



KLİMİK 2017

XVIII. TÜRK KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
VE İNFEKSİYON HASTALIKLARI KONGRESİ

INFLUENZA A TANISINDA YENİ BİR YAKLAŞIM: M2e PEPTİDİNE SPESİFİK İGY ANTİKORLARININ KULLANIMI

Yasemin Budama Kılınç¹, Rabia Çakır Koç¹, Sevim Meşe², Selim
Badur^{2,3}

¹ Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, 34220, İstanbul

² İstanbul Üniversitesi, İst. Tıp Fak., Mikrobiyoloji ABD, Viroloji Bilim Dalı, İstanbul

³ GlaxoSmithKline, İstanbul

yaseminbudama@gmail.com

<http://bioeng.yildiz.edu.tr/asitani/index.html>

INFLUENZA A VİRÜSÜ

- Her yıl dünya nüfusunun %5 ile 20'sini etkiler,
- Binlerce insanın ölümüne sebep olur,
- Klinik teşhisinde, diğer solunum yolu hastalıklarıyla karıştırılması enfeksiyonla mücadelede dezavantaj

Hastalık riski olan bireylere hızlı ve doğru tanının konulması, enfeksiyonun kontrolünde büyük önem taşımaktadır!

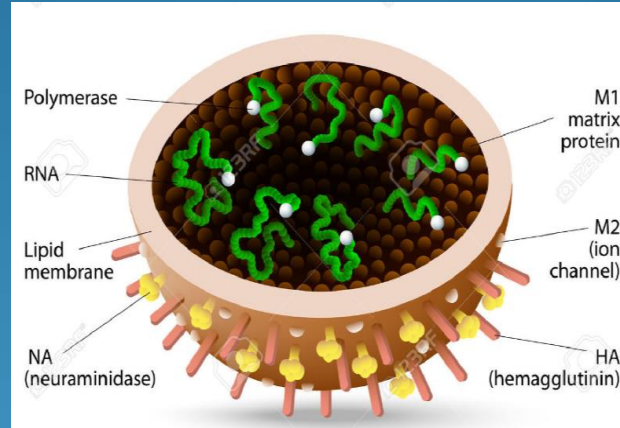


KLİMİK 2017

XVIII. TÜRK KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
VE İNFEKSİYON HASTALIKLARI KONGRESİ

Ancak virüsünün yapısında meydana
gelen değişimler hızlı ve doğru tanısına
yönelik yöntemlerin geliştirilmesini
zorlaştırmıştır.

M2e proteini normalde virüs partikülleri üzerinde düşük miktarda bulunmaktayken, virüsle enfekte hücre yüzeyinde oldukça bol miktarda salgılanmaktadır.



Virüsün oldukça iyi korunmuş M2 proteini dış bölgesinin (M2e) potansiyel tanı markırı olarak kullanılabileceği literatürde gösterilmiştir (Budama-Kılınç vd., 2016; Uttenthal vd., 2010; Lambrecht vd., 2007).



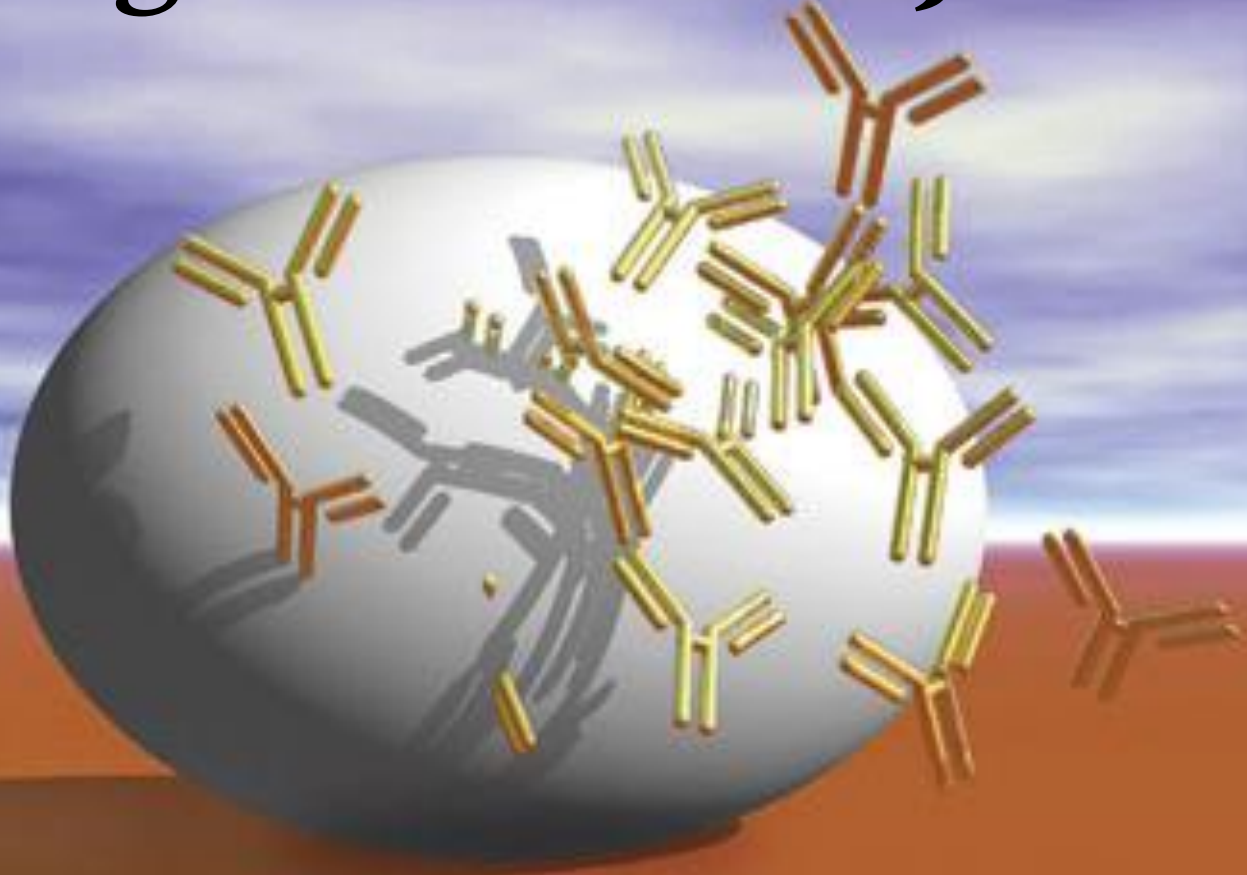
INFLUENZA A VİRÜSÜ İÇİN KULLANILAN TANI YÖNTEMLERİ



- Virüs kültürü
- Moleküler yöntemler
- Hızlı tanı testleri
- Serolojik yöntemler (IF, AGID, RIA, nötralizasyon, CFT, EIA, HI, ELISA)



IgY TEKNOLOJİSİ



➤ 1893 yılında, Klemperer ilk aşılanan tavukta oluşan spesifik antikorlar yumurta sarısına transferi olduğunu bildirilmiştir.



Memeli serumunda bulunan farklı tür antikorların aksine, tavuk yumurtasının sarısından çöktürme yöntemleriyle kolaylıkla izole edilebilen sadece tek tür antikor (IgY) bulunmaktadır.



FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

- İnsan vücudundaki fiziksel ortamlara karşı dayanıklıdır.
- 0-70°C gibi geniş bir aralıkta aktivitesini sürdürmektedir.
- 3,5-11,0 aralığındaki pH değerlerinde aktifliğini korumaktadır
- Vücut enzimlerinden tripsin ve kimotripsine dayanıklıdır.
- GRAS (Generally Recognised As Safe) belgesi alan IgY antikollarının insan üzerinde kullanılmasına FDA, USDA gibi otorite kuruluşlar da onay vermişlerdir.



IgY'nin AVANTAJLARI

- Memelilerden elde edilen antikorlara göre (örneğin tavşan) çok daha **düşük maliyetlerle** üretim (**gram başına 200 kat**)
- Tavuklar ile memeliler arasındaki filogenetik uzaklık, memeli proteinlerine karşı tavuklarda **yüksek korunumlu** antikorların üretimi
- Kanatlı antikorları ile çalışmak memeli serumu kaynaklı antikorlar ile çalışmaya göre daha **hijyenik, düşük maliyetli, kullanışlı ve yüksek miktarl**ı (**~1500mg/ay**) antikor kaynağı.
- IgY antikorlarının IgG antikorlarına göre antijene **afinitelerinin 3 ile 5 kat** daha fazla olması



KLİMİK 2017

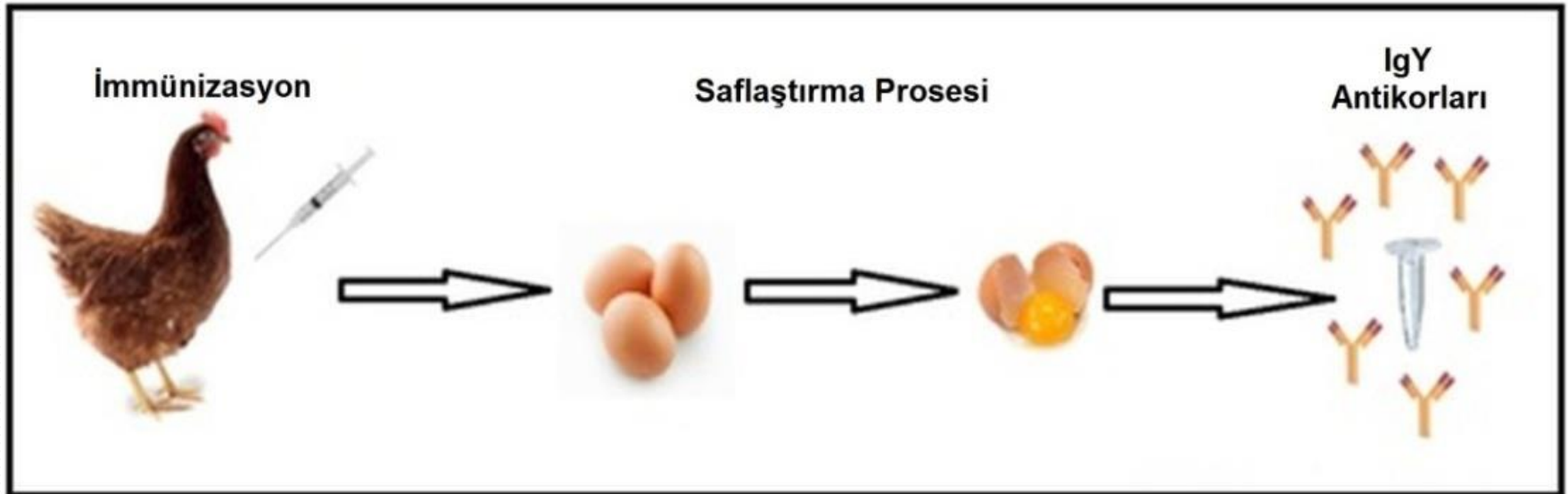
XVIII. TÜRK KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
VE İNFEKSİYON HASTALIKLARI KONGRESİ

ÇALIŞMAMIZIN AMACI

Influenza A virüsünün tanısında kullanılmak üzere, virüsün alt tiplerinde korunmuş antijenik bölgesi olan M2e peptid dizisine mono-spesifik IgY antikollarının üretilmesi ve tanı değerinin incelenmesidir.

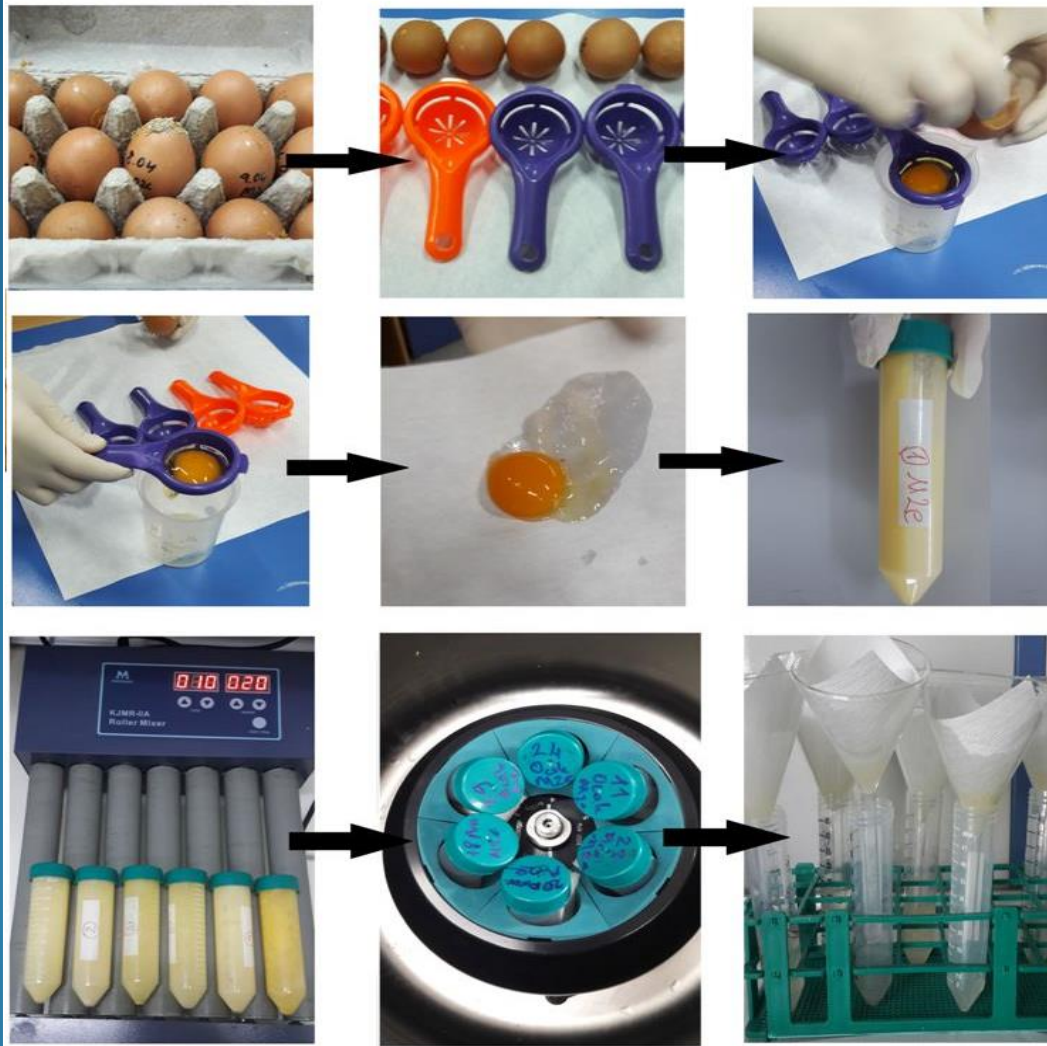
M2e PEPTİD DİZİSİ ($M_w=2756$ Da)

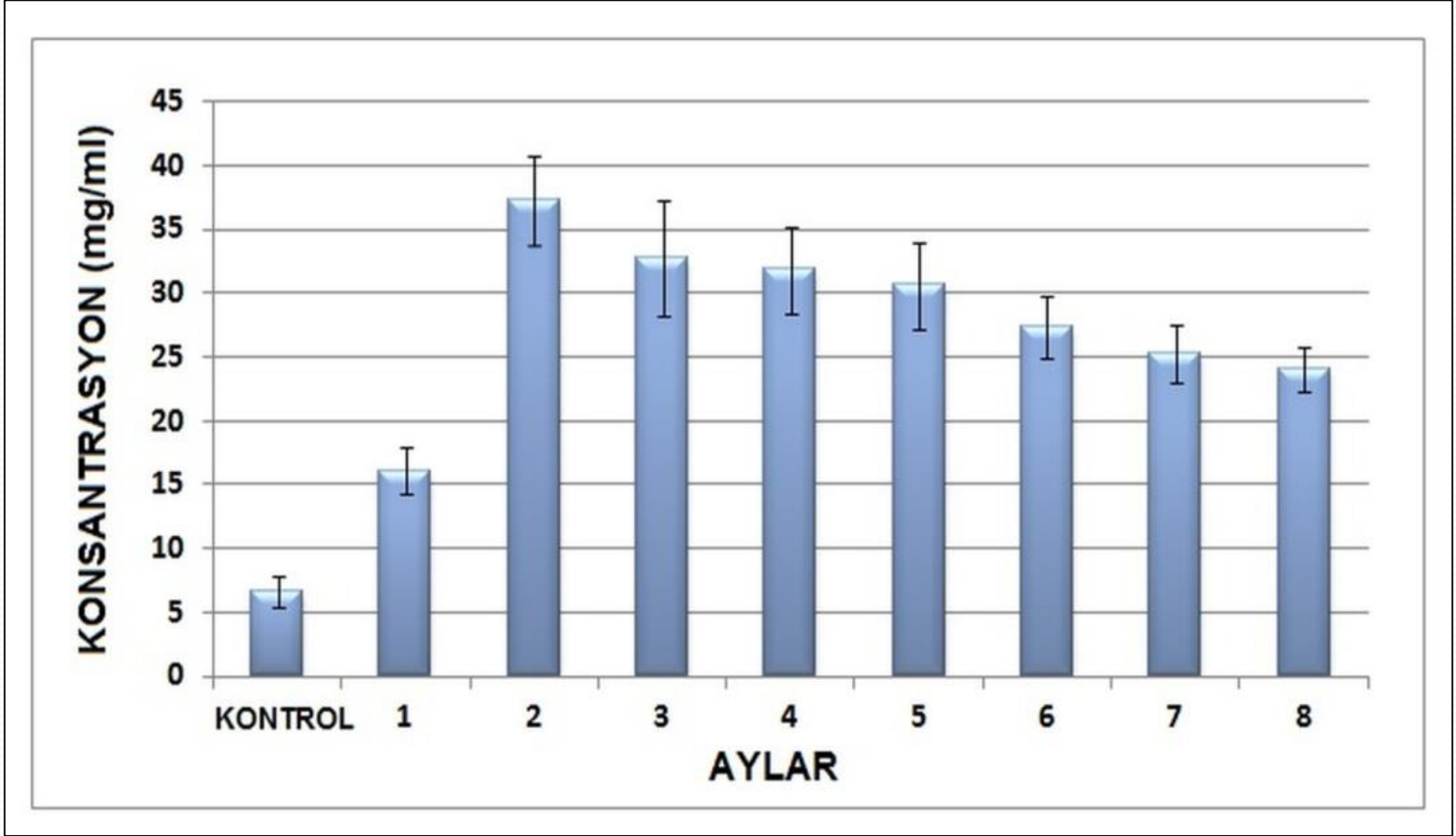
NH₂ - Met - Ser - Leu - Leu - Thr - Glu - Val - Glu -
Thr - Pro - Ile - Arg - Asn - Glu - Trp - Gly - Cys -
Arg - Cys - Asn - Asp - Ser - Ser - Asp - **COOH**



Şekil 1. IgY antikorlarının eldesinin şematik gösterimi

ANTI M2e-IgY ANTİKORLARININ SAFLAŞTIRILMASI





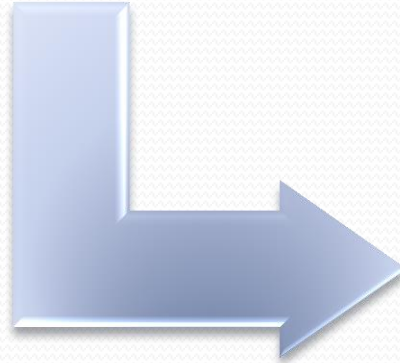
Şekil 2. IgY antikorlarının zamana bağlı olarak protein miktarlarındaki değişimin negatif kontrol yumurtaları ile kıyaslamalı grafiği.



KLİMİK 2017

XVIII. TÜRK KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
VE İNFEKSİYON HASTALIKLARI KONGRESİ

AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ
(INFLUENZA A M2e ANTİJENİNE MONO-SPEŞİFİK
IgY ANTİKORLARI)

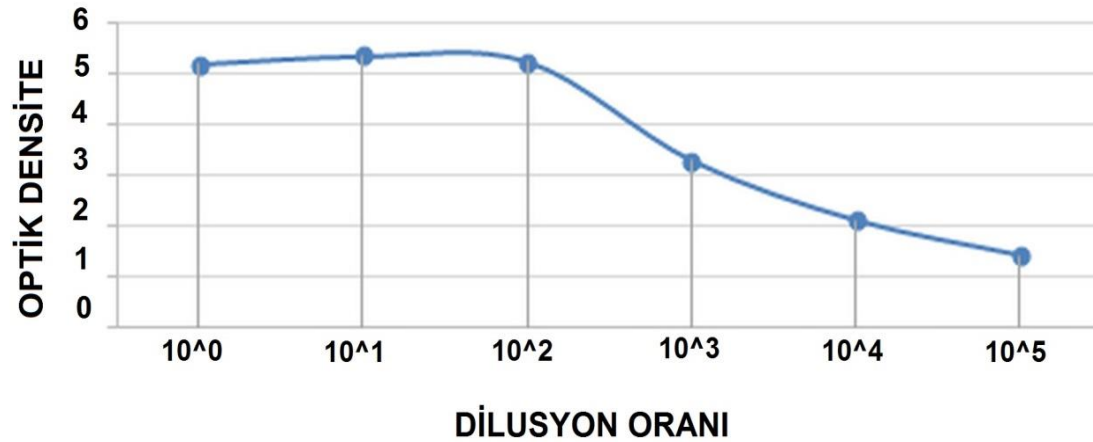
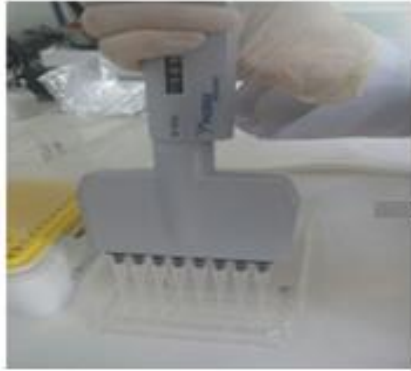
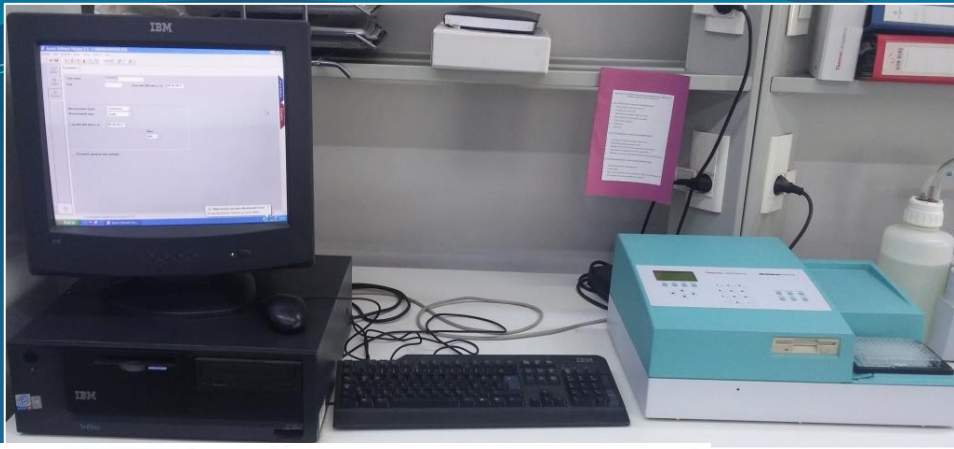


**ELISA YÖNTEMİ İLE
ANTİKOR TİTRELERİNİN
BELİRLENMESİ**

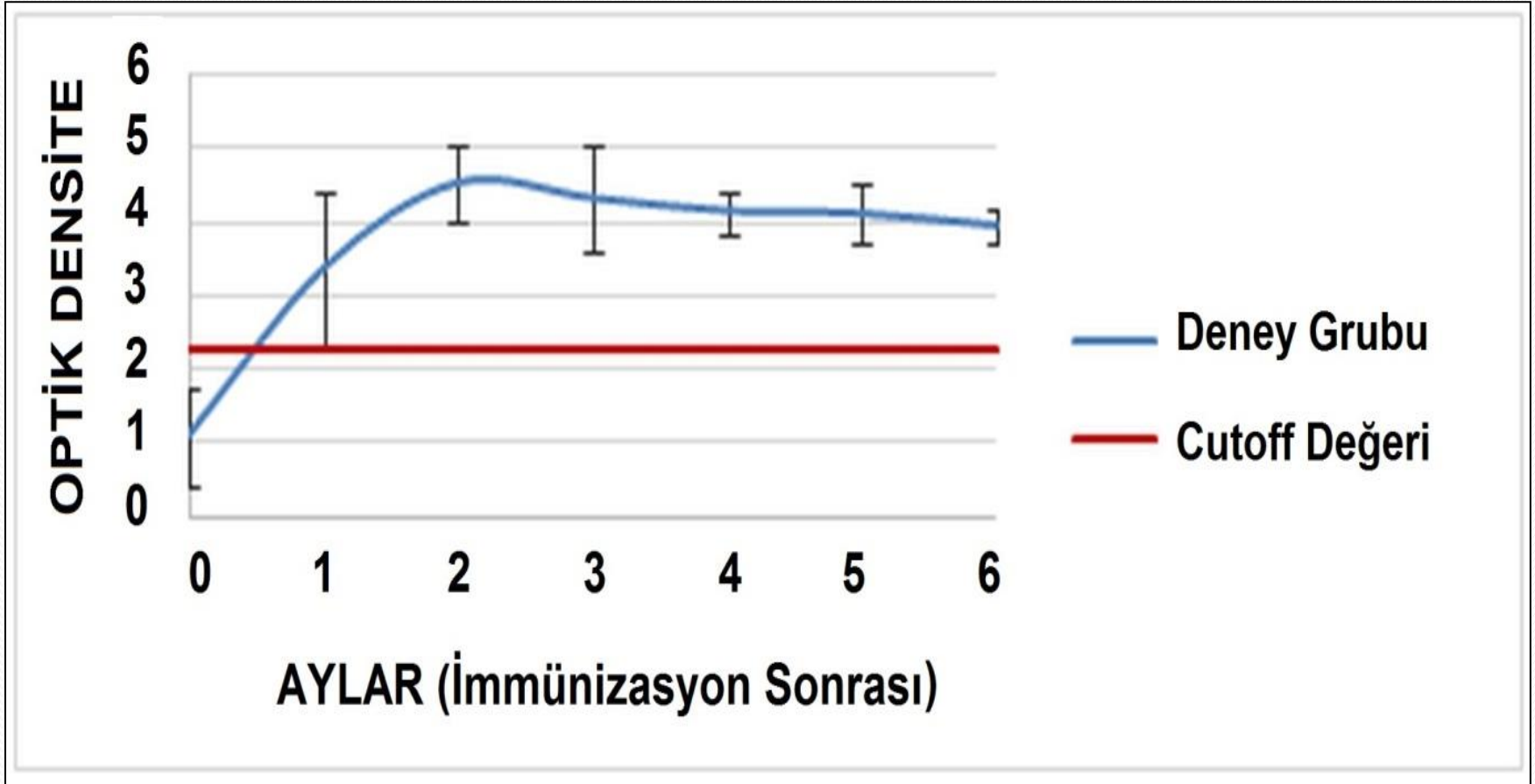


KLİMİK 2017

XVIII. TÜRK KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
VE İNFEKSİYON HASTALIKLARI KONGRESİ

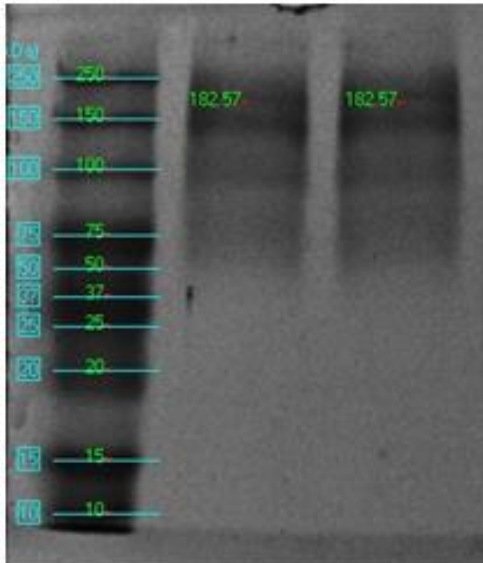
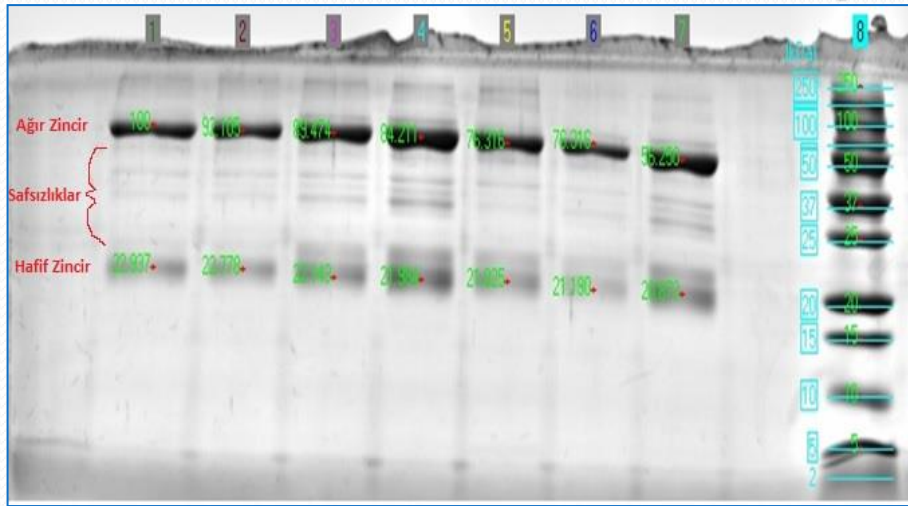


Cut – Off = Negatif kontrolün ortalama değeri + (2 × Standart sapma)

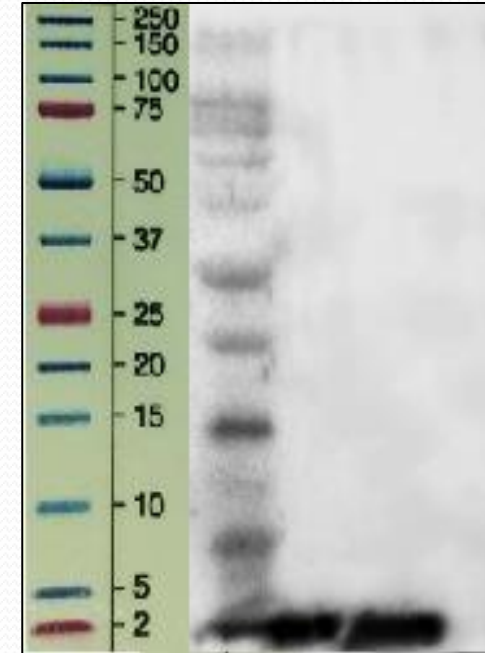


Şekil 3. İmmünizasyon sonucu elde edilen yumurtaların aylık antikor seviyelerinin ELISA yöntemi ile gösterimi.

SDS-PAGE ile Karakterizasyon



Western Blot ile Karakterizasyon

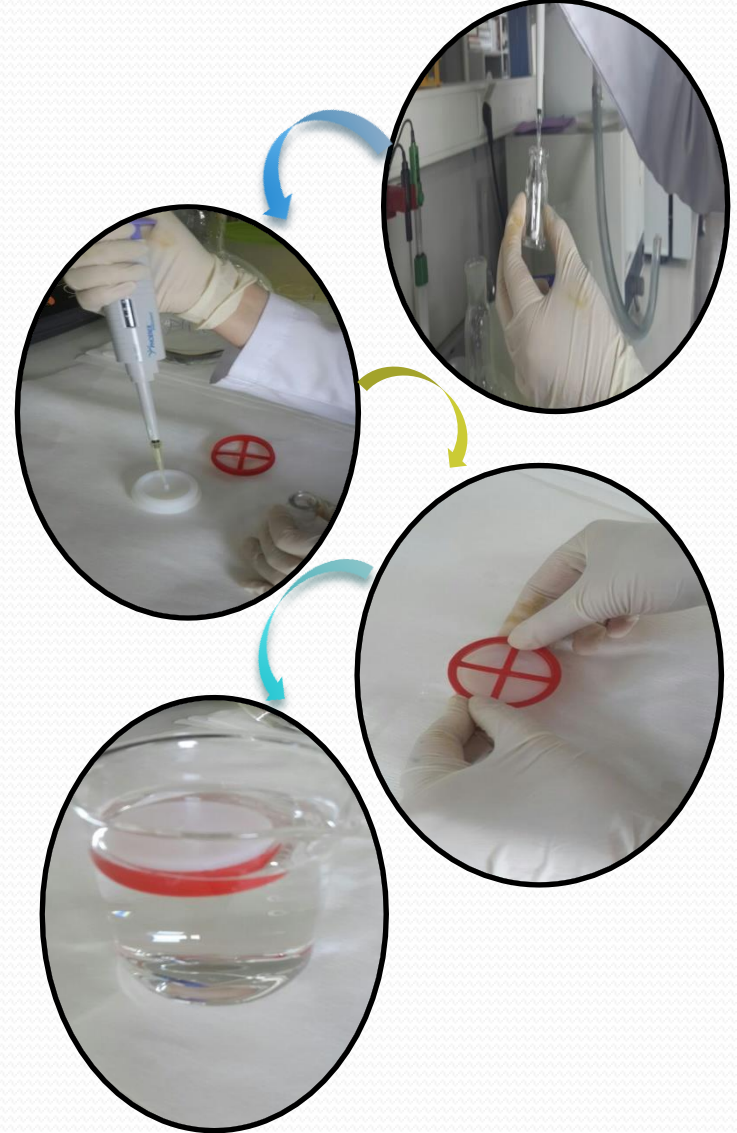


IgY Antikoruunun Alkalın Fosfataz Enzimi İle Konjugasyonu

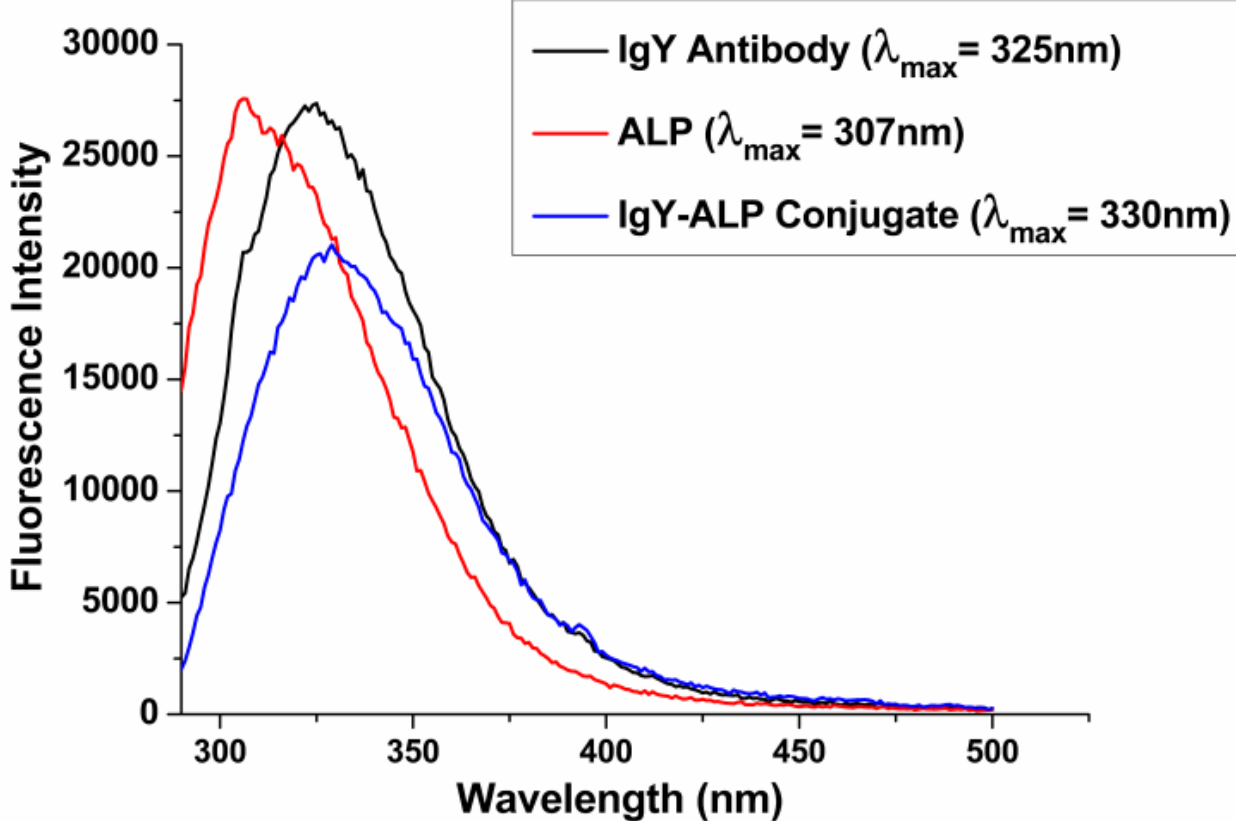
IgY, ALP, fosfat tamponunda glutaraldehit eklenerek oda sıcaklığında 2 saat karıştırılır.

Karışım PBS ile dilüe edilir ve 1 gece +4°C de diyaliz edilir.

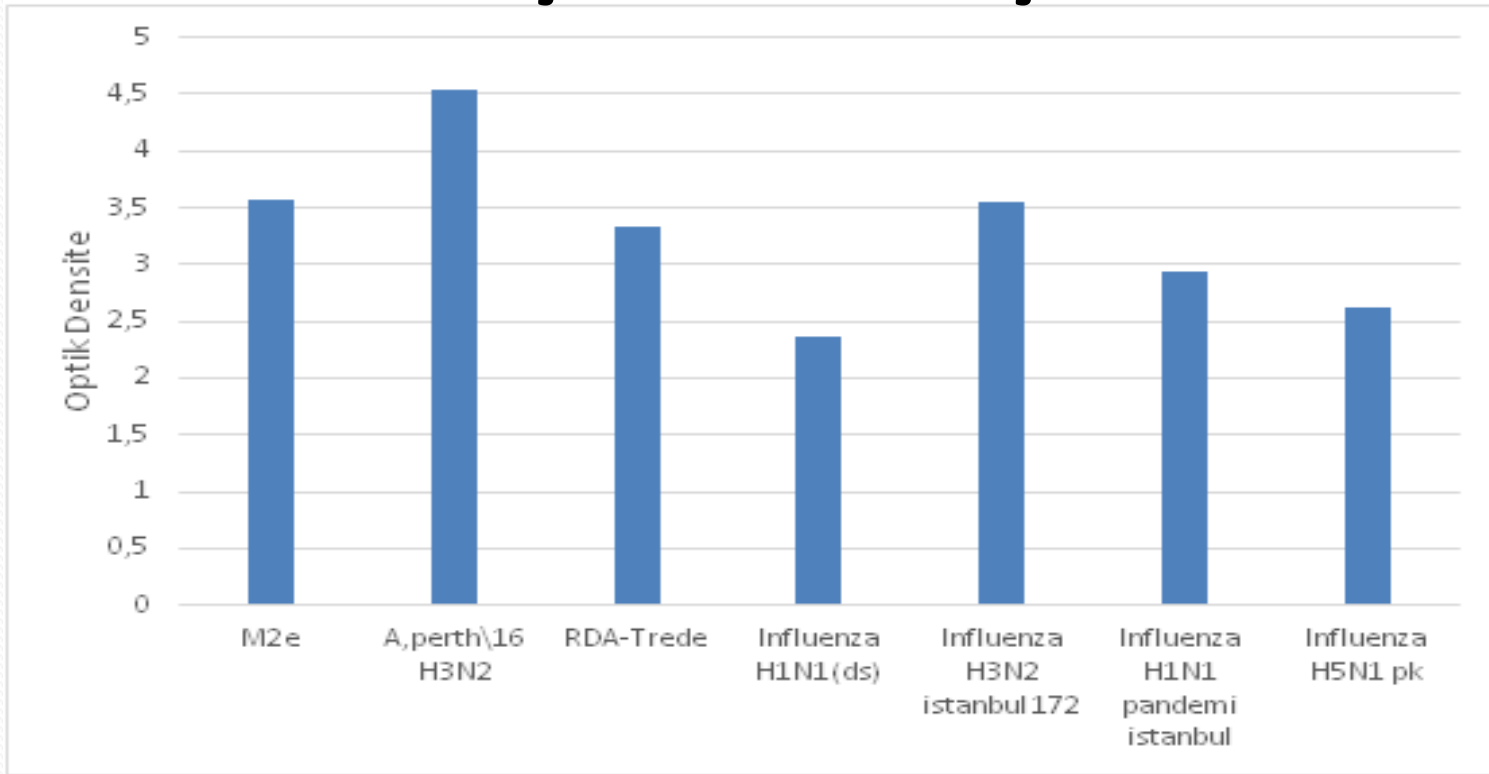
Daha sonra Tris-HCl tamponu eklenir. Konjugasyon sonlandırılır.



Floresans Spektroskopisi ile IgY-ALP Konjugatının Karakterizasyonu

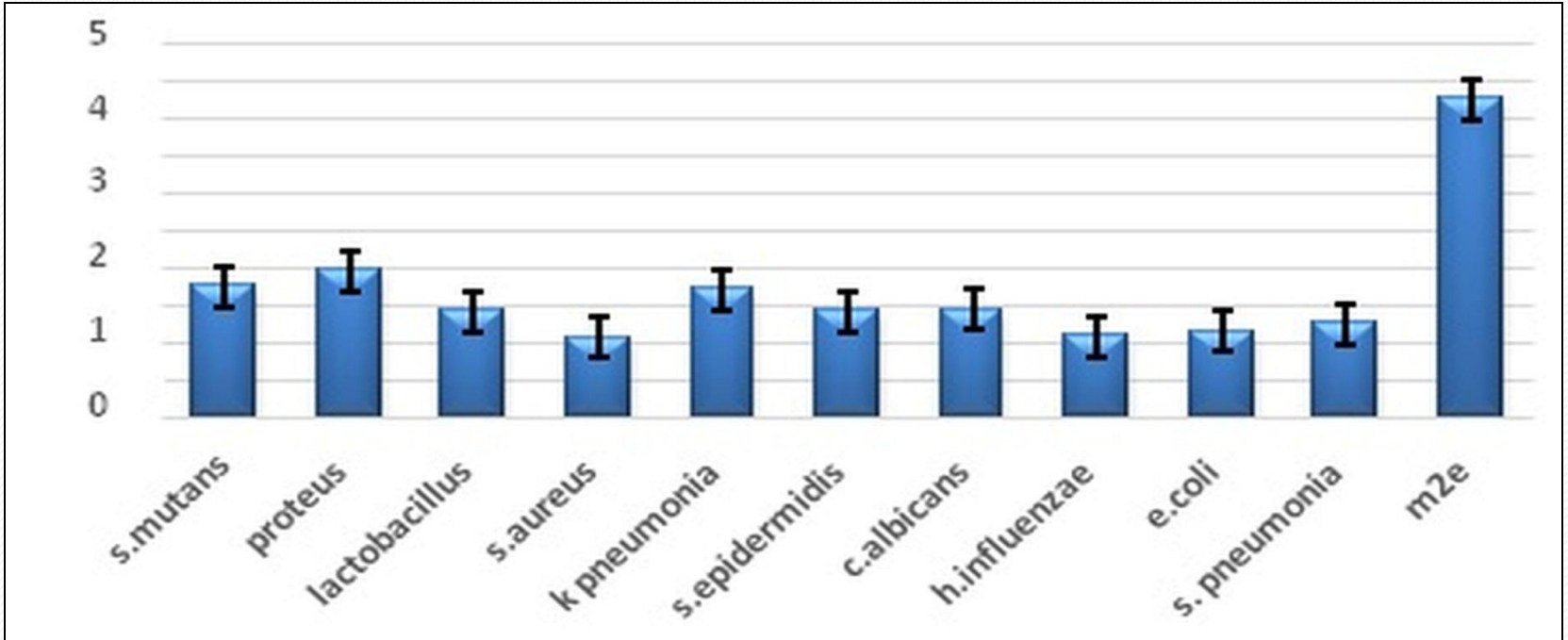


M2e PEPTİDİNE SPESİFİK İgY ANTİKORLARININ STANDART SUŞLAR İLE ETKİLEŞİMİ



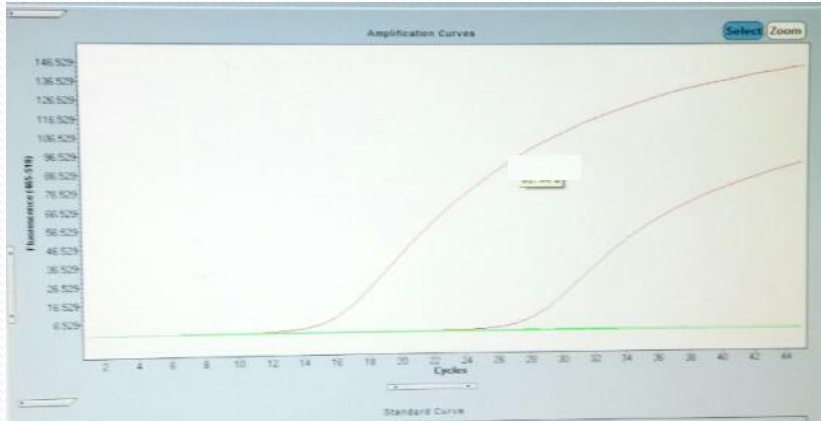
Şekil 4. M2e peptid antijeni ile immünize edilmiş tavuklardan elde edilen IgY standart Influenza suşlarıyla ile spesifik reaksiyonlarının ELISA yöntemi ile incelenmesi.

M2e PEPTİDİNE SPESİFİK İgY ANTİKORLARI İLE ÇAPRAZ REAKSİYONLARIN BELİRLENMESİ



Şekil 5. M2e peptid antijeni ile immünize edilmiş tavuklardan elde edilen IgY antikorlarının farklı mikroorganizmalara ait hücresel bileşenler ile spesifik reaksiyonlarının ELISA yöntemi ile incelenmesi.

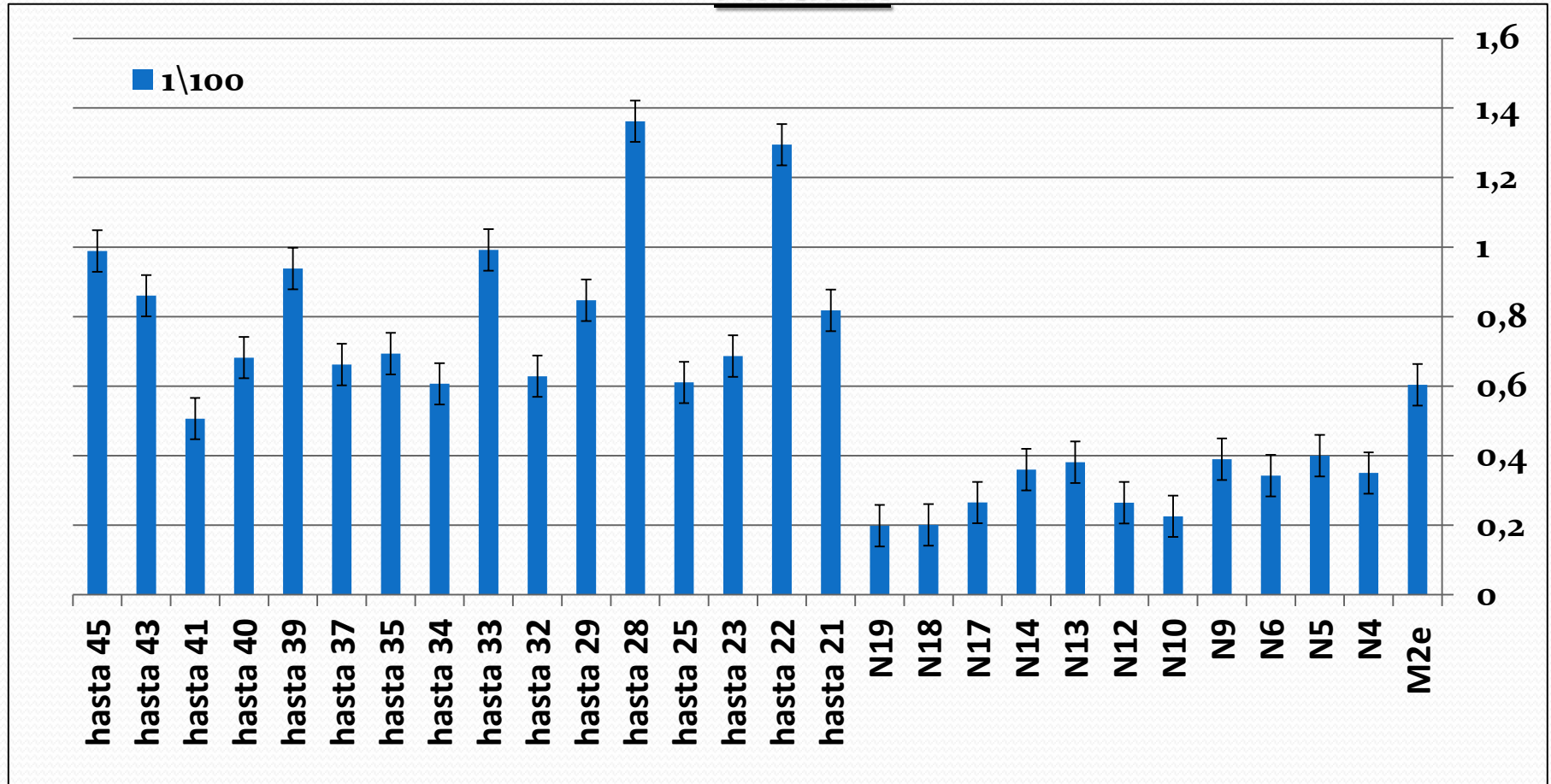
RT-PCR Yöntemi ile Nazofrangeal Sürüntü Örneklerinin Analizi



İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Ulusal İnfluenza Referans Laboratuvarı'na gelen nazofrangeal sürüntü örnekleri rRT-PCR yöntemi ile pozitif ve negatif olarak analizi yapılmıştır.



ELISA Yöntemi ile Nazofrangeal Sürüntü Örneklerinin Analizi



Influenza sezonu sırasında, hızlı tanı testi ile hastalığın tespiti, hasta ve halk sağlığı için büyük fayda sağlamaktadır.



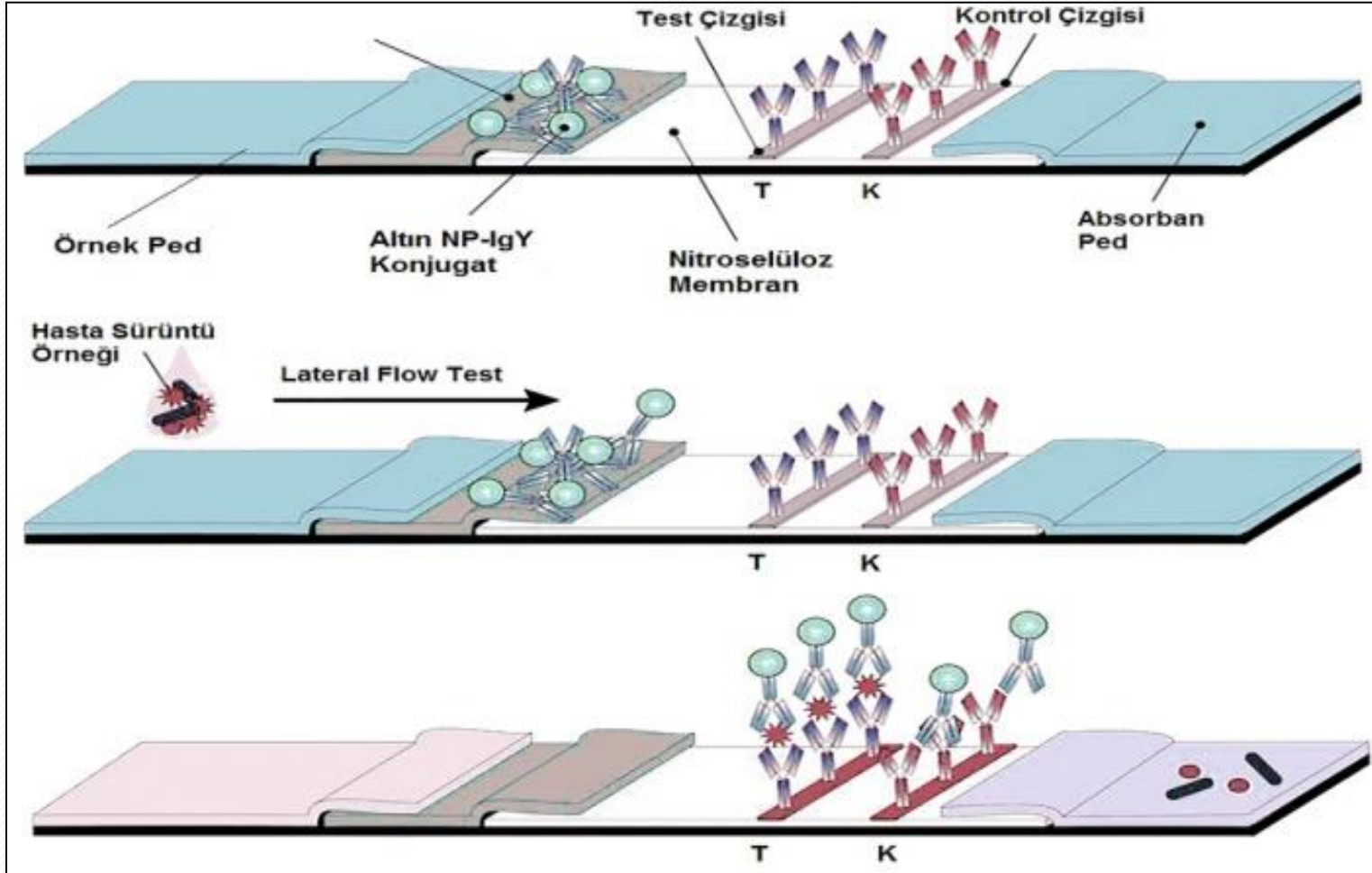
World Health
Organization

WHO recommendations on the use of rapid testing for influenza diagnosis

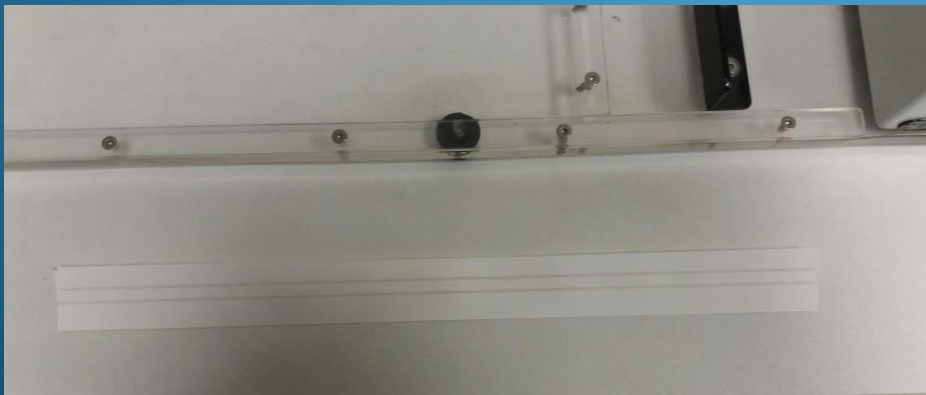
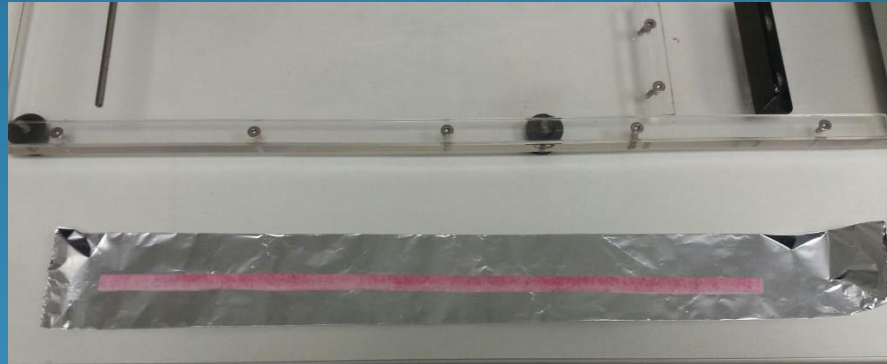
1. General information

Influenza outbreaks and epidemics pose ongoing risks to global human public health. Recently, human infections with A/H5N1 avian influenza viruses have heightened the potential for the emergence of an influenza A virus with pandemic potential. In response, the World Health Organization (WHO) is working to strengthen influenza surveillance (<http://www.who.int/csr/disease/influenza/influenzanetwork/en/index.html>) and increase laboratory capacity for the diagnosis of influenza and the early detection of emerging pandemic strains.

İMMUNO-KROMATOGRAFİK YÖNTEM



HIZLI TANI TESTLERİNİN HAZIRLANMASI



SONUÇ OLARAK

Influenza A virüsü tanısında hızlılık, özgüllük ve spesifiklik oldukça önemlidir.

- Proje ekibi tarafından üretilen Influenza A virüsü M2e peptidine spesifik IgY antikorlarının virüsün suşlarını tanıdığı, üst solunum yolu hastalıklarına neden olan mikro-organizmalar ile çapraz reaksiyon vermediği belirlenmiştir.
- Çalışılan her bir nazofrangeal sürüntü örneği için, kullanılan ELISA yöntemi ile elde ettiğimiz sonuçların, Ulusal Influenza Referans laboratuvarında rRT-PCR yöntemiyle elde edilen sonuçlarla örtüştüğü gözlenmiştir.



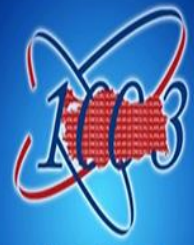
SONUÇ OLARAK

✓ Çalışmamızda, Influenza A virüsünün alt tiplerini **hızlı ve doğru** bir şekilde tanısına imkan sağlayacak M2e peptidine mono-spesifik IgY antikorları üretilmiş ve bu antikorların Influenza A virüsünün tanısında efektif olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir.

✓ IgY teknolojisinin pek çok medikal alanda, özellikle tanı alanında kullanılabileceğini kanıslındayız.



TEŞEKKÜR



**“Influenza A Enfeksiyonu Tanısı İçin (M2e)
Peptidine Spesifik IgY Antikoruна Dayalı
İmmünokromatografi Yöntemi ile Hızlı Tanı
Kiti Geliştirilmesi” isimli projeyi destekleyen
TÜBİTAK’a teşekkür ederiz.**

(Proje No. 115S132)



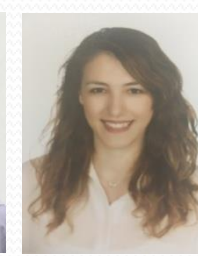
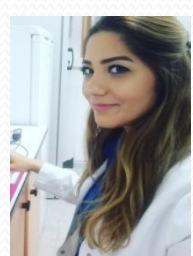
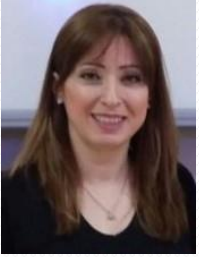
PROJE EKİBİ

KLİMİK 2017

XVIII. TÜRK KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
VE İNFEKSİYON HASTALIKLARI KONGRESİ

**Yıldız Teknik Üniversitesi
Biyomühendislik Bölümü**

**İstanbul Üniversitesi Tıp
Fakültesi Viroloji AB**



İLGİNİZE TEŞEKKÜR EDERİM...

