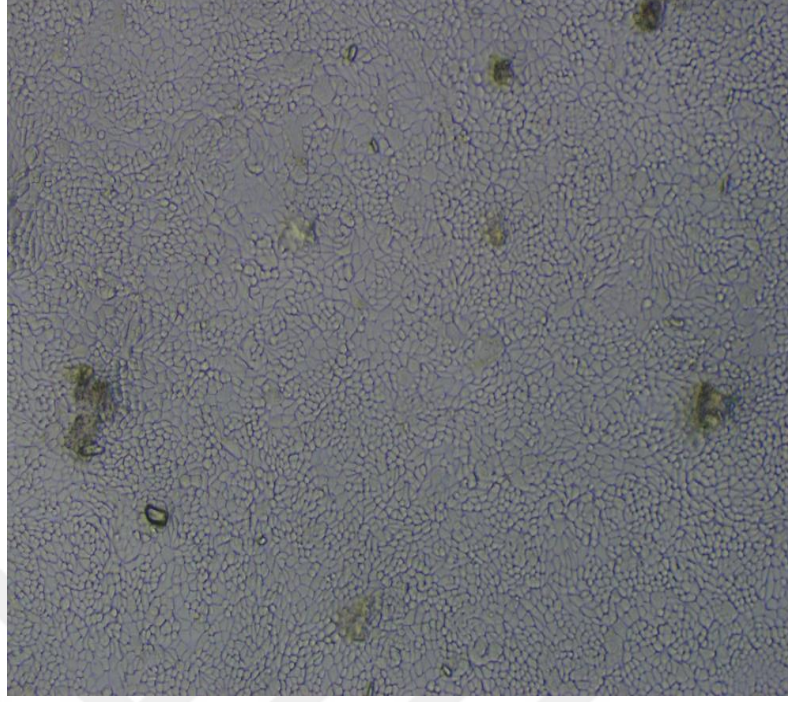


Resim 6.2.2.1:Beşinci Günde Kontrol Grubu MDCK Hücreleri (x40 Büyütme)

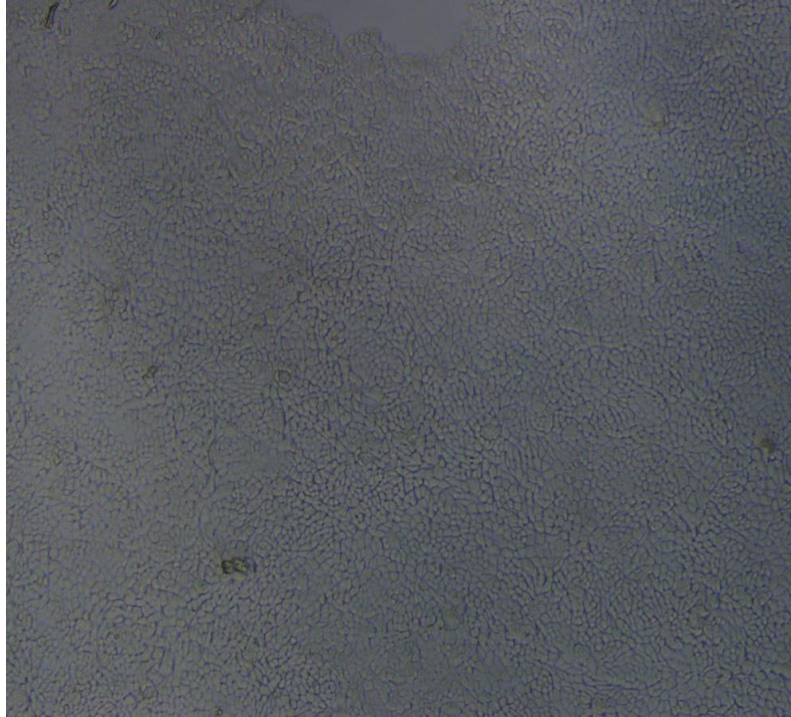
6.2.3. MDCK Hücrelerinde Kaplama Olarak Farklı Avicel Konsantrasyonları



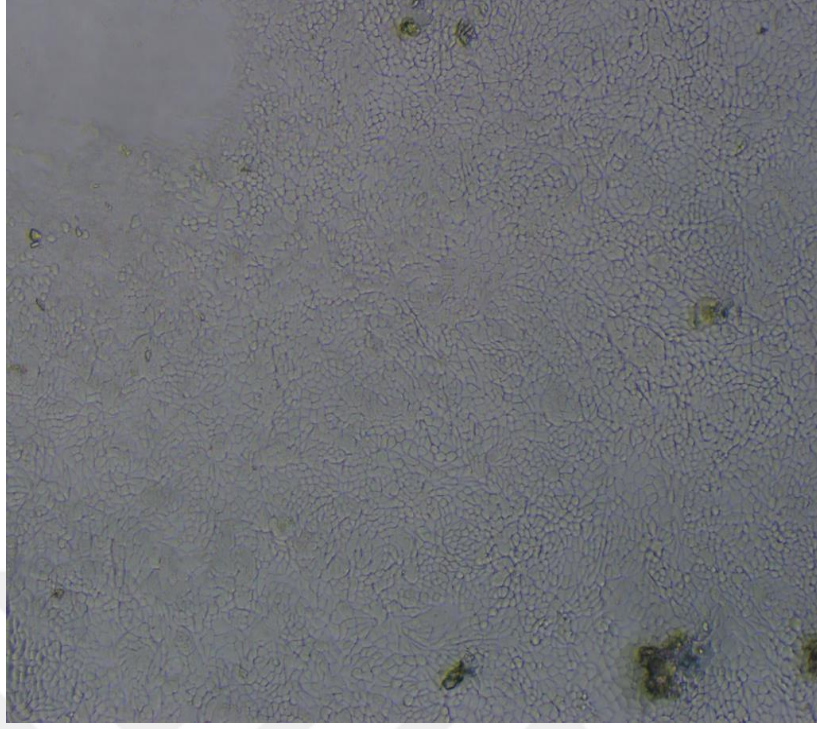
Resim 6.2.3.1:Beşinci Günde 0,015% Avicel ile Kaplı MDCK (x40)



Resim 6.2.3.2:Beşinci Günde 0,3% Avicel ile Kaplı MDCK (x40)



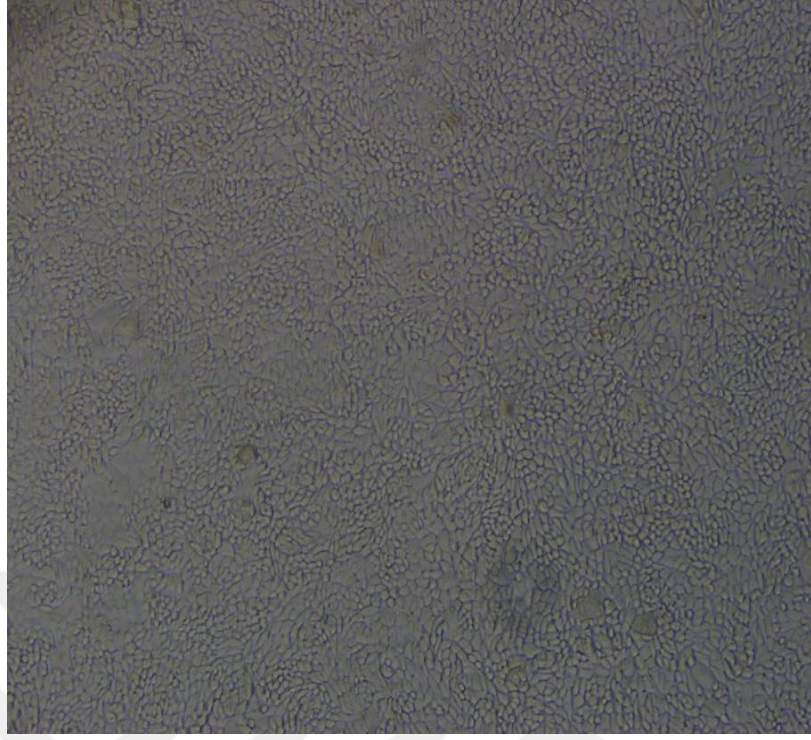
Resim 6.2.3.3:Beşinci Günde 0,45% Avicel ile Kaplı MDCK (x40)



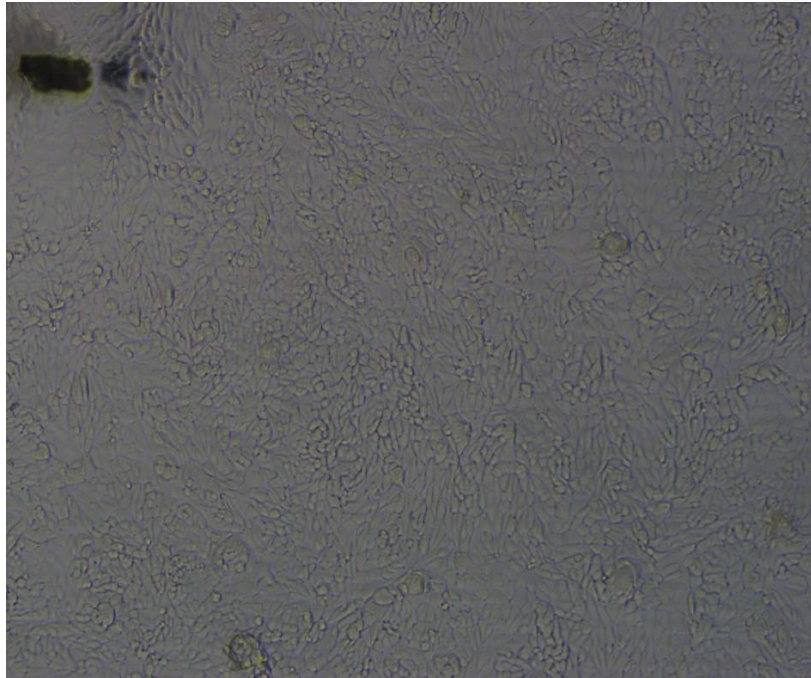
Resim 6.2.3.4: Beşinci Günde 0,6% Avicel ile Kaplı MDCK (x40)



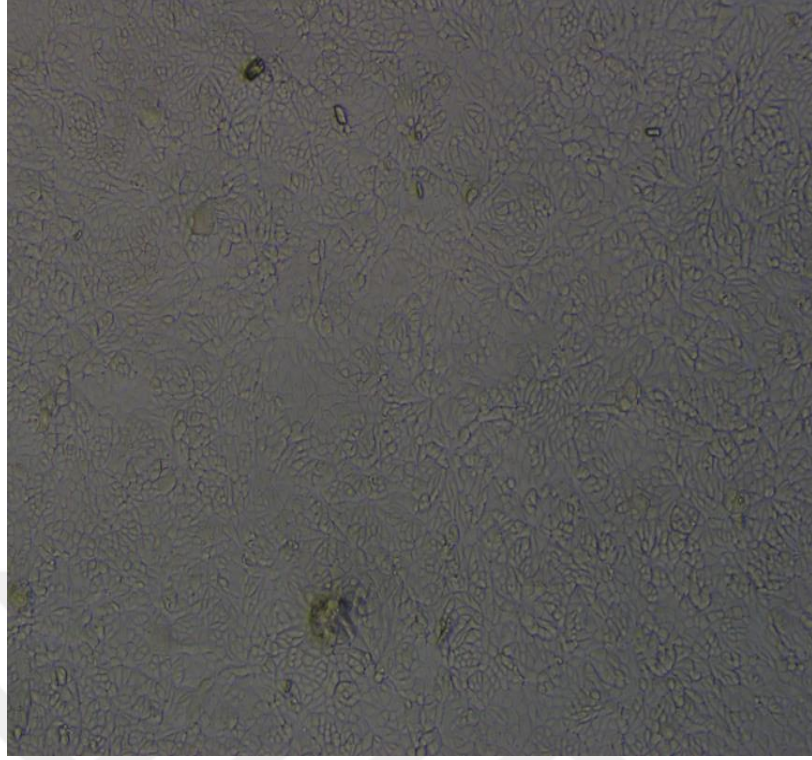
Resim 6.2.3.5: Beşinci Günde 0,8% Avicel ile Kaplı MDCK (x40)



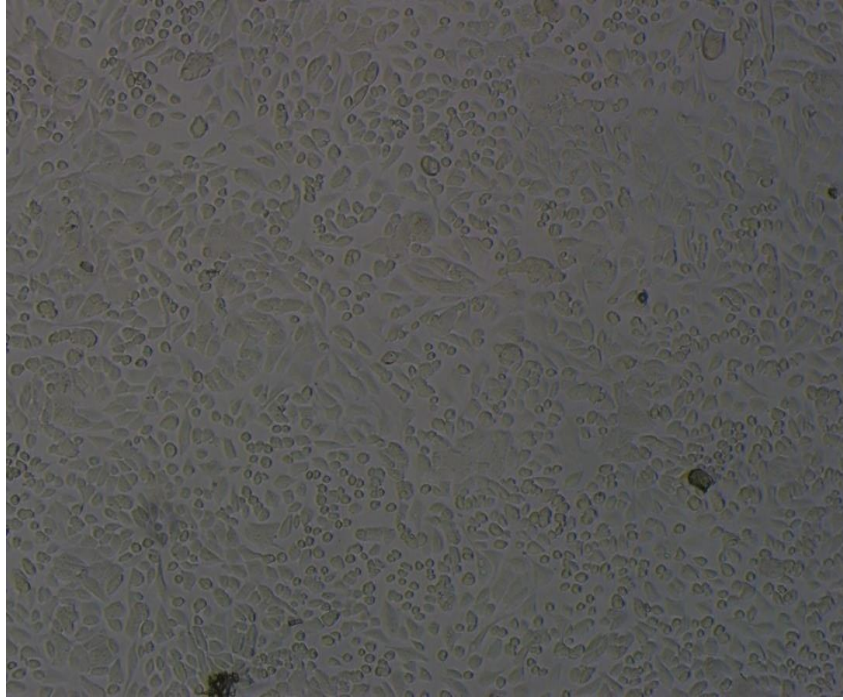
Resim 6.2.3.6:Beşinci Günde 1,2% Avicel ile Kaplı MDCK (x40)



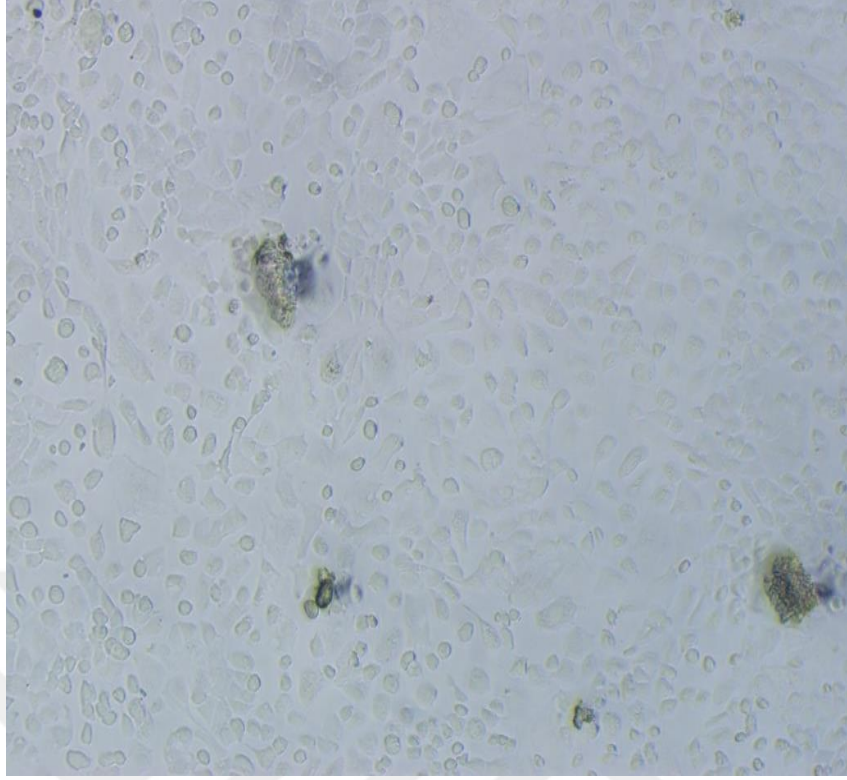
Resim 6.2.3.7:Beşinci Günde 1,8% Avicel ile Kaplı MDCK (x40)



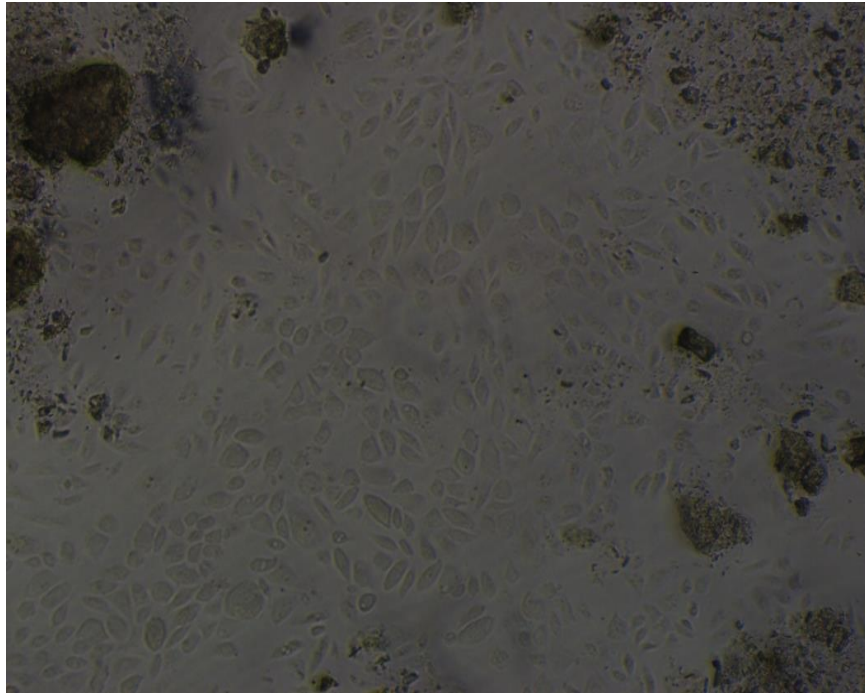
Resim 6.2.3.8:Beşinci Günde 2,1% Avicel ile Kaplı MDCK (x40)



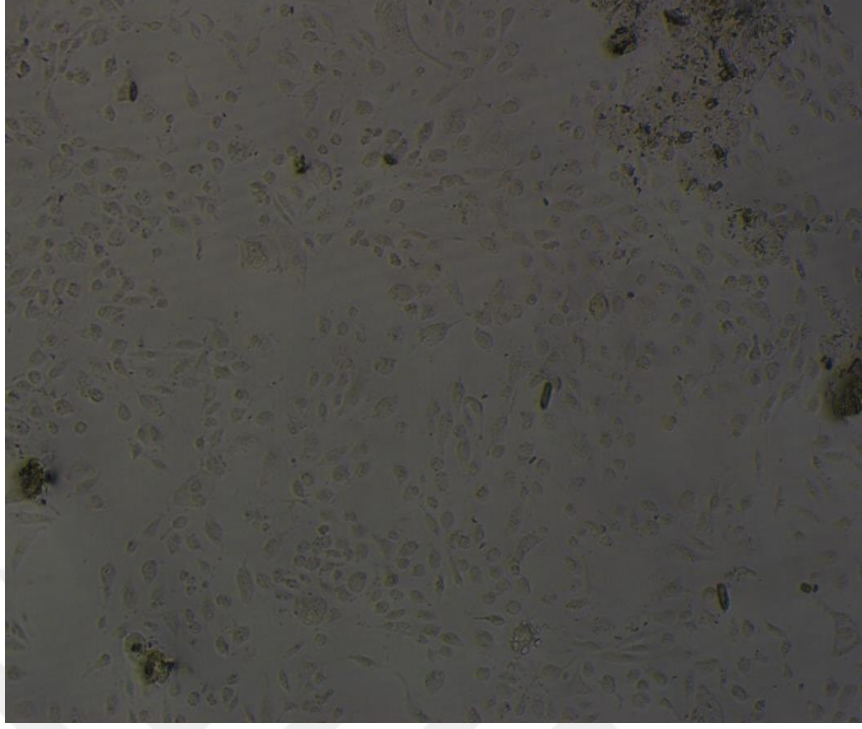
Resim 6.2.3.9:Beşinci Günde 2,4% Avicel ile Kaplı MDCK (x40)



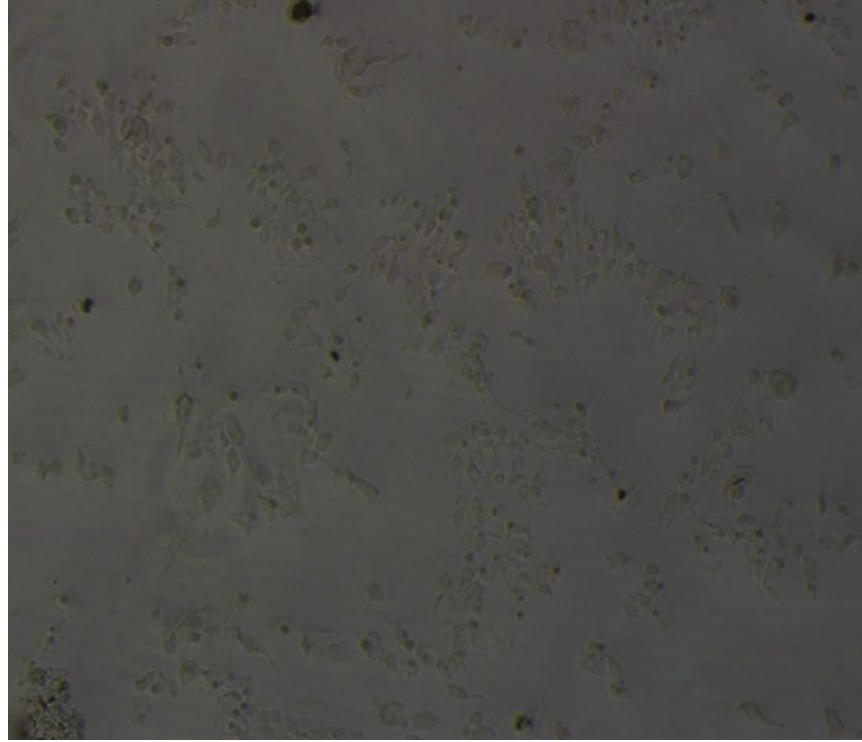
Resim 6.2.3.10:Beşinci Günde 3% Avicel ile Kaplı MDCK (x40)



Resim6.2.3.11:Beşinci Günde 3,6% Avicel ile Kaplı MDCK (x40)

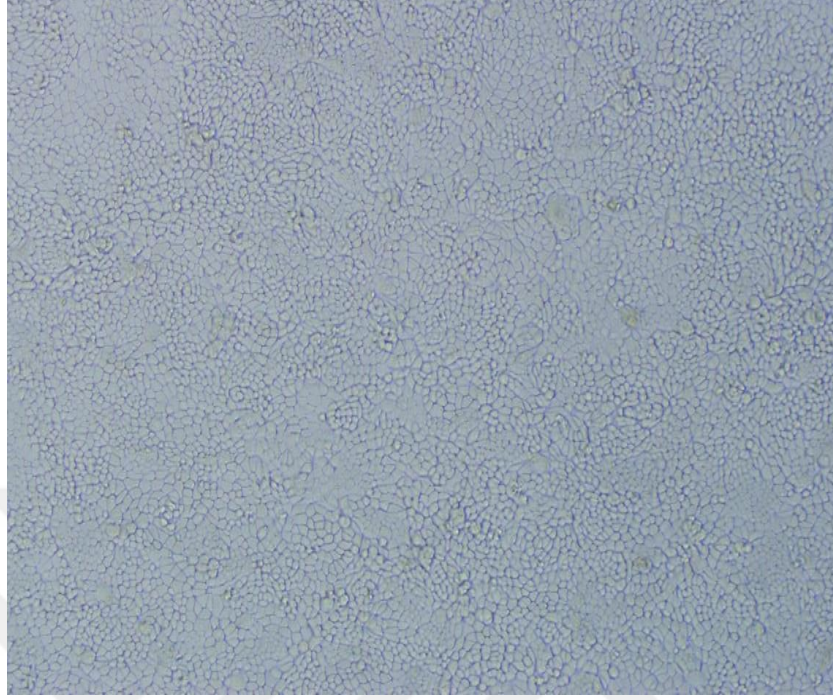


Resim 6.2.3.12: Beşinci Günde 4,2% Avicel ile Kaplı MDCK (x40)

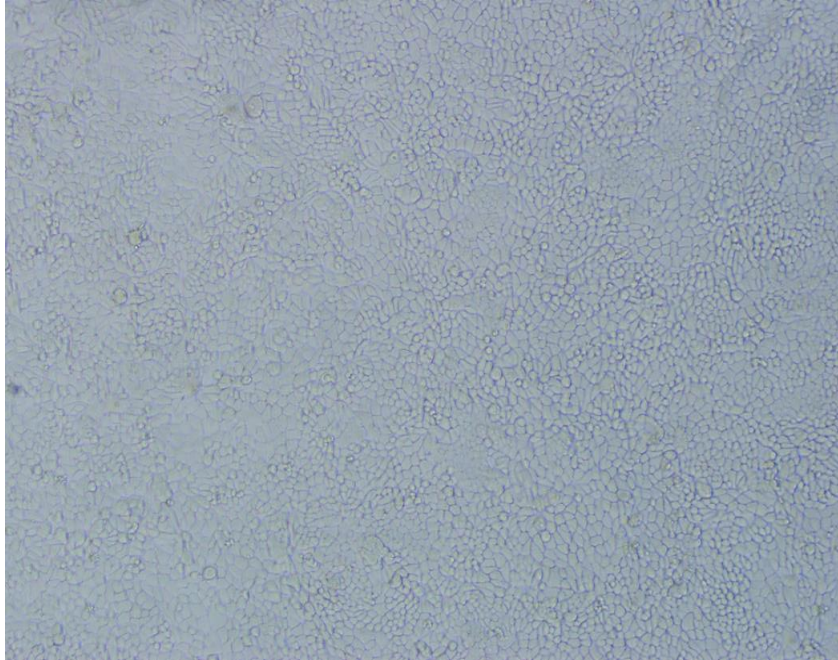


Resim 6.2.3.13: Beşinci Günde 4,8% Avicel ile Kaplı MDCK (x40)

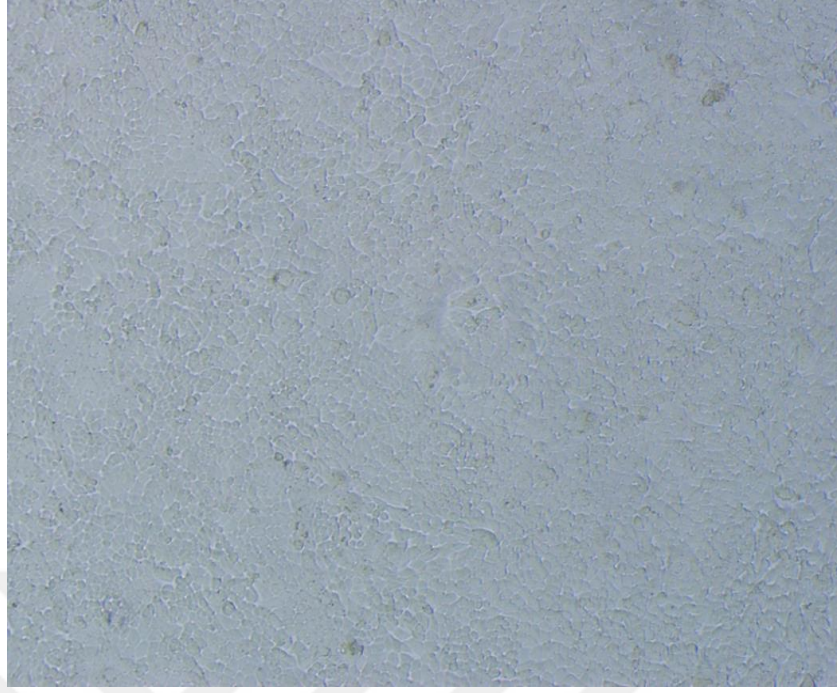
6.2.4. MDCK Hücrelerinde Kaplama Olarak Farklı CMC Konsantrasyonları



Resim 6.2.4.1:Beşinci Günde 0,125% CMC ile Kaplı MDCK (x40)



Resim 6.2.4.2:Beşinci Günde 0,25% CMC ile Kaplı MDCK (x40)



Resim 6.2.4.3:Beşinci Günde 0,5% CMC ile Kaplı MDCK (x40)



Resim 6.2.4.4:Beşinci Günde 0,75% CMC ile Kaplı MDCK (x40)



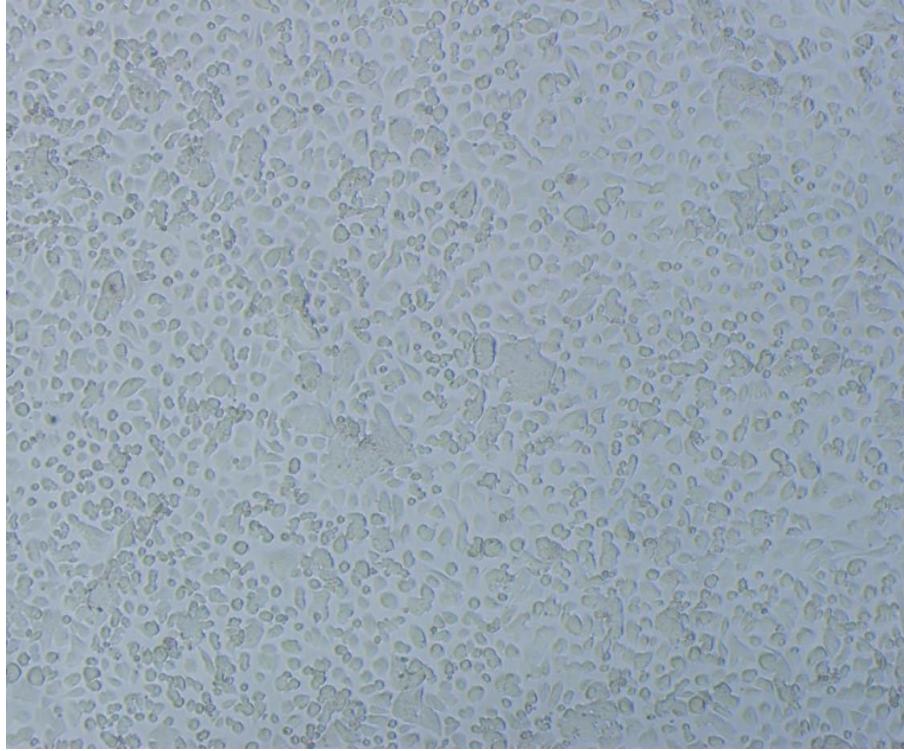
Resim 6.2.4.5:Beşinci Günde 1% CMC ile Kaplı MDCK (x40)



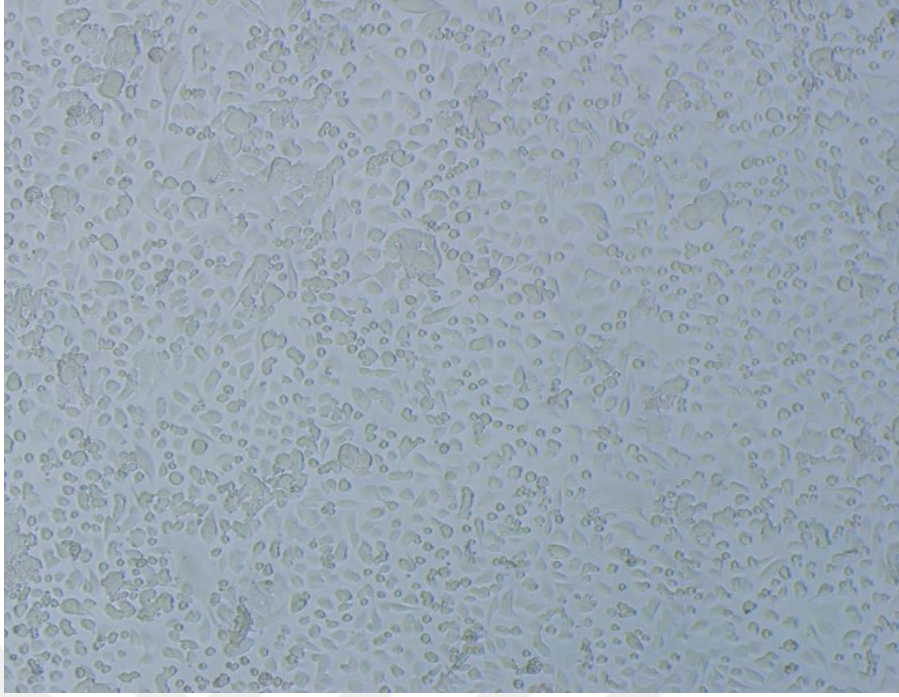
Resim 6.2.4.6:Beşinci Günde 1,25% CMC ile Kaplı MDCK (x40)



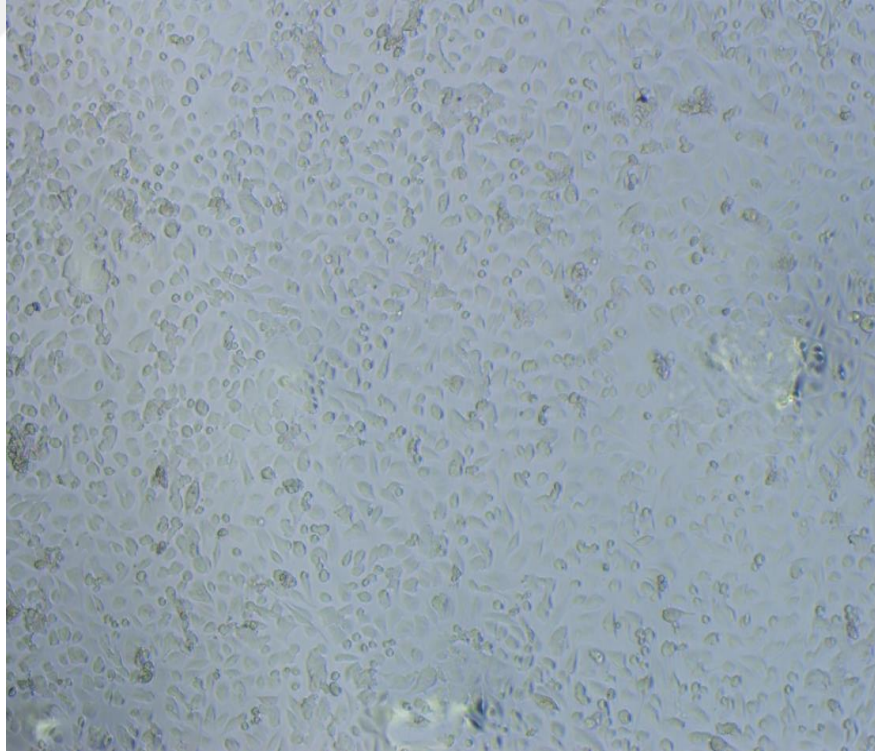
Resim 6.2.4.7:Beşinci Günde 1,5% CMC ile Kaplı MDCK (x40)



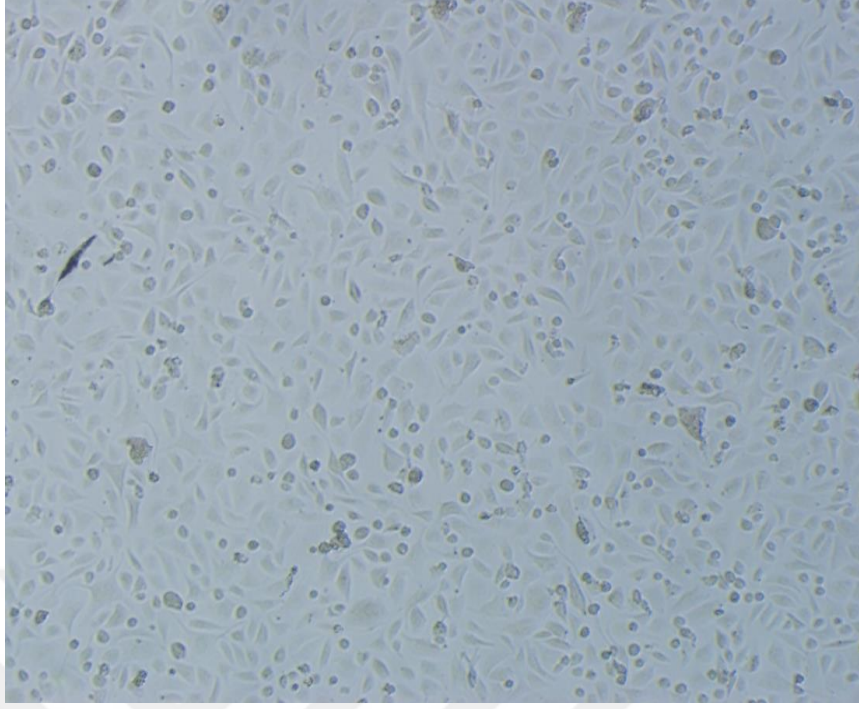
Resim 6.2.4.8:Beşinci Günde 1,75% CMC ile Kaplı MDCK (x40)



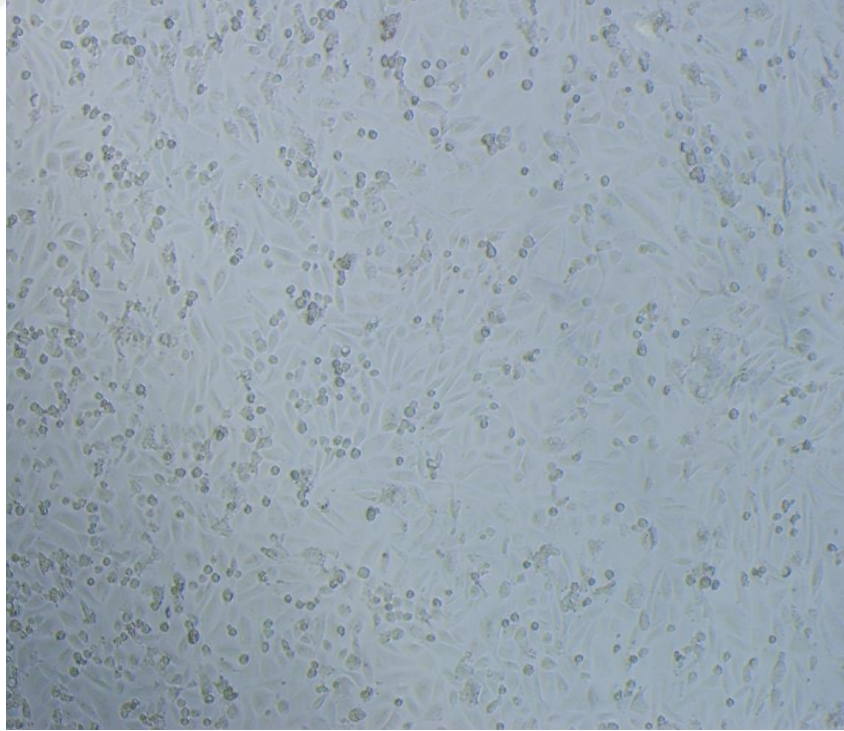
Resim 6.2.4.9:Beşinci Günde 2% CMC ile Kaplı MDCK (x40)



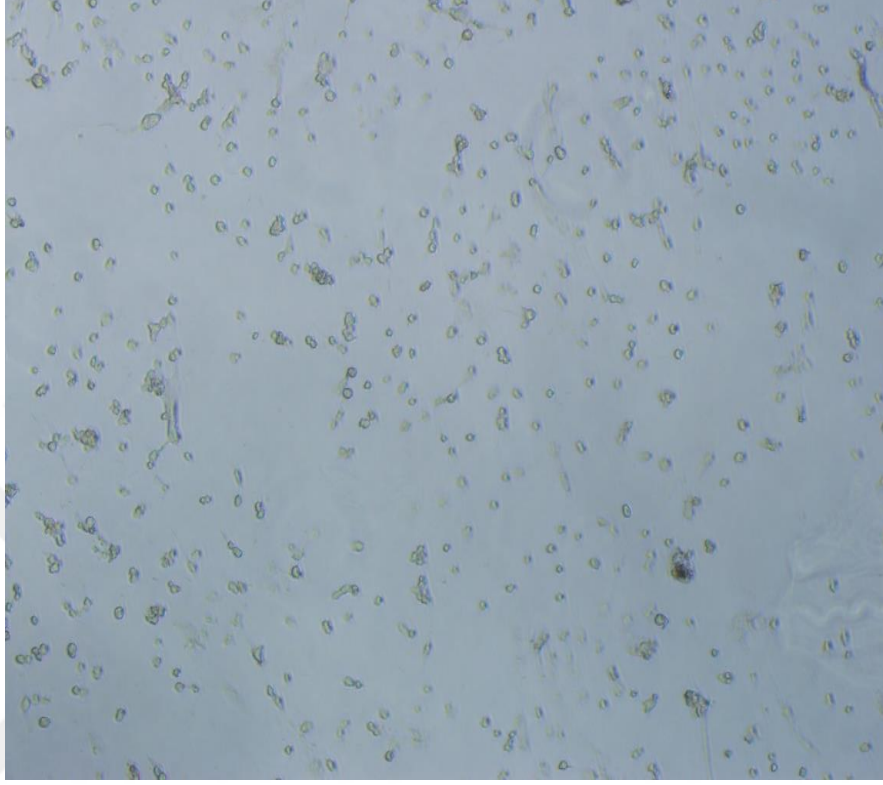
Resim 6.2.4.10:Beşinci Günde 2,5% CMC ile Kaplı MDCK (x40)



Resim 6.2.4.11:Beşinci Günde 3% CMC ile Kaplı MDCK (x40)



Resim 6.2.4.12:Beşinci Günde 3,5% CMC ile Kaplı MDCK (x40)



Resim 6.2.4.13:Beşinci Günde 4% CMC ile Kaplı MDCK (x40)

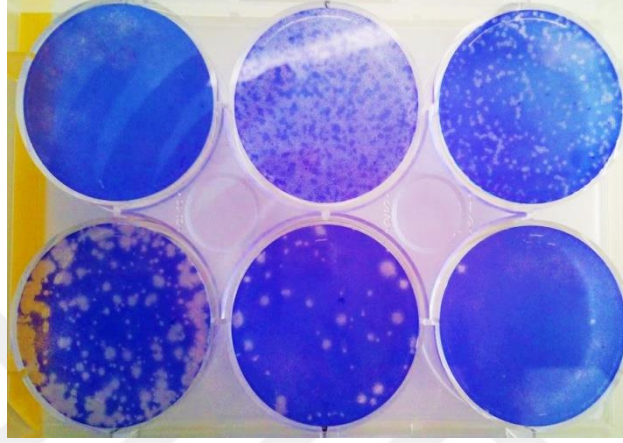
Tablo 6.2.4.14: Kaplama Olarak Kullanılabilecek Farklı Polimerlerin Farklı Konsantrasyonlarda Ayarlanıp MDCK Hücre Morfolojisine Etkisinin Test Edilmesi

	5.Günde MDCK + Avicell		5.Günde MDCK + CMC
0,015 %	Sağlıklı Hücreler	0,125 %	Sağlıklı Hücreler
0,3 %	Sağlıklı Hücreler	0,25 %	Sağlıklı Hücreler
0,45 %	Sağlıklı Hücreler	0,5 %	Sağlıklı Hücreler
0,6 %	Sağlıklı Hücreler	0,75 %	Sağlıklı Hücreler
0,8 %	Sağlıklı Hücreler	1 %	Sağlıklı Hücreler
1,2 %	Sağlıklı Hücreler	1,25 %	Sağlıklı Hücreler
1,8 %	Sağlıklı Hücreler	1,5 %	Sağlıklı Hücreler
2,1 %	Sağlıklı Hücreler	1,75 %	Sağlıklı Hücreler
2,4 %	Hücre morfolojisi değişmeye başlar	2 %	Sağlıklı Hücreler
3 %	Kısmi ölü Hücreler	2,5 %	Hücre morfolojisi değişmeye başlar
3,6 %	Kısmi ölü hücreler	3 %	Kısmi ölü hücreler
4,2 %	Kısmi ölü hücreler	3,5 %	Kısmi ölü hücreler
4,8 %	Kısmi ölü hücreler	4 %	Kısmi ölü hücreler

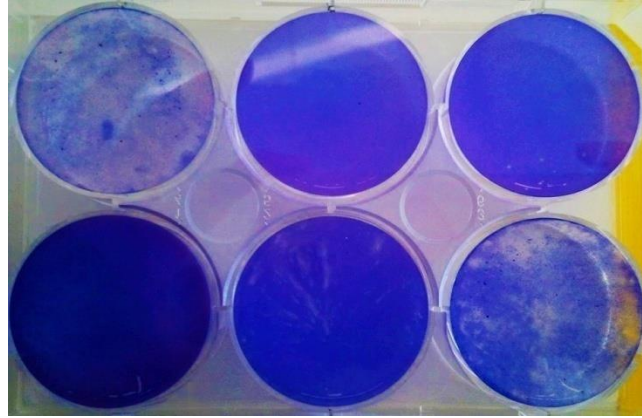
Farklı konsantrasyonda kullanılan Avicel ve CMC kaplamalarda Avicel'in 2% likten daha konsantre olan kaplamaları ve CMC'nin de aynı şekilde 2% likten daha konsantre olan kaplama uygulamaları hücrelere zarar verip öldürdüğü gözlemlenmiştir. Bu sebeple plak testini uygularken hücrelerin morfolojisine ve yaşamına zarar vermeyecek konsantrasyonlar denendi. Böylelikle plak testinin daha sağlıklı ve doğru sonuçlar verme olasılığı artırıldı.

6.2.5. Yedi Pasajlama Sonucu Elde Edilen Virüsün Plak Testinde Enfektivitesinin Hesaplanması

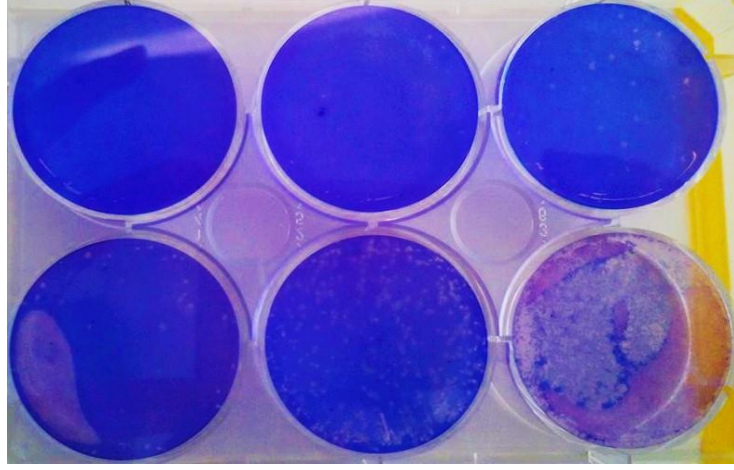
6.2.5.1. Farklı Virüs Dilüsyonlarıyla Enfekte Edilen MDCK'lara Kaplama Olarak Farklı Konsantrasyonlarda CMC ve Avicel Kullanarak Plak Testi Uygulaması



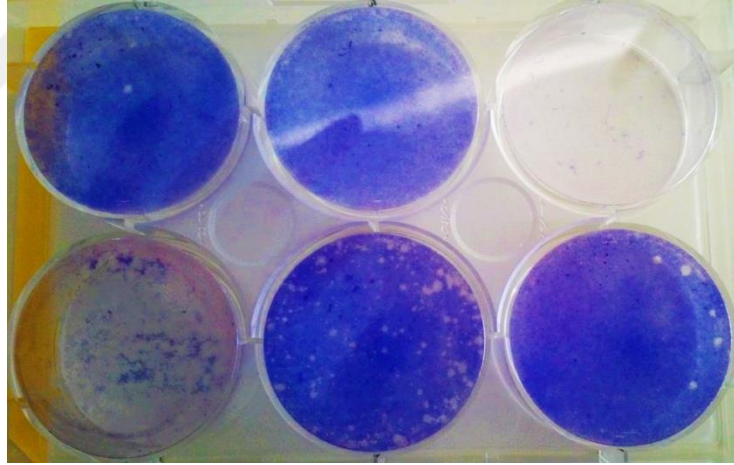
Resim 6.2.5.1.1:Kaplama olarak üst sıra ilk kuyu ve alt sıra 1,2% Avicel, üst sıra son iki kuyu 2% CMC kullanarak yapılan plak testi. Soldan sağa doğru üst sıra virüs dilüsyonu Avicel Kontrol, 10^{-2} , 10^{-3} . Soldan sağa doğru alt sıra virüs dilüsyonu 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .



Resim 6.2.5.1.2:Kaplama olarak sadece üst sıra ilk iki kuyuda 1% CMC kullanılarak yapılan plak testi. Soldan sağa doğru üst sıra virüs dilüsyonu 10^{-3} , CMC Kontrol, 10^{-5} . Soldan sağa doğru alt sıra virüs dilüsyonu hücre kontrol, 10^{-5} , 10^{-4} .

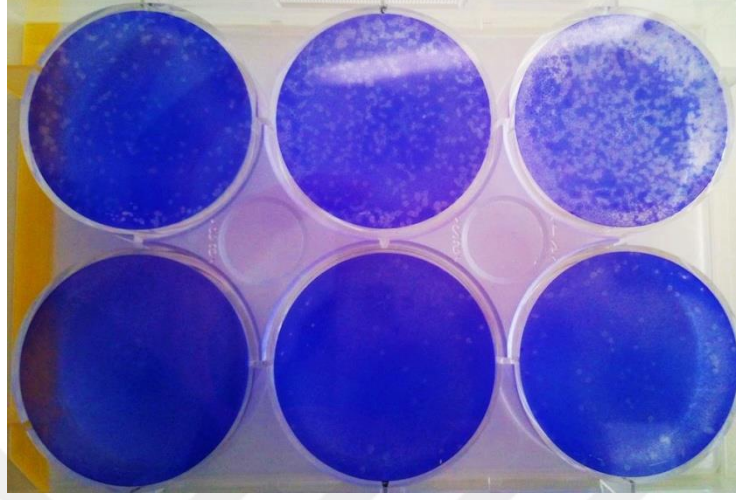


Resim 6.2.5.1.3:Kaplama olarak üst sırada 2% CMC, alt sırada 1% CMC kullanılarak yapılan plak testi. Soldan sağa doğru üst sıra virüs dilüsyonu CMC Kontrol, 10^{-5} , 10^{-4} . Soldan sağa doğru alt sıra virüs dilüsyonu 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} .

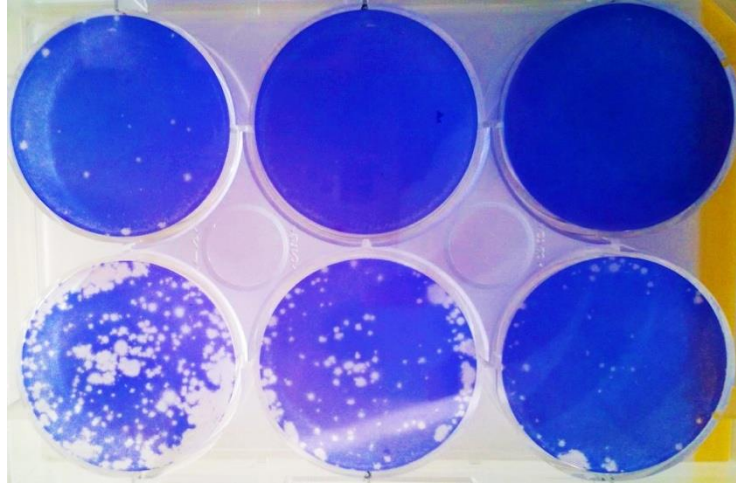


Resim 6.2.5.1.4:Kaplama olarak üst sırada iki kuyu ve alt sırada 2,4% Avicel, üst sıra sağdaki son kuyuda 1,2% Avicel kullanılarak yapılan plak testi. Soldan sağa doğru üst sıra virüs dilüsyonu 10^{-5} , Avicel Kontrol, 10^{-2} . Soldan sağa doğru alt sıra virüs dilüsyonu 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} .

6.2.5.2. Farklı Virüs Dilüsyonlarının Kaplama Olarak 2% CMC ve 1,2% Avicel Kullanarak Plak Testinde Uygulaması



Resim 6.2.5.2.1: Kaplama olarak 2% CMC kullanılarak yapılan plak testi. Soldan sağa doğru üst sıra virüs dilüsyonu $10^{-3.5}$, 10^{-3} , $10^{-2.5}$. Soldan sağa doğru alt sıra virüs dilüsyonu kontrol, $10^{-4.5}$, 10^{-4} .



Resim 6.2.5.2.2: Kaplama olarak 1,2% Avicel kullanılarak yapılan plak testi. Soldan sağa doğru üst sıra virüs dilüsyonu $10^{-4.5}$, Avicel Kontrol, Hücre Kontrol. Soldan sağa doğru alt sıra virüs dilüsyonu 10^{-3} , $10^{-3.5}$, 10^{-4} .

Tablo 6.2.5.3 : Avicel ve CMC'nin İki Farklı Konsantrasyonlarını Kullanarak Plak Testi Uygulamasında Karşılaştırılması

MDCK	2,4% Avicel	1,2% Avicel	2% CMC	1% CMC	
Sağlıklı Hücreler	Hücre Morfolojisi Kötü	Hücre Morfolojisi Sağlıklı	Hücre Morfolojisi Kontrol ile Karşılaştırıldığında Çok İyi Denemez	Hücre Morfolojisi Sağlıklı	Kontrol
Tüm Hücreler enfekte oldu	Tüm Hücreler Kalkmış, Virüs dilüsyonu çok yoğun olduğu için	Tüm Hücreler Kalkmış, Virüs dilüsyonu çok yoğun olduğu için	Tüm Hücreler Kalkmış, Virüs dilüsyonu çok yoğun olduğu için	Tüm Hücreler Kalkmış, Virüs dilüsyonu çok yoğun olduğu için	10⁻² Virüs Dilüsyonu
Hücrelerin çoğu enfekte oldu	Plaklar okunmuyor	Plaklar çok yoğun ve büyük iç içe geçmiş, okunmuyor	Plaklar çok yoğun küçük noktacıklar halinde iç içe geçmiş okunmuyor	Plaklar okunmuyor	10⁻³ Virüs Dilüsyonu
Kısmi Enfeksiyon	Plaklar Büyük büyük içi boş daireler şeklinde	Plaklar Büyük büyük içi boş daireler şeklinde	Plaklar küçük noktalar halinde yaklaşık 20 adet sayıldı	Plaklar küçük noktalar halinde yaklaşık 20 adet	10⁻⁴ Virüs Dilüsyonu

	gayet net okunmakta yaklaşık 20 adet plak sayıldı.	gayet net okunmakta yaklaşık 30 adet plak sayıldı.		sayıldı	
Enfeksiyon Yok	Plak sayısı 1 adet	Plak sayısı 2 adet	Plak yok gibi sayılamadı.	Plak sayısı 2 adet, çok küçük noktalar şeklinde zor gözlemlendi.	10⁻⁵ Virüs Dilüsyonu

Deneme sonucunda en sağlıklı görüntü 1.2% Avicel ile alınmıştır. Daha yoğun konsantrasyonların plak sayılarını azalttığını gördük. Bu yüksek konsantrasyon sebebiyle hürelere zarar vermesinden kaynaklandı. CMC de ise 1%lik konsantrasyon ve 2% lik konsantrasyonun her ikisinde dezavantajları ve avantajları tabloda belirtildiği gibi gözlemlendi. Kullanılan 7. Pasaja ait virüsün dilüsyonları oluşturulduğunda ise 10⁻⁵ olarak hazırlanan virüs dilüsyonu bize en net görüntüyü verdi.

Ardından yapılan ikinci testte oluşturulan 10 kat virüs dilüsyonları arasında çok net farklılıklar var mı diye ara değerleri yani 10⁻⁴ ve 10⁻⁵ dilüsyonlar oluşturulduğunda yanında bir de 10^{-4.5} değerini de oluşturup test ettik ve sonucun hesaplamalar sonucu değişmediğini gözlemledik.

6.3. Yedi Pasajlama Sonucu Elde Edilen Virüsün Realtime Rt-Pcr Yöntemi İle Titrasyonunun Belirlenmesi



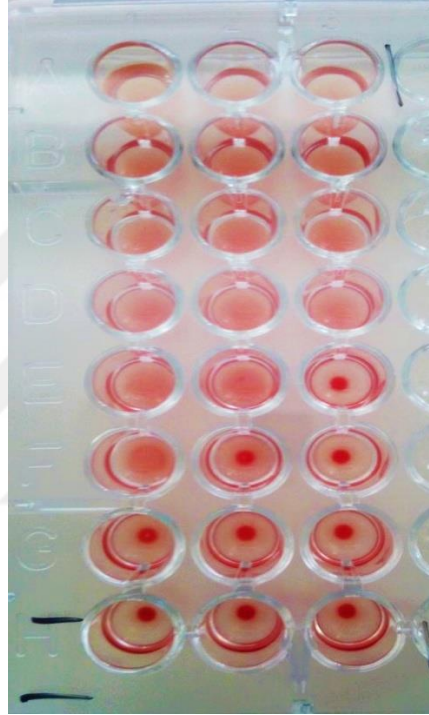
Resim 6.3.1:Realtime RT-PCR Sonucu Elde Edilen Pik Görüntüleri

Tablo 6.3.2:Realtime RT-PCR Sonucu Elde Edilen Veriler

Well	Fluor	Type	Identifier	Replicate #	Threshold Cycle (Ct)	Ct Mean	Ct Std. Dev	Set Point
D03	FAM	Unkn	Sample1	7.PASAJ VİRÜS	11.10	10.50	0.837	N/A
D04	FAM	Unkn		7.PASAJ VİRÜS	9.91	10.50	0.837	N/A
D06	FAM	Unkn	Sample2	STD	18.38	17.90	0.676	N/A
D07	FAM	Unkn		STD	17.42	17.70	0.676	N/A
D09	FAM	Unkn	Sample3	NEGATİF KONTROL	38.65	38.64	0.011	N/A
D10	FAM	Unkn		NEGATİF KONTROL	38.63	38.64	0.011	N/A

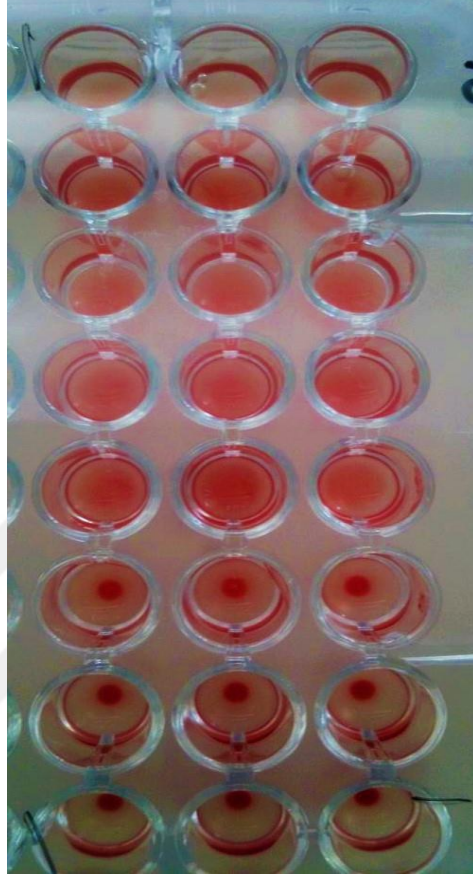
6.4. Yedi Pasajlama Sonucu Elde Edilen Virüsün Hemagglütinasyon Testi Yöntemi İle Titrasyonunun Belirlenmesi

6.4.1. Yedi Pasajlama Sonucu Elde Edilen Virüsün Bir Alt Ve Bir Üst Pasajla Karşılaştırılması



Resim 6.4.1.1: Farklı Virüs Pasajlarının Hemagglutinasyon Testinde Karşılaştırılması. Yukarıdan aşağı birinci sütun 8.pasaja ait virüs solusyonu, ikinci sütun 7.pasaja ait virüs solusyonu, 6. pasaja ait virüs solusyonudur. En alt sıra kontrol grubu sadece kırmızı kan hücresi bulunmaktadır. 8.pasaja ait virüsün hemagglutinasyon ünitesi 1HAU: 32, 7.pasaja ait virüsün hemagglutinasyon ünitesi 1HAU: 16, 6. pasaja ait virüsün hemagglutinasyon ünitesi 1HAU: 8'dir.

6.4.2. Yedi Pasajlama Sonucu Elde Edilen Virüsün Üçlü Olarak Çalışılması



Resim 6.4.2.1: Yedinci Pasaja ait Virüsün Hemaglürinasyon Testi Görüntüsü. Yukarıdan aşağı doğru 7. Pasaja ait iki katlı virüs dilusyonları kullanıldı. En alt sırada sadece kırmızı kan hücreleri vardır. Virüsün hemaglütinasyon ünitesi 1HAU: 16'dır.

Tablo 6.4.3: Hemagglutinasyon Testi, Plak Testi, Real-Time RT-PCR Testi Aynı Anda 7. Pasaja Ait Virus Dilusyonu İle Çalışıldığında Oluşan Bağlantı

		7. pasaja ait virüs dilüsyonu ile çalışıldığında
Hemagglutinasyon Testi		1 HAU=16
Real-time RT-PCR		Yaklaşık 10 ct değerinde
Plak Testi	1,2% Avicel	1.10^6 pfu/mL
	1% CMC	1.10^6 pfu/mL

Tüm bu testler çoğaltılan virüsün 7. Pasajının 1mL'lik alikotlarıyla defalarca test edilmiştir. Hemagglutinasyon ünitesi 16 olarak hesaplanmış bundan sonraki tanımlama testi olan inhibisyon testinde bu değer kullanılarak serum içerisindeki ne kadar miktar antikorun aglutinasyonu engelleyebildiği çalışmaları yapılabilir. Real-time RT-PCR testi elde ne kadar virüs patikülü mevcut enfeksiyöz yada non-enfeksiyöz bize net sonuç verdi. Elimizdeki virüs süspansiyonuna ait her alikotta enfeksiyöz virüs miktarını doğruladık.

7. TARTIŞMA

Virüslerin biyolojik özelliklerine dayanan bir dizi titrasyon belirleme metodu vardır, örneğin virüsün farklı türün kırmızı kan hücrelerini (RBC'leri) bir araya getirme yeteneği gibi demiştir Hirst, (57). İnfeksiyöz ve noninfeksiyöz virüs parçacıklarının RBC'yi aglütine etme yeteneği, hemagglutinasyon testinin (HA) temelini oluşturmaktadır. Plak analizi,% 50 doku kültürü bulaşıcı dozu (TCID 50) ve% 50 yumurta bulaşıcı doz (EID 50), bir numunedeki bulaşıcı virüs parçacıklarının miktarını belirlemek için kullanılan yöntemlerdir. Uygun virüs titrasyonu, virüsün, hemagglutininin ve nöraminidaz gibi ana yüzey proteinlerinin antijenik özelliklerinin analizi için gereklidir. İnfluenza virüs titrasyonu için standart yöntem, virüs hemagglutinin proteininin (HA)'nın farklı türlerin RBC'lerini aglütinasyon yeteneğine dayanır. Tavuklar veya hindiler gibi genellikle kuş RBC'leri hemagglütinasyon testinde kullanılır. Kuş RBC'leri küçük ve çekirdeklidir, hızlı çökerler ve virüs yokluğunda V-formlu mikro titre plakasının altına kompakt bir düğme oluştururlar, böylece net son nokta seyreltme tayini elde edilir. Çekirdeksiz memeli RBC'leri (insan, kobay, at gibi), U-formlu mikrotitre plakası kontrol kuyularının tabanında "halo" veya dairevi olarak görünür, böylece seyreltme bitiş noktasını okuması zorlaşır.

Ito ve ark. (46), HA testinde kullanılacak olan kırmızı kan hücreleri (eritrositler) türünün dikkate alınması gerektiğini vurgulamıştır. Özellikle insanlardan alınan memeli influenza virüslerinin ilk tespiti için, kobay ve insan eritrositleri kullanılmalıdır ve bu hücrelerin de çekirdeksiz hücreler olup çökmesinin uzun sürdüğü akıldan çıkarılmamalıdır demektedir. Hindi ya da kaz eritrositleri, tüm influenza virüslerini tavuk eritrositlerinden daha iyi algılamaktadır diyen Morishita ve ark. (55), ayrıca tavuk eritrositleri, hemagglütinasyon deneylerinde, insan veya at eritrositlerinden farklı olarak çekirdeklidir ve hemen çökler demektedir. Bazı kuş gribi virüsleri için, özellikle memeli kaynaklarından gelen HP H5N1 virüsleri için at eritrositleri kullanılmalıdır demiştir, Louisirirotchanakul ve ark. (56). Bu nedenle insan ve diğer memeli influenza virüslerinin ilk tespiti için hindi, kobay ve at eritrositleri kullanımı uygun iken ve avian influenza virüsleri için hindi ve at eritrositleri kullanımı uygundur.

Hemagglütinasyon (HA) tahlili, virüsün çoğalma kabiliyetine değil influenza virüslerinin yüzeyindeki hemagglutinin miktarına bağlıdır demişlerdir, Miller ve Stanley, (58). HA testi, viral partikülleri, enfeksiyözlülükten bağımsız olarak ölçer. HA uç noktası, komple hemagglutinasyona neden olan en yüksek virüs seyreltmesi ile belirlenir. HA titeri, son hemagglütinasyonla son kuyudaki virüsün seyreltilmesinin karşılığıdır. Bir HA ünitesi (HAU), eşit hacimde standartlaştırılmış RBC'leri aglütüne etmek için gerekli virüs miktarı olarak tanımlanır demiştir, Miller (59). Hemagglütinasyonun bu "birimi" operasyonel birim olup mutlak miktarda bir virüsün ölçüsü değildir. Madin-Darby Köpek Böbrek (MDCK) hücre hattı veya embriyonlanmış tavuk yumurtaları gibi hücre kültüründen izole edilen influenza virüsü, 96 yuvalı bir mikrotitre plaka kullanılarak izole edilen süpernatanın bir tamponda iki kat seri seyreltilmesi ile titre edilir. İlk kuyu sadece izolatu, ikinci ve sonraki kuyuları 50 ml tampon ve seyreltilmiş virüs içerir. HAU'lar, deneyin gerçekleştirilmesi için ihtiyaç duyulan standart antijen seyreltiğini belirlemek için HAI tahlilinde kullanılır.

Çiftlik hayvanlarından alınan kanın önceden taramasının yapılması gerekmektedir. Bunun için ticari bir kaynak bulunması gerekir. Tüm testler için kullanılan RBC'ler mümkün olduğunca taze olmalıdır. Eğer kan hemen kullanılmayacak ise antikoagulan özellikte olan Alsever'in veya sodyum sitratın 1:1 oranda seyreltmesiyle korunmalıdır. 1990'larda, insan influenza A (H3N2), tavuk RBC'lerini topaklanma yeteneğini kaybettiğini belirtmişlerdir, Medeiros ve ark. (60). Şu anda dolaşan influenza tipleri ve alt tipleri test edilirken hindiveya kobay RBC'leri tercih edilir. Standardize edilmiş RBC'ler HA testi ve EID 50 için bir hafta kadar veya hemoliz oluncaya kadar kullanılabilir. HAI testi için kullanılan RBC'ler, optimum hassasiyet için test gününde yapılmalıdır.

Başarılı plak testi, hemagglutinasyon testi ve Real-Time RT-PCR için en kritik olan nokta kullanılan virüs kalitesidir. Bir virüs stoğunun hazırlanması konusunda; enfeksiyöz virüs için optimize edilmiş olması ve enfeksiyöz olmayan veya kusurlu virüs parçacıkları içermemesi önemli bir husustur. Bu nedenle, virüs stoğu inokulum için yüksek bir virüs seyreltmesi ile üretilmelidir ve virüs üretimi HA titresini ile değerlendirildiğinde zirveye ulaştığında hasat edilmelidir. Virüsün enfeksiyöz

özelliğini koruması için testler sırasında virüs stoğu buzda tutulmalıdır.HAU'nun, RBC türüne göre değiştiği deneylerimizle test edilip görülmüştür. Virüs süspansiyonu ile temas eden tüm ekipman ve malzemeler steril olmalı ve uygun steril teknikler kullanılmalıdır. FBS viral girişi engeller ve hücrelerin etkin enfeksiyonu için çıkarılması gerektiği unutulmamalıdır. > 1 saat kuluçka süresi MDCK hücre tabakasının kurumasını ve azaltılmış hücre canlılığı ile sonuçlanabilir. Plak testinde düşük virüs seyreltmeleri yapılırsa, hücre katmanı virüs tarafından tamamen yokedilebilir, bu da kuyularda hiç veya en az mor renklendirmeye neden olabilir. MDCK hücrelerinin pasaj numarası 25'ten fazla olmamalıdır. Hücreleri yeterince enfekte etmediğini ve hücre morfolojilerinin bozulduğu gözlemlenmiştir. Kullanılan hücre hattına uygun verilere dayanarak pasaj sayısı ayarlanmalıdır.

EID 50, embriyonlu tavuk yumurtalarının ya da Madin-Darby Köpek Böbrek (MDCK) hücre hattının% 50'sine enfekte olabilen numune virüsün en yüksek seyreltmesini belirleyerek bir numune virüsteki bulaşıcı virüs miktarını belirlemek için kullanılan biyolojik bir yöntemdir.% 50 pozitif sonuç üretmek için gereken seyreltmeyi belirleyebilmek için,Reed-Muench yöntemi kullanılır, Reed ve Muench, (61).

Plak tahlili, influenza virüsünün, agar veya agarozla kaplı hücre tabakasında plaklar oluşturma kabiliyetine dayanan bir yöntemdir demişlerdir, Tobita ve ark. (62), Tobita, (63). Plaklar, virüsün sebep olduğu sitopatik etki (CPE) ve enfekte olmuş hücrelerin ölümü nedeniyle oluşur. Böylece hücre üzerinde lize edilmiş hücrelerin dairesel bölgelerinin oluşumuna neden olur. Sadece enfeksiyöz virüs partikülleri, konakçı hücreyi enfekte eder ve plak üretebilmektedir.Plak oluşturma üniteleri (PFU), bir hücre katmanında (genellikle MDCK hücreleri kullanılır) oluşan plakların sayısını belirleyerek bir numunedeki bulaşıcı virüs miktarının nicel bir ölçümünü vermektedir.Yüksek miktarda virüs seyreltmesinde, her plak, tek bir virüs parçacığı tarafından enfekte edilmiş hücrelerin bölgesini temsil eder. Böylece, bir virüs stoğunun titeri, mililitre başına PFU cinsinden hesaplanabilir.Plak deneyi, on katlı seri seyreltme yaparak ve daha sonra hücre tabakasını enfekte ederek gerçekleştirilir. Enfekte olmuş hücre tabakası bulunduran kuyular agaroz kaplama ile örtülür.Agaroz

çıkarılır; virüsleri inaktive etmek için hücre katmanına etanol eklenir ve plakları görselleştirmek için ise kristal mor ilave edilir.

Herpes virüsleri ve poxvirüsler gibi bazı virüslere standart sıvı kültür ortamı altında plak tahlili yapılabilir çünkü bu virüslerin direkt hücre-hücre dağılımı lokalize plakların oluşmasını sağlar. Fakat, influenza gibi birçok virüs sıvı ortamda lokalize plaklar oluşturmaz. Bunun nedeni, bu virüslerin enfekte ettikleri hücrelerden etkili bir şekilde ayrışması ve kültür kaplarındaki sıcaklık gradyanlarından kaynaklanan sıvı ortamın konveksiyonel akışı ile hücre tabakası üzerinde yayılmasıdır. Bu durumda, enfekte hücrelerin büyük pürüzlü odakları oluşur ve bu da sayılamaz. Kültür kaplarında sıvı hareketini önlemek ve viral yayılımı kontrol etmek için özel kaplama maddeleri kullanılır. En yaygın yöntem, kültür ortamını bir agar (veya agaroz) jel ile katılaştırmaktır. Bununla birlikte, katı jel kaplamalar, yüksek verimli analizler için gerekli olan 48 ve 96 gözlü kültür plakalarında kullanılamaz. Katı jellere alternatif olarak, çözünebilir hidrofilik polimerler, metilselüloz (MC), karboksimetilselüloz, kitre sakızı vb. gibi viskoz çözeltileri kullanılabilir, Maramorosh ve ark. (29).

Bu çalışmada plak oluşumunda kullanılan kaplamaların önemini test etmiş olduk. Ayrıca literatüre baktığımızda influenzanın H1N1 suşuna ait bu tarz bir çalışmaya rastlamamıştır. Agar kaplamanın kullanıldığı plakalarda hücreler sıcaklığa olan duyarlılığı sebebi ile öldükleri için enfeksiyon hiç gözlenemedi. Fakat farklı iki polimer kaplama olarak test edildiğinde her iki polimerinde plak testinde iyi bir şekilde çalıştığını gördük. CMC kaplama ortamına kıyasla, Avicel içeren ortamda önemli ölçüde daha büyük plaklar oluştu. Plak boyutu Avicel konsantrasyonunda azalma ile arttı, çok seyreltilmiş Avicel kaplamaları bile lokalize plak oluşumunu sağladı. Bu sebeple, düşük viskoziteye sahip oldukları için Avicel kaplamaları, özellikle 96 oyuklu kültür plakalarında metilselüloz kaplamalara göre daha kolay kullanılabilir. Üstelik, Avicel kaplaması virüs inokulumunun önceden çıkarılmasına gerek kalmadan uygulanabildiği için (CMC'nin aksine) deneyi kolaylaştırabilir ve çapraz kontaminasyon şansını azaltabilir. Avicel içeren kaplama ortamı altındaki plak testi, agar ve karboksimetilselüloz kaplamalar altındaki testlerden daha kolay uygulanmakta, daha hızlı ve daha duyarlı olduğu da deneylerle test edildi. CMC

kaplama kullanarak uygulanan testte plakların çok küçük oluşundan ötüü sayımı zor oldu. Deney, 96 oyuklu bir plaka formatında kolayca gerçekleştirilebilir ve yüksek verimli (high-throughput) virüs titrasyonları, serolojik çalışmalar ve viral ilaç hassasiyeti deneyleri için özellikle uygun gibi görünüyor. Ayrıca, biyogüvenlik laboratuvarlarının engelli koşullarında gerçekleştirilen yüksek patojen ajanlarla çalışmayı kolaylaştırabilir.

Virüs kültürlerinin kısa süreli depolanması için 4°C tatmin edicidir. Enfektivitenin yavaşlatılmış inaktivasyonu 4°C'de birkaç haftalık depolama sonucu meydana gelir, Webster ve ark. (64). Uzun vadeli depolama için virüs kültürleri -70 ° C'de saklanır.

Realtime PCR gibi moleküler testlerle influenzanın teşhisi, deneyimli olmayan personel tarafından yapılmamalıdır. Bu tahliller için kullanılan özel ekipmanın çalışması için eğitim gereklidir. İnfluenza türü veya alt tipi için moleküler analizin özgüllüğü, primerler ve probların genomik hedefi tarafından belirlenir. Çoğu influenza A saptama tahlili matriks genini hedefleyen primer/prob kombinasyonlarını kullanırken alt sınıflama testleri genelde hemagglutinin genlerini hedef alır. İnfluenza testleri için çok sayıda primer ve prob sekansı hakemli literatürde yayınlanmıştır ve halka açıktır. Primer ve prob konsantrasyonları optimize edilmelidir ve reaktiflerin her bir lotunun, reaktivite için önceki parti ile karşılaştırarak kontrol edilmesi gerekir. Farklı master mix reaktifleri, testlerin optimizasyonu için tek tek primer / prob setleri ve PCR aletleri ile test edilmelidir.

Real-time RT-PCR'in sonuçları doğal olarak niceliksellik içerir, ve dolayısıyla, numunelerin mutlak bir şekilde nicelikleştirilmesi için, bir örnek ile çalışma sırasında titresini bilinen bir virüsün seri dilüsyonlarından yararlanarak standart bir eğri elde edilebilir ve karşılaştırma bu şekilde yapılır. Her bir virüs titresinin Ct değerleriyle olan korelasyonu, virüs izolatu ve hatta virüs hazırlanmasında (bozuk partiküller de dahil olmak üzere birçok faktöre bağlı olarak) aynı virüs izolatından RNA'nın kullanılması ve numunedeki virüsün standart eğri için türetildiği aynı stoktan optimum düzeyde kullanılması çok önemlidir. İki adımlı yöntemle yapılan bir RT-PCR reaksiyonunun çapraz bulaşma riski taşıması nedeniyle yalnızca bir adımlı RT-PCR reaksiyon prosedürü kullanılması bu sebepten ötürü önerilmektedir. Enzim miktarının, siklus koşullarının ve diğer bileşenlerin optimizasyonu gerekmektedir.

Tüm RT-PCR kitleri kabul edilebilir bir performans sunmaz ve 5 'ekzonükleaz aktivitesine sahip bir polimeraz içermelidir. Smart Cycler II ve AB 7500 Fast için önerilen boyalar FAM (6-karboksifloresensin) ve BHQ-1 (BlackHoleQuencher-1) olup çoğu aletle uyumludur. Farklı realtime PCR enstrümanı kullanılıyorsa, alternatif boyaların kullanılması gerekip gerekmediğini kontrol edilmelidir. Pozitif kontrol RNA, belirli bir döngü eşiği değerine sahip olacak şekilde seyreltilmiş bütün virüs RNA'sı olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol RNA'sı genellikle eşik değeri 21-29 arasında bir döngü ile kalibre edilmesi yeterlidir. Pozitif kontrol, beklenenden daha yüksek veya düşükse, reaksiyonlarla ilgili olası bir problem araştırılmalıdır. Ancak varyasyonda 1-2 döngü daha görmek nadirdir.

İnfluenza A virüsü genomu (~ 13.5 kb) 0.89 ila 2.3 kb büyüklüğünde ve 11 proteine kadar kodlayan sekiz negatif anlamda vRNA'dan oluşur, Knipe ve ark. (65). Grip A virüsü teşhisi, biyoenformatik/genomik analiz, temel araştırma ve tersine genetik ile aşı oluşturulması, çeşitli moleküler viroloji teknikleriyle kolaylaştırılmıştır. Bu teknikler, yüksek kaliteli vRNA'nın saflaştırılmasını, vRNA'ları dsDNA'lara dönüştüren ve dsDNA'yı çoğaltan RT-PCR prosedürleri, çeşitli downstream uygulamalar için RTPCR amplikonlarını klonlamak (örn. Sekanslama, protein ekspresyonu veya tersine genetik), ve hızlı nükleotid sekans analizini mümkün kılan yöntemlerdir. RTPCR amplifikasyonu ve/veya spesifik bir vRNA'nın veya bir vRNA içindeki küçük bölgelerin saptanması için bir takım bol yaklaşımlar geliştirilmiş olmasına rağmen, Influenza A virüsleri arasında bulunan geniş dizi çeşitliliği, viral genomu oluşturan sekiz vRNA'nın tam uzunluktaki amplifikasyonu için tek bir yöntem geliştirilmesini engellemektedir. Tek reaksiyonlu genomik amplifikasyon, Adeyefa ve ark. (66), Wang ve ark. (67) veya tersine genetik plazmidlerine hızlı klonlama için birkaç yaklaşım geliştirilmiştir, Hoffmann ve ark. (68), Stech ve ark. (69). Bu güçlü teknikler, Adeyefa ve ark. (66), Stech ve ark. (69), geliştirilmiş influenza A virüsü vRNA amplifikasyonu, klonlama ve tersine genetiğe sahip önemli ilerlemeleri temsil eder; bununla birlikte, her birinin, birçok farklı oligonükleotid primerini çoğaltmaya ihtiyacı vardır veya en az sekiz ayrı RT-PCR reaksiyonu kabı gerektirmektedir. Tek bir RT-PCR reaksiyonunda (Multisegment-RT-PCR) herhangi bir influenza A virüsünün tüm genomunun amplifikasyonunu mümkün kılan teknikler ve bu amplikonların nükleotid dizilimi için veya ticari olarak temin

edilebilen plazmidlere klonlanması için kullanımı, veya modifiye edilmiş tersine genetik plazmidleri kullanarak hızlı bir şekilde rekombinant influenza virüsleri yaratılabilmesi hakkında bilgi edinmek için bu makale okunmalıdır, Zhou ve ark. (70).

Tüm İnfluenza virüs örnekleri üzerindeki laboratuvar çalışmaları bir BSL3 laboratuvarı içerisinde yapılmıştır ve tüm örnek manipülasyonları biyogüvenlik kabini içerisinde yapılmıştır, BMBL (71), de bu şekilde önermektedir. Moleküler test için, numune alikotu numunede bulunan herhangi bir virüsü etkisiz hale getirmek için lizis tamponuna aktarılıp daha sonra kabin dışına çıkarılmalıdır. Yüksek patojen özellikte olan kuş gribi gibi şüphelenilen yeni influenza olgularından alınan numuneler için ilave olarak yüksek seviyede koruma ve önlem alınmalıdır ve laboratuvar bu patojen ile çalışmaya uygun bir ruhsat verilmedikçe virüs kültürü bu tür numunelerle yapılmamalıdır.

8. SONUÇLAR

Yapılan testler sonucunda;

-Plak Testinde her bir plaktaki mililitredeki PFU belirlemek için;

PFU/mL= Plak Sayısı x Dilüsyon x 10 formülü ile bulundu.

= 200µl'de 2 plak yani 1mL'de 10 plak oluştu. 10×10^{-5}

=1.000.000pfu/mL

-Hemaglutinasyon Testinde 1HAU= 16'dır.

-Realtime RT-PCR'da ct=10'dur.

Çoklu metodların aynı anda virüs örneğinin miktar ve kalite tayininde kullanılması çalışmaların devamının kalitesi için çok önemlidir. Tekrarlanan deneyler sonucunda optimize edilen yöntemlerle aynı korelasyona ulaştık. Bu da yukarıda sonuçları belirtilen üç testte gösterilmiştir. Yedi pasajlama sonucu elde edilen virüs bu değerleri vermektedir.

Tüm bu testler çoğaltılan virüsün 7. Pasajının 1mL'lik alikotlarıyla defalarca test edilmiştir. Hemagglutinasyon ünitesi 16 olarak hesaplanmış bundan sonraki tanımlama testi olan inhibisyon testinde bu değer kullanılarak serum içerisindeki ne kadar miktar antikorun aglutinasyonu engelleyebildiği çalışmaları yapılabilir. Real-time RT-PCR testi elde ne kadar virüs patikülü mevcut enfeksiyöz yada non-enfeksiyöz bize net sonuç verdi. Elimizdeki virüs süspansiyonuna ait her alikotta enfeksiyöz virüs miktarını doğruladık.

Şu zamana kadar Aşı Teknolojileri Laboratuvarı ve BSL-3 imkanları dahilinde virüs titrasyonunu artırma odaklı olarak dokuz pasaja kadar çalışmalar sürdürüldü. Bu tezde 7. Pasaj sadece çalışıldı. Anlamlı sonuçlar alabilmek için daha kapsamlı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu çalışmalar elde edilen dokuz pasajın her birinin üç farklı testle çalışılarak standart sapma ve logaritmik eğrilerinin hesaplanmasını içerir. İmkan dahilinde bu konuda çalışmayı doktora tezime için düşünmekteyim

9. KAYNAKLAR

- 1) Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y. (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 56, 152–79.
- 2) Swayne, D.E. and Suarez, D.L. (2000) Highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech.* 19, 463–82.
- 3) Smith, G.J., Bahl, J., Vijaykrishna, D., Zhang, J., Poon, L.L., Chen, H., Webster, R.G., Peiris, J.S., Guan, Y. (2009) Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106, 11709–12.
- 4) Garten, R.J., Davis, C.T., Russell, C.A., Shu, B., Lindstrom, S., et al. (2009) Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science.* 325, 197–201.
- 5) Dotis J, Roilides E. H1N1 Influenza A infection. *Hippokratia.* 2009;13(3):135-138.
- 6) Leo L.M. Poon, K.H. Chan, G.J. Smith, C.S.W. Leung, Y. Guan, K.Y. Yuen, J.S.M. Peirs *Clinical Chemistry* Aug 2009, 55 (8) 1555-1558.
- 7) WHO (World Health Organization). *Assessing the Severity of an Influenza Pandemic.* World Health Organization, Geneva, Switzerland (2009).
- 8) Dawood FS, Jain S, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med.* 2009;360:2605-2615.
- 9) Egawa Y, Ohfuji S, Fukushima W, et al. Immunogenicity of influenza A(H1N1)pdm09 vaccine in patients with diabetes mellitus: With special reference to age, body mass index, and HbA1c. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 2014;10(5):1187-1194.
- 10) The plaque assay of animal viruses. In *Methods in Virology Volume III.* Edited by Maramorosch K, Koprowski H. N.Y and London, Academic Press; 1967:243-311.

- 11) World Health Organization. CDC protocol of real-time RT-PCR for swine influenza A(H1N1). Available at: www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimeRTPCRprotocol_20090428.pdf. Accessed May 5, 2009.
- 12) Pabbaraju K, Wong S, Wong AA, et al. Design and validation of real-time reverse transcription-PCR assays for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3454-3460.
- 13) Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22(130–1):134–138
- 14) By Arne Moeller, Robert N. Kirchdoerfer, Clinton S. Potter, Bridget Carragher, Ian A. Wilson *Science* 21 Dec 2012 : 1631-1634
- 15) Swayne DE, Halvorson DA (2003) Influenza. In: Saif YM, Barnes HJ, Gilsson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE (eds) *Diseases of poultry*, 11th edn. Iowa State University Press, Ames, IA, pp 135–155
- 16) Ito T, Kawaoka Y(2000) Host-range barrier of influenza A viruses. *Vet Microbiol* 74: 71–5.
- 17) Tobita, K., Sugiura, A., Enomote, C., Furuyama, M. (1975) Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med Microbiol Immunol.* 162, 9–14.
- 18) Klenk, H.D., Rott, R., Orlich, M., Blödorn, J. (1975) Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology.* 68, 426–39.
- 19) Forrest, H.L. and Webster, R.G. (2010) Perspectives on influenza evolution and the role of research. *Anim Health Res Rev.* 11 , 3–18.
- 20) Hirst, G.K. (1941) Agglutination of red cells by amniotic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science* 94, 22–23.

- 21) Grimes S (2002) A basic laboratory manual for the small-scale production and testing of I-2 newcastle disease vaccine. FAO & APHCA. <http://www.fao.org/docrep/005/AC802E/ac802e00.htm> . Accessed 2 June 2013
- 22) Webster RG, Cox N, Stöhr K (2002) WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdsesrnscs20025_rev.pdf. Accessed 11 Jul 2005
- 23) Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM (2004) Virus cultivation, detection, and genetics. In: Flint SJ (ed) Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses, 2nd edn. ASM
- 24) Swayne DE, Senne DA, Beard CW (1998) Avian influenza. In: Dufour-Zavala L (ed) A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th edn. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, pp 128–134
- 25) Barrett T, Inglis SC (1985) Growth, purification and titration of influenza viruses. In: Mahy BWJ (ed) Virology: a practical approach. IRL, Washington, DC, pp 119–150
- 26) World Animal Health Organization (OIE) (2012) Avian influenza. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf. Accessed 1 June 2013
- 27) Tobita, K., A. Sugiura, C. Enomoto, and M. Furuyama. (1975) Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med. Micro. Immuno.* 162, 9–14.
- 28) Tobita, K. (1975) Permanent canine kidney (MDCK) cells for isolation and plaque assay of influenza B viruses. *Med. Micro. Immuno.* 162, 23–7.
- 29) Cooper PD: The plaque assay of animal viruses. In *Methods in Virology*. Volume III. Edited by: Maramorosch K, Koprowski H. N.Y and London, Academic Press; 1967:243-311.

- 30) Matrosovich M, Matrosovich T, Carr J, Roberts NA, Klenk H-D: Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J Virol* 2003, **77**: 8418-8425. 10.1128/JVI.77.15.8418-8425.2003
- 31) Palese P, Shaw M(2007) Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1647–89.
- 32) FMC Biopolymer website. Avicel RC/CL [<http://www.fmcbiopolymer.com/Pharmaceuticals/Products/AvicelRCCL/tabid/574/Default.aspx>]
- 33) Gambaryan AS, Matrosovich MN, Bender CA, Kilbourne ED: Differences in the biological phenotype of low-yielding (L) and high-yielding (H) variants of swine influenza virus A/NJ/11/76 are associated with their different receptor-binding activity. *Virology* 1998, **247**: 223-231. 10.1006/viro.1998.9274
- 34) 64630 Methylcellulose, highly viscose (Methocel[®]MC). Sigma-Aldrich website [http://www.sigmaaldrich.com/fluka/product%20information%20sheet/64630_data_sheet_116kb.pdf]
- 35) Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL (2002) Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* **40**:3256–3260
- 36) Spackman E, Suarez DL (2005) Use of a novel virus inactivation method for a multicenter avian influenza real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction proficiency study. *J Vet Diagn Invest* **17**:76–80
- 37) Akey BL (2003) Low-pathogenicity H7N2 avian influenza outbreak in Virginia during 2002. *Avian Dis* **47**:1099–1103
- 38) Cattoli G, Drago A, Maniero S, Toffan A, Bertoli E, Fassina S, Terregino C, Robbi C, Vicenzoni G, Capua I (2004) Comparison of three rapid detection systems

for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. *Avian Pathol* 33:432–43.

39) Slomka MJ, Densham AL, Coward VJ, Essen S, Brookes SM, Irvine RM, Spackman E, Ridgeon J, Gardner R, Hanna A, Suarez DL, Brown IH (2010) Real time reverse transcription (RRT) polymerase chain reaction (PCR) methods for detection of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus and European swine influenza A virus infections in pigs. *Influenza Other Respi Viruses* 4:277–293.

40) Lee CW, Suarez DL (2004) Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. *J Virol Methods* 119:151–158.

41) Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5′–3′ exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7276–7280

42) Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y (2007) Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer, Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1691–1740.

43) Kim LM, Afonso CL, Suarez DL (2006) Effect of probe-site mismatches on detection of virulent newcastle disease viruses using a fusion- gene real-time reverse transcription polymerase chain reaction test. *J Vet Diagn Invest* 18:519–528

44) Burnet, F.M. (1936) Influenza virus on the developing egg. I. Changes associated with the development of an egg-passaged strain of virus. *Br J Exp Pathol.* 17, 282–293.

45) Rogers, G.N. and Paulson, J.C. (1983) Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology.* 127, 361–73.

46) Ito, T., Suzuki, Y., Takada, A., Kawamoto, A., Otsuki, K., Masuda, H., Yamada, M., Suzuki, T., Kida, H., Kawaoka, Y. (1997) Differences in sialic acid-galactose

linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection. *J Virol.* 71, 3357–62.

47) Sriwilaijaroen, N., Kondo, S., Yagi, H., Wilairat, P., Hiramatsu, H., Ito, M., Ito, Y., Kato, K., Suzuki, Y. (2009) Analysis of N-glycans in embryonated chicken egg chorioallantoic and amniotic cells responsible for binding and adaptation of human and avian influenza viruses. *Glycoconj J.* 26, 433–43.

48) Xu, Q., Wang, W., Cheng, X., Zengel, J., Jin, H. (2010) Influenza H1N1 A/Solomon Island/3/06 virus receptor binding specificity correlates with virus pathogenicity, antigenicity, and immunogenicity in ferrets. *J Virol.* 84, 4936–45.

49) Tobita, K., Sugiura, A., Enomote, C., Furuyama, M. (1975) Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med Microbiol Immunol.* 162, 9–14.

50) Matrosovich, M., Matrosovich, T., Carr, J., Roberts, N.A., Klenk, H.D. (2003) Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J Virol.* 77, 8418–25.

51) Fallaux, F.J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D.J., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S.J., van Ormondt, H., van der Eb, A.J., Valerio, D., Hoeben, R.C. (1998) New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther.* 9, 1909–17.

52) Klenk, H.D., Rott, R., Orlich, M., Blödorn, J. (1975) Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology.* 68, 426–39.

54) Forrest, H.L. and Webster, R.G. (2010) Perspectives on influenza evolution and the role of research. *Anim Health Res Rev.* 11, 3–18.

55) Morishita, T., Nobusawa, E., Nakajima, K., Nakajima, S. (1996) Studies on the molecular basis for loss of the ability of recent influenza A (H1N1) virus strains to agglutinate chicken erythrocytes. *J Gen Virol.* 77, 2499–506.

- 56) Louisirirotchanakul, S., Lerdsamran, H., Wiriyarat, W., Sangsiriwut, K., Chaichoune, K., Pooruk, P., Songserm, T., Kitphati, R., Sawanpanyalert, P., Komoltri, C., Auewarakul, P., Puthavathana, P. (2007) Erythrocyte binding preference of avian influenza H5N1 viruses. *Clin Microbiol.* 45, 2284–6.
- 57) Hirst, G.K. (1941) Agglutination of red cells by amniotic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science* 94, 22–23.
- 58) Miller, G.L. and W.M. Stanley. (1944) Quantitative aspects of the red blood cell agglutination test for influenza virus. *J. Exp. Med.* 79, 185–95.
- 59) Miller, G.L. (1965) Improved measurement of influenza virus hemagglutinin titer. *J. of Immuno.* 95, 336–344.
- 60) Medeiros, R. N. Escriou, N. Naffakh, JC Manuguerra and S. Van der Werf. (2001). Hemagglutination residues of recent human A (H3N2) influenza viruses that contribute to the inability to agglutinate chicken erythrocytes. *Virology.* 289, 74–85.
- 61) Reed, L.J. and H. Muench. (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27, 493–497.
- 62) Tobita, K., A. Sugiura, C. Enomoto, and M. Furuyama. (1975) Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of canine kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med. Micro. Immuno.* 162, 9–14.
- 63) Tobita, K. (1975) Permanent canine kidney (MDCK) cells for isolation and plaque assay of influenza B viruses. *Med. Micro. Immuno.* 162, 23–7.
- 64) Webster, R.G., Yakhno, M., Hinshaw, V.S., Bean, W.J., Murti, K.G. (1978) Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology.* 84, 268–78.
- 65) Palese, P. and M. L. Shaw. 2007. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication, p. 1647–1690. In: D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A.

Lamb, S. E. Straus, M. A. Martin, and B. Roizman (eds.), *Fields Virology*. 5 ed., vol. 2. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.

66) Adeyefa, C. A., K. Quayle, and J. W. McCauley. 1994. A rapid method for the analysis of influenza virus genes: application to the reassortment of equine influenza virus genes. *Virus Res.* 32:391–399.

67) Wang, S., Q. Liu, J. Pu, Y. Li, L. Keleta, Y. W. Hu, J. Liu, and E. G. Brown. 2008. Simplified recombinational approach for influenza A virus reverse genetics. *J.Virol.Methods*.

68) Hoffmann, E., J. Stech, Y. Guan, R. G. Webster, and D. R. Perez. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch.Virol.* 146:2275–2289.

69) Stech, J., O. Stech, A. Herwig, H. Altmeppen, J. Hundt, S. Gohrbandt, A. Kreibich, S. Weber, H. D. Klenk, and T. C. Mettenleiter. 2008. Rapid and reliable universal cloning of influenza A virus genes by target-primed plasmid amplification. *Nucleic Acids Res.* 36:e139.

70) Zhou, B., M. E. Donnelly, D. T. Scholes, K. St.George, M. Hatta, Y. Kawaoka, and D. E. Wentworth. 2009. Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. *J.Virol.* 83:10309–10313.

71) *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)* 5 th edition. Washington DC, United States Government Printing Office.

10. ETİK KURUL ONAYI

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: 10840098 – 142
Konu: Etik Kurul Kararı

17.12.2013

Sayın Dr.Deniz DURALI

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Tersine Genetik ve Sentetik Biyoloji Yöntemleri kullanılarak Hücre Temelli İnfluenza Prototip Aşı Geliştirilmesi" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurul kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan
Araştırmalar Etik Kurulu
Başkanı

EK:
-Karar Formu (2 sayfa)

Tel: (0216)680 53 00
Faks: (0212)531 75 55
E-mail: ilknurfil@medipol.edu.tr

Adres: Kavacık Mah.Ekinciler Cad.No:19,34810
Kavacık/BEYKOZ

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR
FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Tersine Genetik ve Sentetik Biyoloji Yöntemleri kullanılarak Hücre Temelli İnfluenza Prototip Aşı Geliştirilmesi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr.Deniz DURALI			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	TÜBİTAK-MAM			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	09.12.2013		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>		
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	09.12.2013		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>			
Karar Bilgileri	Karar No: 132		Tarih: 17.12.2013			
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.					

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Tangül MÜDOK	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Berna EREN	Halk Sağlığı	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Emir YÜZBAŞIOĞLU	Protetik Diş Tedavisi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Op. Dr. Muhammed Fatih EVCİMİK	Kulak-Burun Boğaz	Özel Nisa Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad/Soyad	Dilek DEMİRCAN
----------	----------------

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	İstanbul Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik	2014
Lisans	İstanbul Üniversitesi/ Biyoloji	2013
Lise	Karamürsel Alp Anadolu Lisesi	2009

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	62,5
-----	------

ALES Puanı	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
	70	68	70

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi
Knime Programı	İyi