

Virolojik Teşhis Yöntemleri

Dr.Öğr.Üyesi Engin BERBER

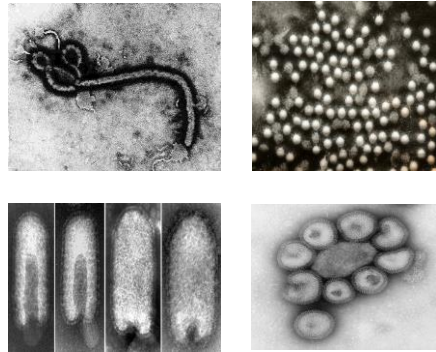


- Viral partikül tespiti
- Virüs izolasyonu/identifikasyonu
- Viral antijen tespiti
- Virüs spesifik antikor tespiti
- Viral nükleik asit tespiti

2

Viral Partikül Tespiti

- Elektron mikroskop



4

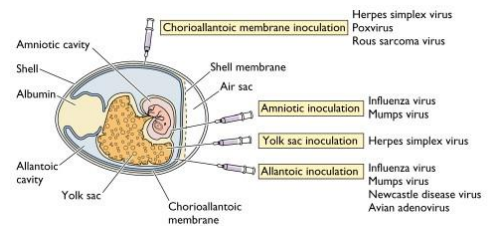
Virüs izolasyonu/identifikasyonu

- Hücre Kültür

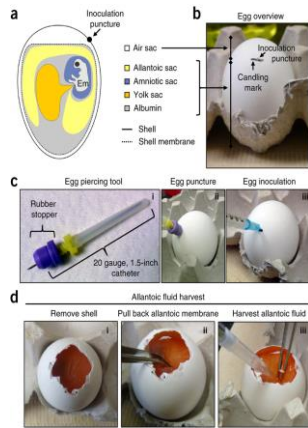


5

- Embriyolu tavuk yumurtası



6



• Denev havvanları



Viral Antijenlerin ve Viral Antikorların Saptanmasında Kullanılan Serolojik Yöntemler



- Klinik lerde yapılan ön tetkikler (anamnez, çeşitli klinik incelemeler, hematolojik, biyokimyasal, radyolojik, vs) hastalıkların belirlenmesinde ilk adımı oluşturması, laboratuvarında çalışanlara yardımcı olması, işlemleri kolaylaştırması ve yönlendirmesi bakımlarından çok değerli iseler de, yine de tanı için yeterli değildirler ve kesin çözümü sağlayacak olan laboratuvar muayenelerine gereksinim vardır

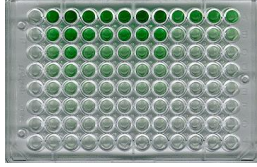
- **Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**
- İmmunfluoresans Antikor (IFA) Testi
- Hemaglutinasyon (HA) ve Hemaglutinasyon İnhibisyon (HI) Testi
- Radioimmünassay (RIA)
- Hemadsorbsiyon-İnhibisyon Testi
- Nötralizasyon Testi
- Lateks Aglutinasyonu
- Komplemant Fiksasyon (KF) Testi
- Agar Gel İmmundifusyon (AGID)
- İmmunperoksidaz Testi

1.ELISA

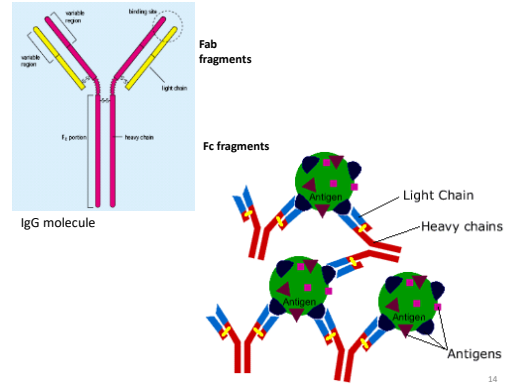
Enzyme Linked Immunosorbent Assay

- Çok yaygın olarak kullanılır
- Çok duyarlı ve spesifik bir testtir
- Bir antijene karşı üretilen antikorun veya şüpheli antijenin varlığını göstermeye yönelik bir tekniktir
- Antijen – Antikor reaksiyonuna dayanır
- Bu yöntemle şüpheli örnekten;
 - Bilinen antikor varlığında antijen
 - Bilinen antijen varlığında da antikor saptanabilir

- Antijen-antikor bağlanmasını takiben, enzim işaretli bir antikorun ortama ilavesi sonucunda reaksiyonun renkli ürünlere dönüştürülerek değerlendirilmesi esasına dayalı immünokimyasal ölçüm tekniğidir
- Bu test için 96 kuyucuklu özel plateler kullanılır



13



14

ELISA Metodları

- **İndirekt yöntem; Antikor aramada**
- **Direkt-sandviç yöntem; Antijen aramada**

Antijen belirleme yöntemi

Direkt ELISA (sandviç yöntemi);

- Antijene özgü antikor plate bağlanır

Bir gece +4°C'de bekletilir
Ertesi sabah yıkama yapılır

- Antijen aranan örnek eklenir.

1 saat 37°C'de inkübe edilir

- Üzerine enzim ile işaretlenmiş spesifik antikor eklenir.

1 saat 37°C'de inkübe edilir

- substrat eklenir

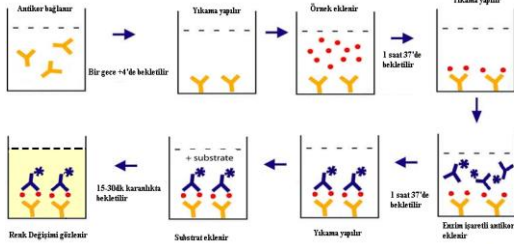
15-30dk karanlıkta bekletilir

- Renk değişimi gözlenen kuyucuklar pozitif ve negatif kontrollerle karşılaştırılarak değerlendirilir.
- ELISA Reader ile test sonucu alınır

15

16

Direkt-Sandviç ELISA



17

Antikor belirleme yöntemi

İndirekt yöntem ;

- Bilinen antijen plate bağlanır

Bir gece +4°C'de bekletilir
Ertesi sabah yıkama yapılır

- Antikor aranan örnek eklenir.

1 saat 37°C'de inkübe edilir

- Enzim ile işaretli sekonder antikor eklenir.

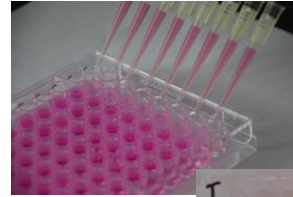
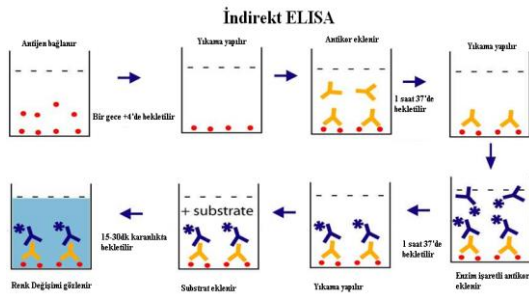
1 saat 37°C'de inkübe edilir

- substrat eklenir

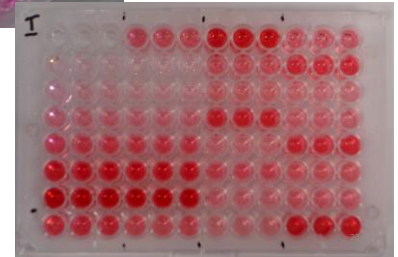
15-30dk karanlıkta bekletilir

- Renk değişimi gözlenen kuyucuklar pozitif ve negatif kontrollerle karşılaştırılarak değerlendirilir.
- ELISA Reader ile test sonucu alınır

18

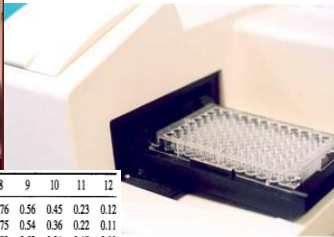


Sonucun değerlendirilmesi



ELISA
Reader

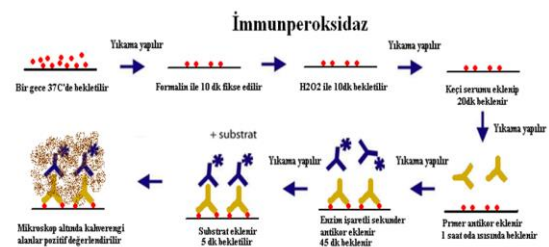
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.67	0.96	1.34	1.35	1.32	1.11	0.98	0.76	0.56	0.45	0.23	0.11
B	0.68	0.99	1.42	1.37	1.29	1.09	0.89	0.75	0.54	0.36	0.22	0.11
C	0.65	0.98	1.36	1.34	1.15	0.99	0.87	0.72	0.52	0.31	0.17	0.09
D	0.56	0.88	1.23	1.19	1.01	0.88	0.74	0.65	0.43	0.26	0.14	0.07
E	0.45	0.67	1.00	1.09	0.98	0.78	0.56	0.45	0.34	0.21	0.12	0.07
F	0.23	0.43	0.78	0.76	0.56	0.45	0.40	0.33	0.23	0.16	0.12	0.09
G	0.15	0.23	0.34	0.35	0.21	0.15	0.16	0.09	0.08	0.07	0.09	0.09
H	0.15	0.19	0.18	0.17	0.16	0.10	0.09	0.08	0.09	0.07	0.07	0.07

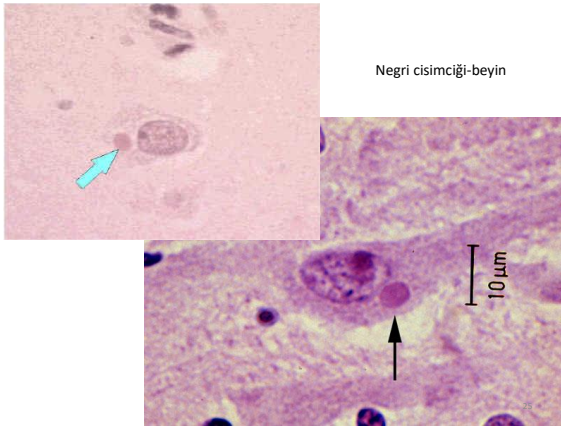


2.İmmunperoksidaz

- ELISA'da olduğu gibi Antijen-antikor reaksiyonuna dayanır
- Dokularda bulunan antijen ve inklüzyon cisimciklerini belirlemede yararlanır.
- Mikroskop altında reaksiyon gösteren alanların renk değişimi ile sonuç değerlendirilir

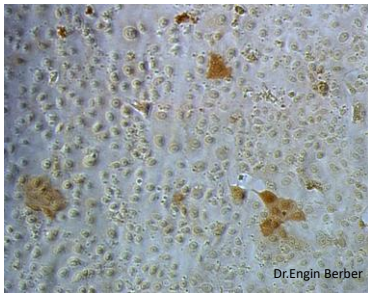
- Antijen aranan doku kesiti lam üzerine bağlanır
Yıkama yapılır
- Formalin ile fiksle edilir
- Hidrojen Peroksit eklenir
Yıkama yapılır
- Keçi serumu ile bloklanır
Yıkama yapılır
- Primer antikor ilave edilir
Yıkama yapılır
- Enzim aşretli sekunder antikor ilave edilir
Yıkama yapılır
- Substrat ilave edilir
- Renk değişimi mikroskopta incelenir





- Direct
- Indirect

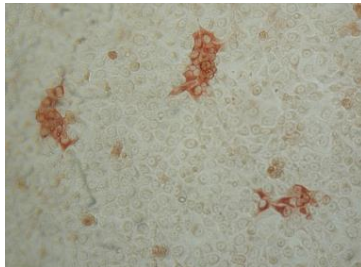
26



27



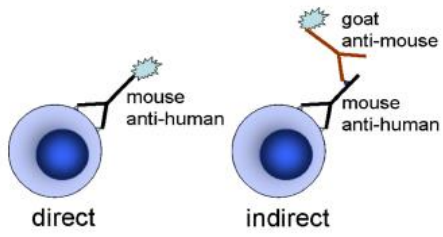
28



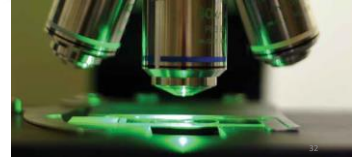
29

İmmunfloresan Test

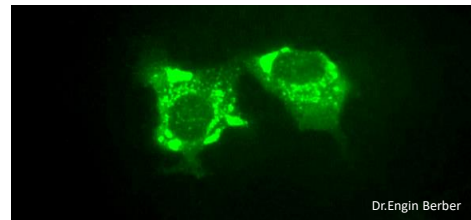
30



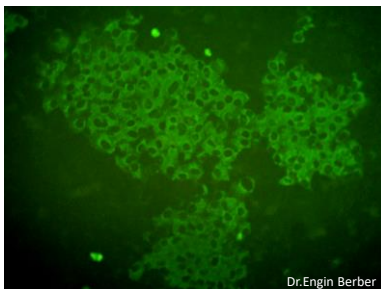
31



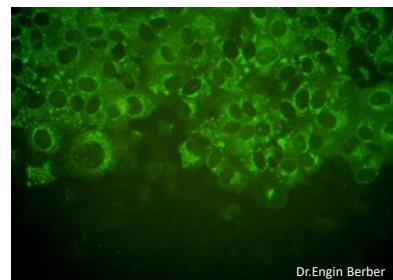
33



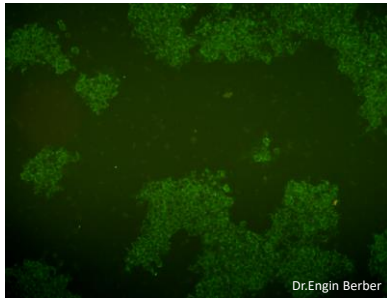
34



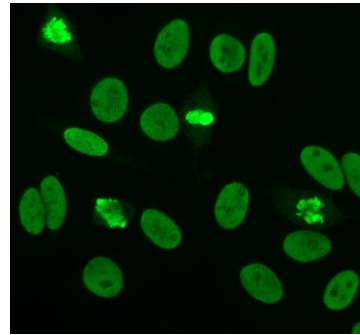
35



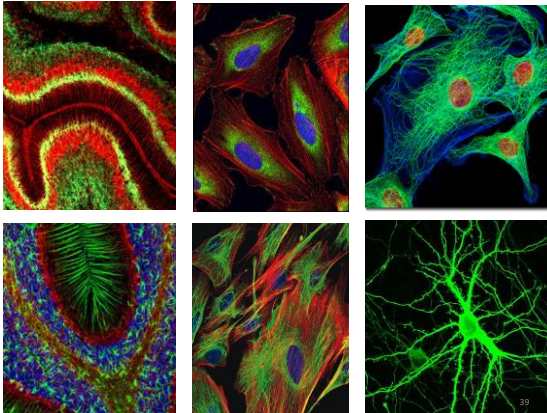
36



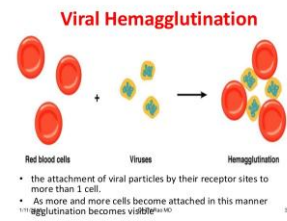
37



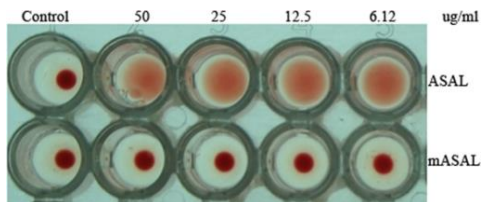
38



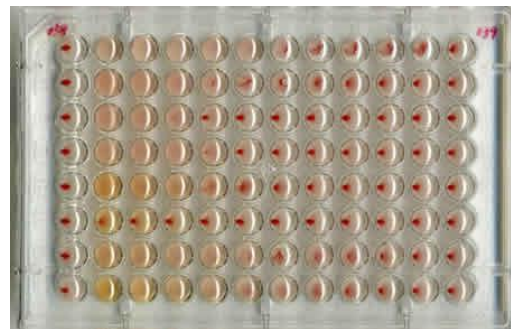
Hemagglutinyon Test (HA)



40

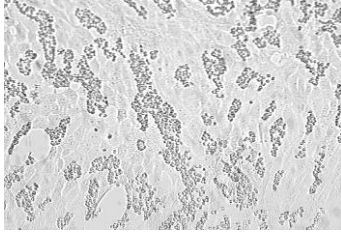


41



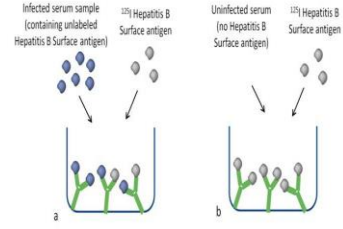
42

Hemadsorbsiyon (Had)



43

Radyoimmün Test (RIA)

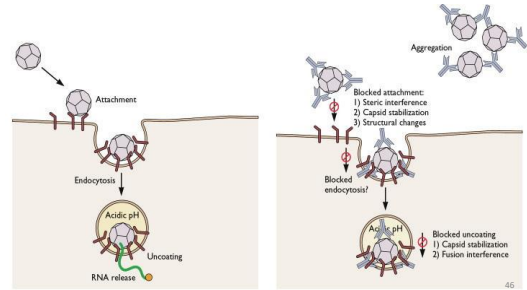


Diğer

- Reverz pasif hemaglutinasyon test (RPHA)
- Lateks Aglutinasyon

45

Virüs Spesifik Antikor Tespiti Nötralizasyon Testi



46

ELISA (indirekt)

Indirect ELISA

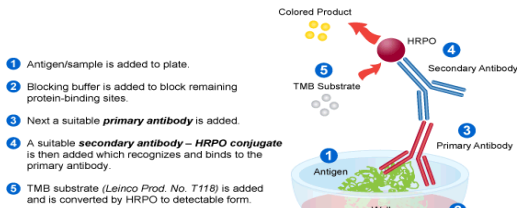
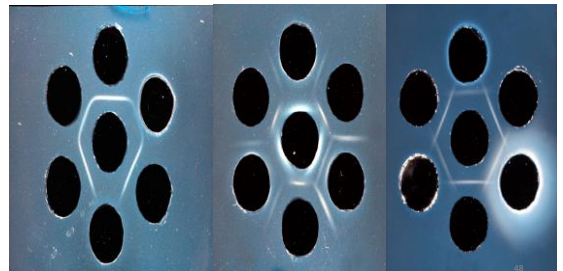


Diagram 1: Illustration of Indirect ELISA method.

47

Agar Jel İmmüdifüzyon



48

Western Blotlama Testi

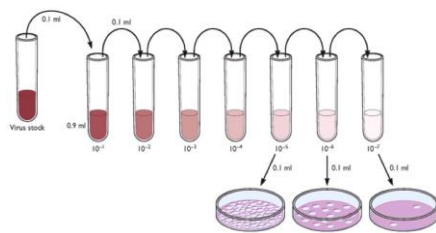
Plak redüksiyon testi

Hemaglütinasyon inhibisyon testi

Virüs Titrasyon Testleri/Virüs Quantification

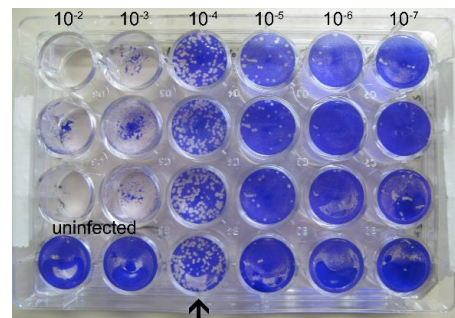
- Plak testi
- Focus Forming Assay (FFA)
- Endpoint dilüsyon testi

Plak testi



49

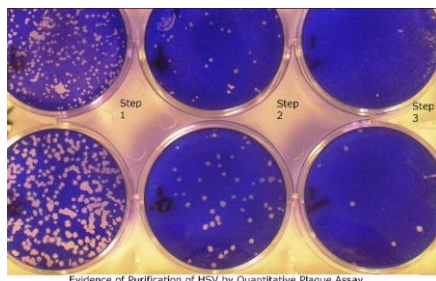
Plak testi



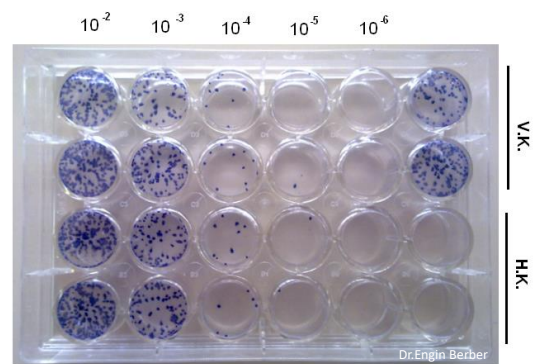
50

51

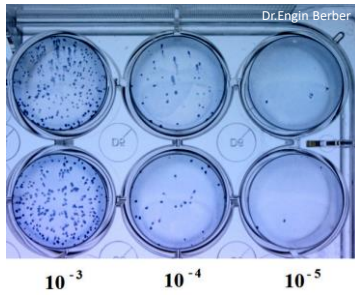
52



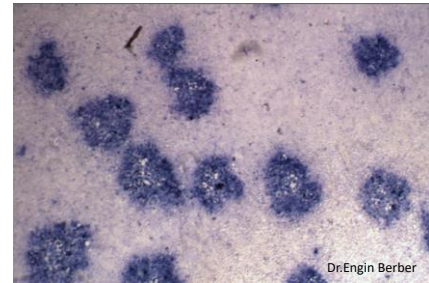
53



54



55

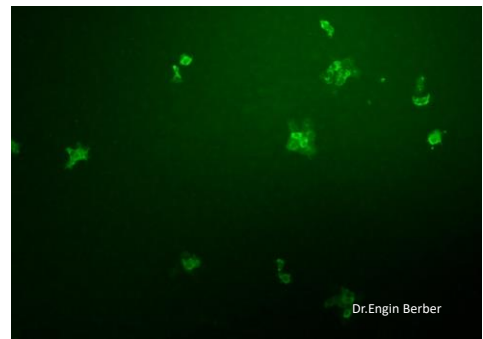


56

Focus Forming Assay (FFA)

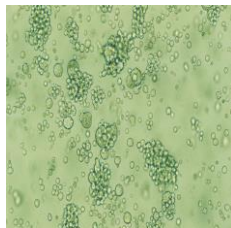
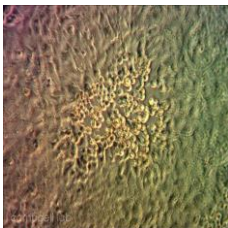


57

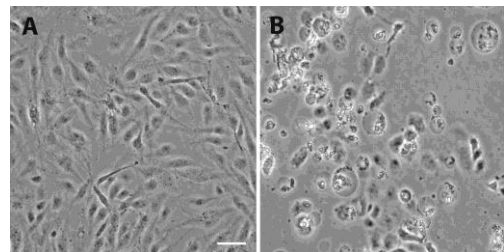


58

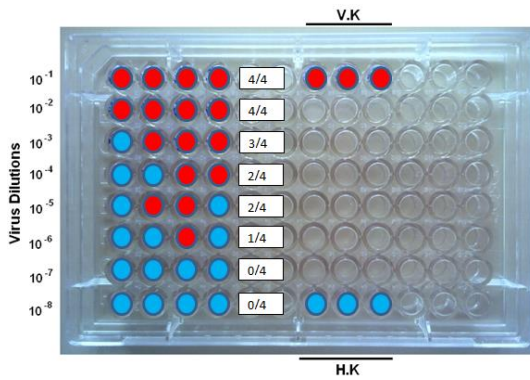
Endpoint dilüsyon testi



59



60



61

Virolojik Teşhis Yöntemleri

- ▶ Viral partikül tespiti
- ▶ Virüs izolasyonu/identifikasyonu
- ▶ Viral antijen tespiti
- ▶ Virüs spesifik antikor tespiti
- ▶ Viral nükleik asit tespiti



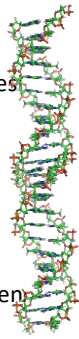
62



63

PCR ?

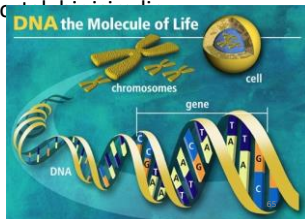
- Canlıları oluşturan genetik şifrenin çözülmesi
- Ortaya çıkarılan bu yapıdaki genlerin yerlerinin saptanması
- İşlevlerinin anlaşılması
gibi hedefler doğrultusunda çok hızlı ve güvenilir yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur
- geliştirilen bu yöntemlerin en önemlilerinden birisi **Polimeraz Zincir Reaksiyonu** ("Polymerase Chain Reaction", PCR)'dur



64

PCR

- DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan yöntemlere verilen isimdir



- PCR ile bir hedef DNA parçasından milyonlarca çoğaltmak mümkündür.
- PCR'ın en önemli özelliği çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır



65

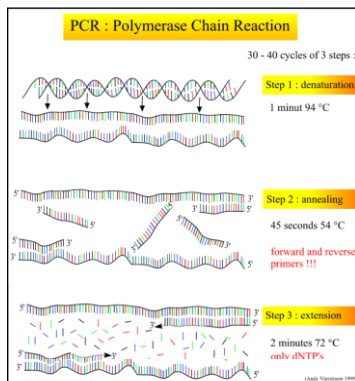
PCR kullanım alanları

- DNA örneklerinin çoğaltılması,
- Klinik örneklerde patojenlerin saptanması,
- Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısı,
- Klonlamada ve gen ekspresyon araştırmalarında,
- Adli tıpta,
- DNA dizi analizinde,
- Bilinmeyen dizilerin tayininde,
- Genetik parmak izlerinin tanımlanmasında

67

- Bir tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır.
- Bir çeşit "*in vitro* klonlama" olarak da tanımlanır
- Bir PCR döngüsü sırasıyla,
 - Deoksiribonükleik asidin (DNA) iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması "Denaturation" (94°C-98°C)
 - Sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması "Annealing" (37°C-65°C)
 - ve zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması "Extension" (72°C)
 aşamalarından oluşur ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır

68



69

- Bir PCR döngüsü için gerekli olan beş ana madde vardır:
 - DNA örneği, template DNA;
 - çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer;
 - deoksi-nükleotit-trifosfatlar (dNTP);
 - Yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi;
 - uygun pH ve iyon koşullarını (Mg+2) sağlayan tampon karışımı, MgCl2

70

- **Template DNA** amplifiye edilecek hedef DNA dır
- **Taq DNA polimeraz** DNA ikileşmesini sağlayan bir enzimdir.
- Bu enzimler bir DNA iplikçisini kalıp olarak kullanır, onu okuyup, onun boyunca deoksiribonükleotidlerin polimerizasyonunu katalizler.
- Taq DNA polimeraz sadece mevcut bir 3'-OH grubuna bir nükleotit ekleyebilir, ve dolayısıyla ilk nükleotidi ekleyebileceği bir başlatıcıya ("primer")e gerek duyar

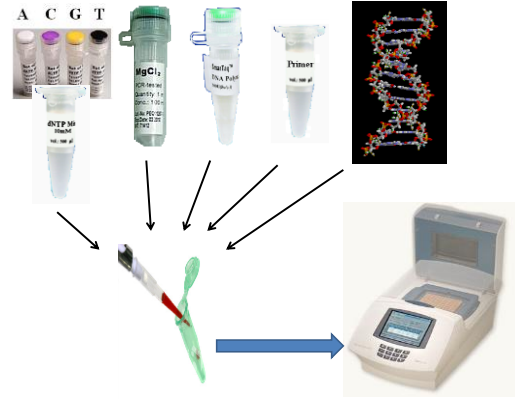
71

- **Primer** amplifiye edilecek DNA' ya bağlanacak olan bağlanma bölgesine komplementer yapıda kısa tek sarmal DNA molekülleridir.
- Primerler çiftler halinde biri çift zincir DNA' yı oluşturan zincirlerinden birine, diğeri de o zincirin komplementerine eşleşecek şekilde farklı dizilimlerde tasarlanır(F/R).
- Amplifikasyon için DNA dizisinin bilinmesi gerekli değildir. **Birleşme bölgelerinin dizisinin** bilinmesi yeterlidir.

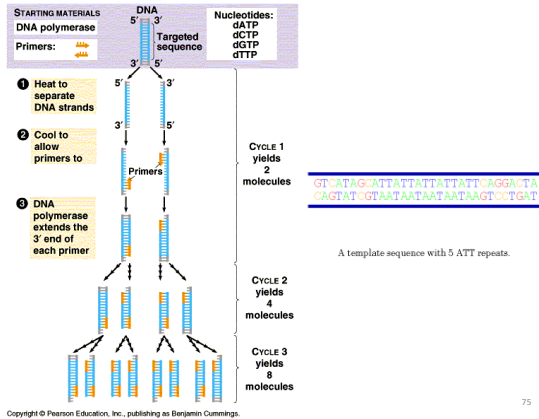
72

- **dNTP** Eşit konsantrasyondaki dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'nin karışımıdır.
- **MgCl₂** Taq DNA polimeraz enzimin çalışması için gerekli kofaktor olarak görev alan Mg iyonunu sağlar.
- **10X buffer:** Taq DNA polimeraz enzimin çalışması için gerekli stabil pH şartlarını sağlar. Reaksiyondaki son konsantrasyonu 1X olacak şekilde kullanılır.

73

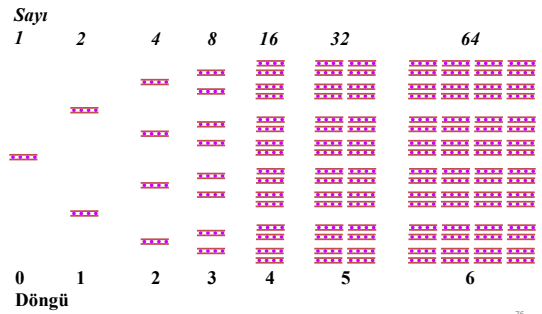


74

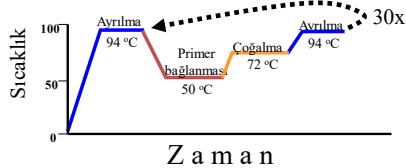


75

Her Bir Isı Döngüsünde Oluşan Kopya Sayısı



76



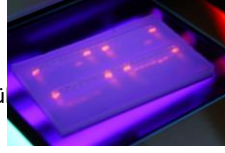
77

- Bir döngü sonucunda başlangıçta n olan DNA zincir sayısı $2n'$ e yükselir.
- Döngüler arka arkaya çok kez tekrarlanırken herbir döngünün ürünü, bir sonrakinde kalıp olarak kullanıldığı için her döngüde istenen DNA segmentinin miktarı 2 katına çıkar.

78

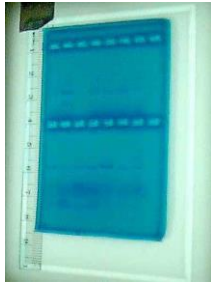
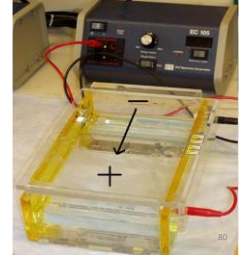
Görüntüleme

- PCR ile amplifiye edilen DNA elektroforez yöntemiyle görüntü
- Elektroforez: yüklü moleküllerin, bir elektriksel alan uyguladığında, sıvı içeren bir ortamda hareket hızlarının ölçüldüğü bir yöntemdir.
- DNA negatif yüklüdür. Bu nedenle anoda doğru hareket eder. Yükleme katod tarafına yapılmalıdır.
- DNA molekülleri büyüklüklerine göre ancak bir jel içinde ayrılabilirler.
- PCR reaksiyon hazırlama aşamasında pozitif ve negatif kontroller hazırlanır.
- DNA görüntüleme esnasında kotroller ve ağırlık marker ile sonuç değerlendirilir.



79

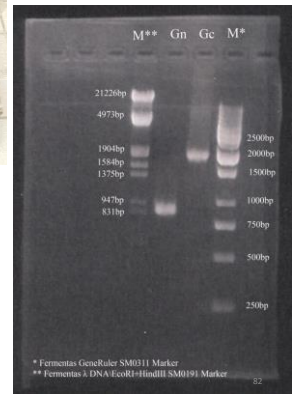
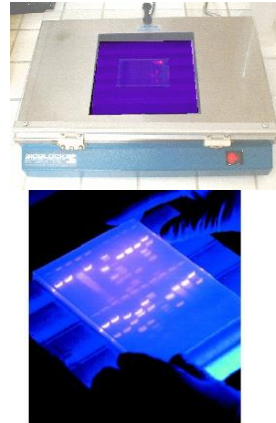
- DNA molekülleri genellikle agaroz jel içinde elektroforez edilir.
- Jellerin içerisinde DNA moleküllerinin girip hareket edebilecekleri porlar vardır.
- Elektroforez ile ayrılan DNA' yı görmek için ise DNA etidyum bromid ile boyanır (UV boya)



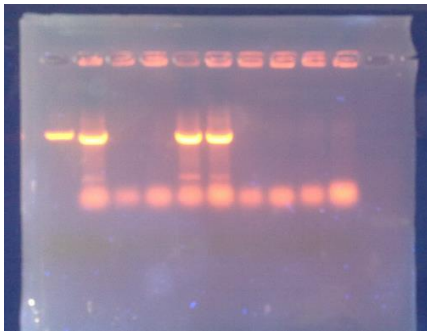
PCR ürünlerinin Agaroz jele yüklenmesi



81



82



83

PCR Metodları

1. KLASİK PCR:

Hedef DNA dizisinin her iki ucuna özgü spesifik primerler kullanılarak termostabil DNA polimeraz yardımıyla uygulanan PCR çeşididir.

- Daha sonraki analizler için döngü sayısına göre üstel oranda artan düzeyde ürün elde edilir.

84

2.Reverse Transcription (RT)-PCR:

- mRNA ve viral RNA gibi RNA hedef dizilerinin amplifikasyonu amacıyla kullanılır.
- Bu PCR çeşidinde bir reverse transkriptaz enzimi ve DNA primeri kullanılır
- RT-PCR için birkaç çeşit reverse transcriptase enzimi vardır.
- Bir veya iki aşamalı reaksiyon seçimi ve daha sonraki aplikasyonlara göre enzim karakteristiği seçilir.
- Bu seçimde RNase aktivitesinin olup olmaması , 85
ivon gerekliliği ve optimum çalışma ısısı gibi

3.MULTIPLEX PCR:

- Klasik veya Real-time PCR'nin modifikasyonu ile iki veya daha fazla farklı PCR amplifikasyonunun aynı reaksiyonda gerçekleştirilmesine dayanır.
- Klasik PCR ile aynı basamaklarda gerçekleşir fakat her bir reaksiyonda çoklu primer setleri kullanılır.
- Multiplex PCR ile daha az zamanda daha çok hedef bölge amplifikasyonu gerçekleştirildiğinden kullanışlı bir inceleme yöntemidir

4.NESTED PCR:

- PCR özgün olmayan ürünlerin oluşumunu engelleyen, yüksek özgünlükte bir PCR yöntemidir.
- Bu metod ; klasik PCR'ye farklı primer takımlarıyla ikinci bir amplifikasyon uygulamaktan ibarettir.
- Bu yöntemde ardarda iki PCR yapılır;
- İlk PCR özgün olmayan ürünlerin oluşumuyla sonuçlanır.
- İkinci PCR ise ilk PCR sonucu çoğaltılmış DNA'nın iç kısımlarına ait dizileri içeren 'nested' primerler ile yapılır.
- İlk PCR ürünleri ikinci PCR için kalıp olarak kullanılır ve istenilen hedef bölge çoğaltılarak özgün ürünler elde edilir. Böylece 'nested' PCR doğru ürünlerin çoğaltılması için kullanılır.

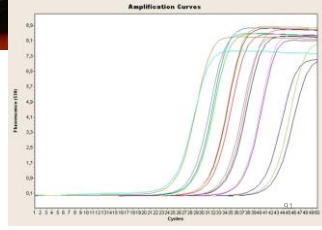
5.Anchore PCR

- Demirlenmiş ('anchored') PCR çoğaltılacak olan DNA'nın sadece bir bölgesinin (yani bir primer bölgesinin) bilindiği durumda uygulanır.
- Amaç bilinen bölgeden yararlanılarak ilgilenilen DNA parçasının çoğaltılmasıdır.

6.Real Time PCR

- Real-time PCR Reaksiyon esnasında her bir PCR siklüsünde yeterli miktarda ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışıp reaksiyonu aşama aşama sonuna kadar oluşan ürünü kontrol eden bir sistemdir.
- Işıma özelliğine sahip moleküller kullanarak PCR'ı oluşurken izleme ve miktar belirleme yöntemidir

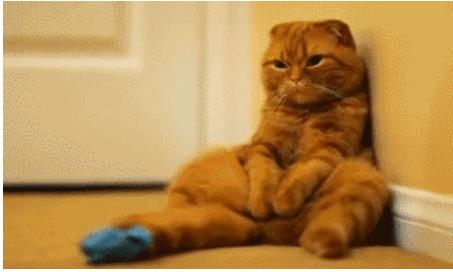
- Real-time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır.
- Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır.
- Real-time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problemlerden yararlanılmaktadır.



PCR YAPILIRKEN DİKKAT EDİLMESİ GEREKENLER

- PCR, tek bir molekül DNA'yi dahi çoğaltabileceğinden; reaksiyon karışımlarının DNA molekülleri ile **kontamine** olmasının engellenmesi gerekmektedir.
- Bu kontaminasyon; daha önceki PCR reaksiyonu veya diğer hücrel materyelden kaynaklanabilir
- PCR reaksiyonuna başlarken, temiz bir eldiven giyilir. Mümkünse eldivenler sık sık değiştirilir.
- PCR reaksiyonunda Negatif ve Pozitif kontroller mutlaka olmalıdır.

92



93