

10

Amaçlarımız

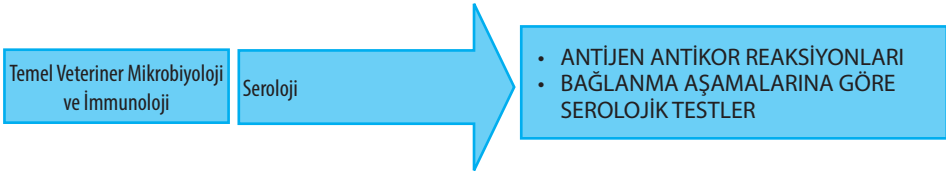
Bu üniteyi tamamladıktan sonra;

- Antijen-antikor reaksiyonlarının temel mekanizmasını tanımlayabilecek;
- Tanı amaçlı kullanılan farklı serolojik testleri ilişkilendirerek karşılaştırabilecek;
- Serolojik testlerin uygulama alanlarını ayırd edebileceksiniz.

Anahtar Kavramlar

- Antijen
- Antikor
- Spesifik
- Sulandırma (Dilusyon)
- Aglutinasyon
- Presipitasyon
- Titre
- Konjugat
- Anti-immunglobulin
- Substrat

İçindekiler



Seroloji

ANTİJEN ANTİKOR REAKSİYONLARI

Seroloji kelimesinin tam karşılığı “serum bilimi”dir. Diğer bir ifade ile seroloji kan serumunda antikor varlığını/düzeyini inceleyen bir bilim dalıdır. Bu kavram içinde yer alan serolojik testler antijen antikor reaksiyonlarına dayalı teknikleri kapsar. Bilindiği gibi **infeksiyöz hastalıklar** sonucu konakçıda hastalık etkenlerine **spesifik** antikor yanıtı oluşur. Antikorlar vucutta en fazla kan serumunda bulunur. Bu nedenle hastalıkların teşhisinde kan serumunda spesifik antikor varlığının/düzeyinin saptanması büyük önem taşır. Bu amaçla çeşitli serolojik testler kullanılmaktadır. Serolojik testler kısa sürede yanıt alınması ve güvenilir olmaları nedeni ile infeksiyöz hastalıkların teşhisinde öncelikle tercih edilen yöntemlerden biridir.

Serolojik testlerin temelini antijen ve antikor molekülleri arasındaki spesifik reaksiyonlar oluşturmaktadır. Testlerin uygulanmasındaki amaca bağlı olarak serum veya antijen sulandırma yapıları. Örneğin; infeksiyöz bir hastalık sonucu ya da yapılan bir aşılamaya sonrasında konakçıda oluşan spesifik antikor yanıtını saptamak amacı ile uygulanan serolojik testlerde şüpheli serum örneği sulandırılır ve üzerine uygun miktarda antijen eklenir. Uygun sıcaklıktaki inkübasyon süresi sonunda reaksiyonun oluşup oluşmadığı incelenir. Pozitif reaksiyonun gözlemlendiği en yüksek serum sulandırması serum titresi olarak değerlendirilir. Eğer konakçının doku ve vucut sıvılarında infeksiyöz bir hastalık etkeninin saptanması amaçlanıyorsa, antijen sulandırması yapılır ve üzerine uygun miktarda **antiserum** (antikor) eklenir. Yine yöntemine uygun sıcaklık ve sürede inkübe edilir. Inkübasyon süresi sonunda pozitif reaksiyonun gözlemlendiği en yüksek antijen sulandırması antijen titresi olarak ifade edilir. Bu durumda bilinmeyen antijen kaynağı konakçının şüpheli kan, doku vb. örnekleridir. Bazı testler, antijen veya serum sulandırma yapılmaksızın direkt bir araya getirilerek uygulanır. Bu durumda serumun veya antijenin titresi belirlenemez ve sonuç “pozitif” veya “negatif” olarak değerlendirilir. Yukarıda da belirtildiği gibi serolojik testler çeşitli amaçlarla kullanılabilir. Bu amaçları şöyle sıralayabiliriz;

- İnfeksiyöz hastalıkların tanısı,
- Aşı programlarının düzenlenmesi amacı ile aşılamaya öncesi **maternal antikor** düzeyinin belirlenmesi ve aşı uygulamalarından sonra koruyucu bağışıklığın saptanması,
- Humoral immun yetmezliklerin belirlenmesi,
- Vucut dokularında veya kan, lenf vb. vucut sıvılarında antijen varlığının saptanması,
- Antijen ve antikor moleküllerinin tiplendirilmesi.

İnfeksiyöz hastalık: Bir mikroorganizma (bakteri, virus) tarafından oluşturulan hastalık.

Spesifik: Özgün, özel.

Antiserum: Aranan antijene karşı spesifik antikor içeren serum.

Maternal Antikor: Anneden yavruya aktarılan antikor.

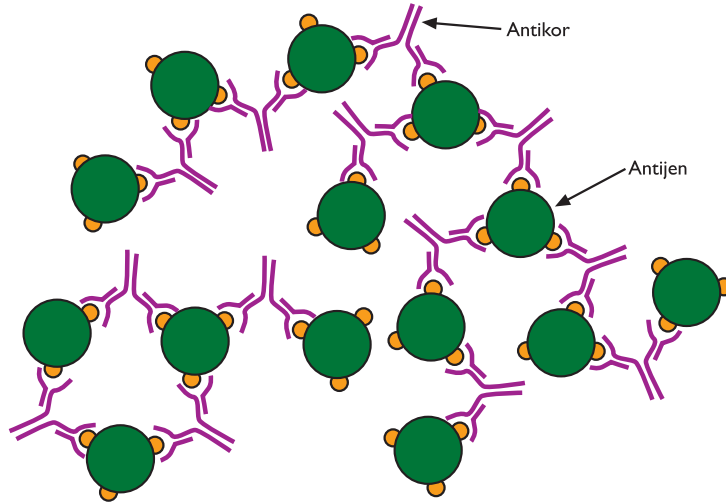
Serolojik Reaksiyonların İki Basamağı

Serolojik reaksiyonlarda antikor ve antijen molekülü arasındaki bağlanma iki aşamalıdır. İlk aşamada antijen ve spesifik antikor molekülü birbirlerine uygun reseptörler aracılığı ile bağlanırlar. Bu aşama hızlı oluşur, ısıya bağımlı değildir ve geriye dönüşebilir özelliktedir. Çıplak gözle görülemeyen bu döneme “birincil bağlanma aşaması” denir. İkinci aşamada ise, birbiri ile spesifik olarak bağlanmış olan antijen-antikor molekülüleri bir araya gelerek kümelenir ve bir kompleks oluşturur. Antijen antikor molekülülerinin oluşturdukları bu yapıya lattis (örgü) formasyonu denir. Bu aşama daha yavaş gelişir, ortamda elektrolit bulunması gerekir ve düşük ıslarda daha etkin bir birleşme olur. Oluşan antijen-antikor kompleksi bu aşamada kendi ağırlıkları ve elektrolitin etkisi ile çöker. “İkincil bağlanma aşaması” olarak tanımlanan bu dönemde antijen antikor molekülünün birbirinden ayrılması mümkün değildir, diğer bir ifade ile bu dönem geriye dönüşebilir (reversible) özellikte değildir. Gözle görülebilir olan bu dönemde, antijen ve **bivalan** yapıdaki antikor molekülüleri birden fazla reseptörleri aracılığı ile bağlanarak güçlü ve ağ benzeri bir yapı oluştururlar (Şekil 10.1).

Bivalan: Bir antikor molekülünün iki antijenik molekül ile birleşmesini sağlayan yapısal özelliği.

Şekil 10.1

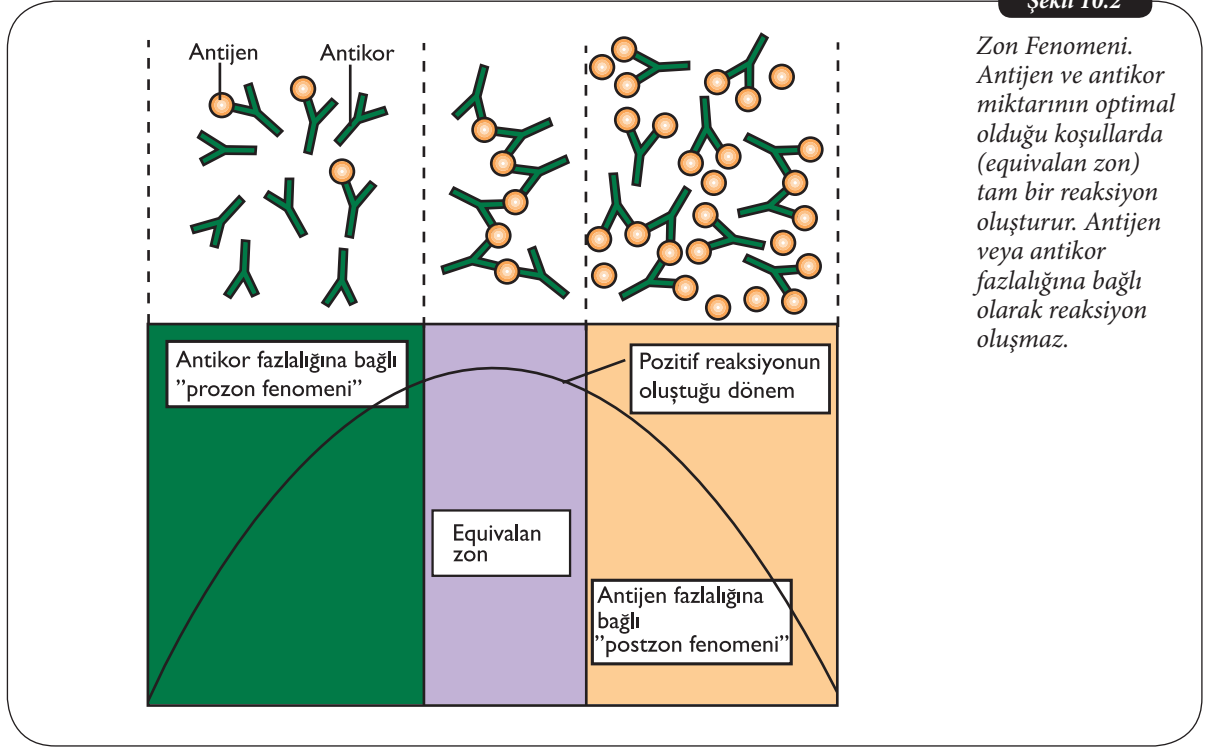
Antijen ve Antikor Molekülleri Arasındaki Spesifik Reaksiyon (Lattis Örgü Formasyonu)



Zon Fenomeni

Serolojik testlerde amaca bağlı olarak önce antijen veya antikor sulandırması yapılır, ardından da her bir sulandırma üzerine eşit miktarda standart antijen veya antikor eklenir. Örneğin bir kan serumu örneğinde antikor düzeyinin belirlenmesi hedeflenmiş olsun. Bu durumda önce serumun uygun oranlarda sulandırılmaları yapılır ve daha sonra ise standart antijen solusyonundan her birinin üzerine eşit miktarda eklenir. Uygun ısı ve sürede inkübe edildikten sonra oluşan reaksiyon değerlendirilir. İnkübasyon süresi sonunda, ilk tüplerde reaksiyonun oluştuğu ve son tüplere doğru azalan antikor miktarına bağlı olarak reaksiyonun zayıfladığı ve daha sonra oluşmadığı gözlenir. Bir sulandırma serisinde antijen ve antikor miktarlarının en uygun (optimal) olduğu tüplerde bu antikor ve antijen molekülülerinin hemen hemen tamamı birleşir ve tam bir reaksiyon oluşur. Ortamda çok az miktarda birleşmemiş antijen veya antikor molekülü vardır veya hiç yoktur. Antikor ve antijen molekülülerinin tam olarak reaksiyona girdiği bu optimal düzeye “equivalan zon”

adı verilir. İlk tüplerde antikor düzeyinin fazlalığına bağlı olarak negatif reaksiyon gözlenebilir ve ortamda reaksiyona girmemiş antikor molekülleri bulunur. Bu durum “prozon fenomeni” olarak bilinir. Sulandırma serisinin son tüplerinde ise gittikçe azalan antikor miktarına bağlı olarak negatif reaksiyon gözlenir ve bu durumda açıkta bağlanmamış antijen molekülleri bulunur. Normal koşullarda oluşması beklenen bu duruma “postzon fenomeni” denir (Şekil 10.2).



BAĞLANMA AŞAMALARINA GÖRE SEROLOJİK TESTLER

Birincil Bağlanma Testleri

Bu testler antijen antikor reaksiyonlarının birinci bağlanma aşamasını saptar. Diğer bir ifade ile bu aşamada antijen ve antikor molekülleri uygun reseptörleri ile sadece bağlanmışlardır ve henüz kümelenme ve çökme olmamıştır. Bu nedenle birincil bağlanma testlerindeki reaksiyonlar gözle görülemez ve bu reaksiyonların gözle görülebilir hale gelmesi için **konjugat** kullanılması gerekir. Birincil bağlanma testleri çok düşük konsantrasyonlardaki antijen veya antikorları saptama özelliğine sahip oldukları için duyarlılıkları yüksek testlerdir. Birincil bağlanma testlerinin önemli özelliklerinden bir diğeri ise kullanılan yöntemle göre antijen veya antikor moleküllerinin katı yüzeylere yapıştırılması ve reaksiyonların bu katı yüzeylerde oluşturulması, ardından reaksiyona girmeyen fazla antijen ve antikor moleküllerinin yıkanarak uzaklaştırılabilmesidir. Bu testlerin değerlendirilebilmesi için ELISA okuyucusu (spektrofotometre), floresan mikroskop vb. alet ve ekipmana gereksinim vardır. Bu testlere örnek olarak ELISA, İmmunofluoresan, Radioimmunoassay verilebilir.

Konjugat: Enzim, radioizotop, floresan boya gibi çeşitli moleküllerle işaretlenmiş antijen veya antikor.

Substrat: Enzimlerle kimyasal reaksiyonlara girerek çeşitli ürünler açığa çıkaran maddelerdir.

Enzim İmmunoassay (EIA)

Enzim immunoassay genel bir tanım olup, bu tanım içinde antijen veya antikor moleküllerinin enzim ile işaretlenmesi esasına dayanan ve enzim-**substrat** ilişkisi ile açığa çıkan reaksiyonların (renk değişikliği) değerlendirildiği testler bulunur. Veteriner hekimlik alanında bu kapsamda kullanılan en önemli ölçüm tekniklerinin başında ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) gelir. ELISA'da antikor veya antijen moleküllerini işaretlemek için en fazla kullanılan enzimler horseradish peroksidaz, alkalın fosfotaz ve b-galaktosidaz'dır. ELISA ile diğer birincil bağlanma testlerinde olduğu gibi antijen veya antikor varlığı veya düzeyi saptanabilir ve bu amaçla farklı teknikler uygulanır.

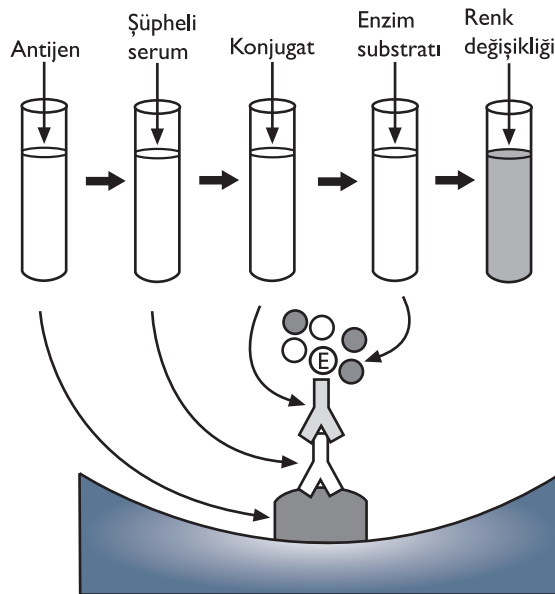
Antikor Saptamaya Yönelik ELISA

İndirekt ELISA: Bu yöntemde; ilk aşamada aranan antikora spesifik bilinen antijenin polisteren yüzeylere bağlanması sağlanır. Bağlanmamış antijenler yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Ardından şüpheli serum eklenir ve uygun bir süre inkübe edilir. Bu dönemde eğer şüpheli serumda antikor varsa antijen ile spesifik olarak bağlanacaktır. Yıkama işlemi tekrar uygulanır, antijenle bağlanmış antikorlar ortamda kalırken bağlanmamış antikorlar uzaklaştırılır. Bu aşamada antijen antikor bağlanmasını ortaya koymak için ortama enzim ile işaretlenmiş **anti-immunglobulin** (konjugat) eklenir. Eklenen anti immun-globulin, serumu incelenen hayvan türüne özgüdür ve bu aşamada şüpheli serumda bulunan antikorlara bağlanır. İnkübasyondan sonra tekrar yıkama işlemi uygulanarak bağlanmamış maddeler uzaklaştırılır. Son olarak uygun enzim substratı katılarak oluşan reaksiyonun görülebilir olması sağlanır. Burada beklenen; katı yüzeye bağlanmış enzim işaretli anti-immunglobuline substratın etki ederek renk değişikliği ile reaksiyonu ortaya çıkarmasıdır. Eğer şüpheli serumda antikor yoksa, ilk aşamadaki antijenle bağlanmayacak ve yıkama işlemleri ile daha sonraki aşamada katılan maddeler de ortamdan uzaklaştırılacağı için substrat katıldıktan sonra renk değişikliği olmayacaktır (Şekil 10.3).

Anti-immunglobulin: Bir hayvan türüne ait immunglobulin (antikor) molekülünün başka bir hayvan türüne injekte edilmesi ile elde edilen immunglobulin molekülüdür.

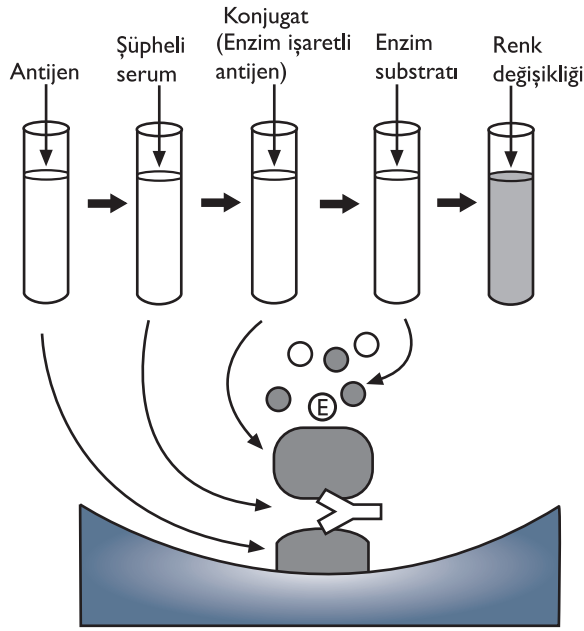
Şekil 10.3

İndirekt ELİSA: şüpheli serumda antikor varlığında renk değişikliği olur.



Antijen-Sandviç ELISA: İlk aşamada indirekt ELISA tekniğinde olduğu gibi, aranan antikora spesifik bilinen antijen polisteren yüzeylere bağlanır. Bağlanmamış antijenler yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Ardından ikinci aşamada, şüpheli serum eklenir ve uygun bir süre inkübe edilerek yıkama işlemi tekrar uygulanır. Üçüncü aşamada ise enzim işaretli spesifik antijen (konjugat) eklenir. İnkübasyon ve yıkama işleminin ardından substrat katılarak reaksiyon görülebilir hale getirilir. Bu durumda şüpheli serumda antikor varsa önce katı yüzeye bağlı spesifik antijen ile bağlanacak ardından enzim işaretli antijen ile bağlanarak substratın katılması ile renk değişikliği oluşacaktır. Şüpheli serumda spesifik antikor yokluğunda ise; ikinci aşama sonrası uygulanan yıkama işlemi ile ortamda antikor bulunmayacağı için sonraki aşamalarda katılan maddeler ile bir reaksiyon oluşmayacak ve renk değişikliği meydana gelmeyecektir (Şekil 10.4).

Şekil 10.4



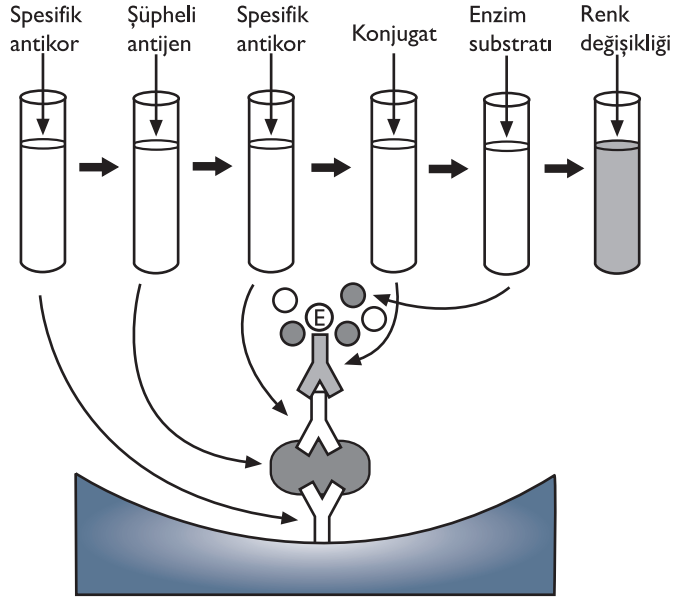
Antijen sandviç ELISA: şüpheli serumda antikor varlığında renk değişikliği olur.

Antijen Saptamaya Yönelik ELISA

Antikor-Sandviç ELISA: Bu yöntemde antijen arandığı için ilk aşamada polisteren yüzeylere aranan antijene spesifik antikor kaplanır. Ardından antijen şüpheli test örneği (vucut sıvıları vb.) ortama eklenir. İnkübasyon periyodu ve yıkama işleminin ardından üçüncü aşamada aranan antijene spesifik antikor katılır, inkübasyon ve yıkama işlemi uygulanır. Dördüncü aşamada spesifik antikora karşı oluşturulmuş enzimle işaretli anti-immunglobulin (konjugat) eklenir. İnkübasyon ve yıkama işlemlerinin ardından son aşamada substrat katılarak test tamamlanır. Şüpheli test materyalinde antijen varsa, katı yüzeye bağlı olan spesifik antikor ile bağlanacağından ardından katılan diğer maddelerde aynı ilke ile birbirleri ile reaksiyona girerek katı yüzeye tutunacaktır ve son aşamada substratın katılması ile renk değişikliği görülecektir (Şekil 10.5)

Şekil 10.5

Antikor Sandviç
ELISA: şüpheli test
örneğinde antijen
varlığında renk
değişikliği olur.



SIRA SİZDE



ELISA'da farklı test yöntemleri var mıdır?

SIRA SİZDE



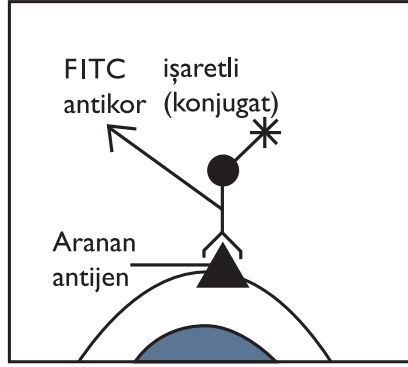
ELISA'dan başka enzim ile işaretleme tekniğine dayalı testler var mıdır?

İmmunofluoresan Teknikleri

İmmunofluoresan (IF) teknikleri, antijen veya antikor moleküllerinin floresan boyalar ile işaretlenmesi ve oluşan spesifik antijen-antikor reaksiyonlarının ultraviyole (UV) ışığı altında floresan parlamalar ile gösterilmesi esasına dayanır. IF tekniklerinde fluoresein izotiyosiyanat (FITC) en sık kullanılan florokrom boyalardır ve reaksiyonlar floresan mikroskop altında görülmektedir. IF teknikleri de ELISA'da olduğu gibi antijen veya antikor aramak için farklı yöntemlerle uygulanabilmektedir.

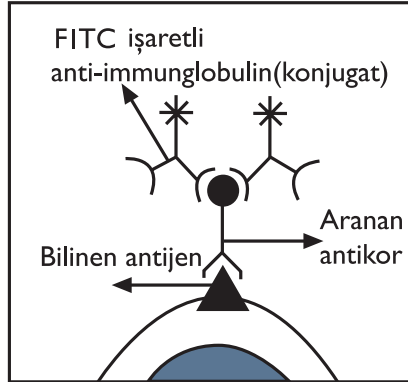
Direkt Floresan Antikor Testi (FA): Bu teknik ile şüpheli materyaldeki antijen varlığı ortaya konur. Bu amaçla şüpheli doku kesiti veya sıvı örnekler bir lam üzerine fikze edilir. Üzerine aranan antijene spesifik ve FITC ile işaretlenmiş antikor (konjugat) eklenerek inkube edilir ve ardından bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak için yıkama işlemi uygulanır. Floresan mikroskopta yapılan incelemede, şüpheli örnekte antijen varsa floresan ışımlar gözlenir. Bu teknikle virus/bakteri gibi antijenik moleküllerin dokulardaki varlığı ve yerleşimi ortaya konulabilir. Ayrıca dışkı örneklerinde çeşitli bakterilerin varlığı veya doku kültürlerinde virus üremeleri bu teknikle saptanabilmektedir (Şekil 10.6).

Şekil 10.6

Direkt Fluoresan
Antikor Testi

İndirekt Fluoresan Antikor Testi (IFA): IFA testi serumdaki antikor varlığını ortaya koymak veya doku ve hücre kültürlerindeki antijenleri (virus/bakteri) tanımlamak amacıyla uygulanır. Serumda antikor aramak için uygulanan IFA testinde; bir lam üzerine fikze edilmiş bilinen antijen içeren doku kesiti, smear veya hücre kültürü üzerine şüpheli serum örneği eklenir. İnkübe edilir ve yıkama işlemi uygulanarak sadece antijene spesifik olarak bağlanan antikorların ortamda kalması sağlanır ve spesifik olmayan antikorlar uzaklaştırılır. Üzerine FITC işaretli anti-immunglobulin (konjugat) eklenir ve inkübasyona bırakılır. Yıkama işlemi tekrarlanarak bağlanmamış konjugat ortamdan uzaklaştırılır. Preparat floresan mikroskop altında incelenir ve spesifik ışımaların gözlenmesi şüpheli serumda antikor varlığını ortaya koyar (Şekil 10.7).

Şekil 10.7

İndirekt Fluoresan
Antikor Testi

Antijen aranması durumunda ise; şüpheli doku kesiti vb. materyal lama fikze edilir. Üzerine aranan antijene spesifik bilinen antiserum (antikor) eklenerek inkübe edilir ve yıkanır. Ardından üzerine FITC işaretli anti-immunglobulin (konjugat) eklenir ve inkübasyona bırakılır. Yıkama işlemi tekrarlanarak bağlanmamış konjugat ortamdan uzaklaştırılır. Sonuç aynı şekilde değerlendirilir.

Radyoimmunoassay (RIA)

RIA, antijen veya antikor moleküllerinin radyoizotoplarla işaretlenmesi ve oluşan spesifik antijen-antikor reaksiyonlarının açığa çıkardığı radyoaktivitenin özel cihazlarla (gama-counter) ölçülmesi esasına dayanan teknikleri içerir. Antijen veya antikor moleküllerini işaretlemek için genellikle iyot-125, karbon-14 gibi radyoizotoplar kullanılır. RIA antijen veya antikor saptamak amacı ile kullanılmaktadır. Bu tekniklerin başlıca kullanım alanları; vücut sıvılarında düşük düzeylerde bulunan ilaç, hormon, enzim aranması, allerjik bireylerde allerjene spesifik IgE saptanmasıdır. ELISA ve IFA tekniklerine benzer şekilde uygulanan farklı yöntemleri vardır. Diğer primer bağlanma testlerine göre çok daha duyarlı olmasına rağmen, RIA uygulayanlar için radyoaktivite nedeni ile sağlık riskleri taşıması, özel cihazlara gereksinim göstermesi ve maliyetlerinin yüksek olması nedeni ile günümüzde özel araştırma laboratuvarları dışında fazla tercih edilmemektedir.

SIRA SİZDE



Primer bağlanma testlerinde kullanılan reagentler nasıl hazırlanır veya nasıl temin edilir?

Reagent: Özellikle ELISA, IFA gibi serolojik testlerde reaksiyona katılan maddelerdir.

İkincil Bağlanma Testleri

İkincil bağlanma testleri, antijen-antikor reaksiyonlarının ikinci bağlanma aşamasını ortaya koyan testlerdir. Daha önce de bildirildiği gibi, bu aşamada birbirine spesifik olarak bağlanmış antijen ve antikor molekülü ağ veya örgü tarzında birleşerek erimeyen immun kompleksler oluştururlar. İkinci aşamanın oluşabilmesi için antijen ve antikor konsantrasyonunun da uygun (optimal) olması gerekir. Bu nedenle ikincil bağlanma testleri birincil bağlanma testlerine oranla daha az duyarlıdır. Buna karşın oluşan reaksiyonların çıplak gözle görülebilmesi, işaretleme teknikleri gibi özel uygulamalara gereksinim göstermemesi nedeni ile laboratuvarlarda daha kolaylıkla uygulanabilmektedirler. Bu testlere örnek olarak aglutinasyon, presipitasyon, komplement fiksasyon vb. verilebilir.

Presipitasyon

İkincil bağlanma testlerinde, eriyebilir özellikte olan antijenler ile homolog anti-serumun bir araya gelmesi ile oluşan reaksiyonlara “presipitasyon” adı verilir. Eriyebilir özellikteki antijenlere “presipitinojen ve bunlar ile reaksiyona giren spesifik antikorlara ise “presipitin” denir. IgG, IgM ve IgA presipitasyon reaksiyonlarına katılan immunglobulinlerdir. Ancak IgG en güçlü presipitindir. Serum proteinleri ve bakteriyel polisakkarit yapılar en önemli presipitinojenlerdir. Presipitin ve presipitinojen uygun koşullarda bir araya getirildiğinde ilk birkaç dakika içinde bir bulanıklık oluşur, bu birleşme dönemidir. Birkaç saat içinde ise antijen-antikor kompleksi oluşur ve tüpün dibine çöker. Antijen-antikor kompleksine “presipitat” denir. Presipitasyon testleri sıvı veya yarı katı ortamlarda uygulanır. Bu ortamlar antijen ve antikor moleküllerinin rahatlıkla hareket edebildiği ve spesifik moleküllerin birbirleri ile reaksiyona girebildiği ortamlardır. Sıvı ortamlarda gerçekleştirilen presipitasyon testlerinde, reaksiyonun olduğu tüplerde bulanıklık meydana gelir, presipitasyon oluşmayan tüpler ise berrak görünümündedir. Presipitasyon testlerinde sulandırma yapılarak zon fenomeni gözlemek mümkündür. Yarı katı ortamlarda yapılan presipitasyon testlerinde ise antijen ve antikor jel içinde ilerleyerek karşılaştıkları yerde reaksiyona girerler ve reaksiyon çizgi halinde göz-

lenir. Yarı katı ortamlarda uygulanan presipitasyon testlerinin laboratuarlarda en fazla kullanılanları immunodiffuzyon teknikleri ve immunoelektroforezdir.

Immunodiffuzyon Teknikleri

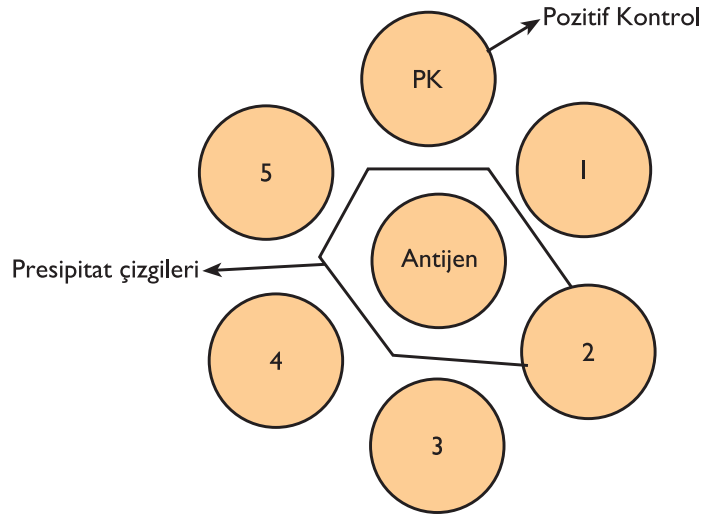
Antijen ve antikor molekülleri arasındaki presipitasyon reaksiyonunu yarı katı ortamlarda ortaya koyan teknikleri içerir. Uygun koşullarda inkube edilen antijen ve antikor moleküllerinin yarı katı agar içinde diffuzyonla ilerleyerek karşılaştıkları yerlerde reaksiyona girmesi ve beyaz, opak presipitat bantları oluşturması esasına dayanır. İmmunodiffuzyon teknikleri tek yönlü veya çift yönlü immunodiffuzyon tekniği olarak uygulanmaktadır.

Tek Yönlü İmmunodiffuzyon Tekniği: “Oudin Yöntemi” olarak da bilinir. Bu yöntemde, şüpheli serum sıvı haldeki agaroz jele karıştırılarak agar tüpte soğumaya ve katılaşmaya bırakılır. Agar katılaştıktan sonra sıvı haldeki antijen tüpün yüzeyine ince bir katman olarak eklenir. Antijen yarı katı agarın yüzeyinden tüpün dibine doğru diffuzyon ile yayılır ve agar içinde bulunan şüpheli serumda eğer antikor varsa antijen ile karşılaştığı yerde presipitat çizgileri oluşturur. Bu teknik ile sadece bir antijen antikor reaksiyonu incelenebilir.

Çift Yönlü İmmunodiffuzyon Tekniği: “Ouchterlony Yöntemi” olarak da bilinen bu yöntem ile aynı test ortamında birden fazla sayıdaki şüpheli serumu veya antijeni immunodiffuzyon tekniği ile incelemek mümkündür. Bu yöntem pratikte Agar Jel Presipitasyon (AGP) testi olarak da bilinir. AGP testi ile çeşitli hastalıkların tanısı konulabildiği gibi antijen moleküllerinin arasındaki ilişki de tanımlanabilir. AGP testi ile hastalıktan şüpheli hayvanların kan serumlarında antikor varlığı incelenir, ayrıca çeşitli vucut sıvıları veya doku vb. örneklerinde antijen varlığı da ortaya konabilir. Bu durumda incelenecek antikor veya antijene spesifik bilinen antiserum veya antijen kullanılması gerekir. Bu testte kullanılan agar bazı farklı ve özgün özellikler taşır. Test ortamında spesifik antijen ve antikor moleküllerinin diffuzyon ile ilerlemesi ve karşılaştıkları yerde presipitat bantı oluşturabilmesi için agarın elektrolit dengesinin sağlanması önemlidir. Bu amaçla kullanılan yöntemde göre agar içine çeşitli elementlerden hazırlanmış çözeltiler katılabilir. Ayrıca hazırlanan agarın yarı katı özellikte olması önemlidir. Bu nedenle test ortamı genellikle % 0.1 - 0.8 oranında agar içerir. Test mikroskop lamı veya petri kütularına dökülmüş agar ortamında uygulanır. Plastik veya cam petri kaplarında ya da lamda bulunan jelin kalınlığı, açılacak çukur sayısı, çukurların çapı ve çukurların birbirinden uzaklıkları da farklılık göstermektedir. Agar üzerinde genellikle merkezde bir, çevresinde 6 olmak üzere toplam 7 adet çukur açılır. Testte şüpheli serumlarda antikor varlığının incelendiği durumlarda; ortadaki çukura bilinen spesifik antijen konur. Çevresindeki kuyucuklara ise incelenen serum örnekleri yerleştirilir. Oluşan reaksiyonun net olarak değerlendirilebilmesi, nonspesifik bantların ayırt edilebilmesi için çevredeki kuyucuklardan birine pozitif kontrol serum örneğinin konulması yararlıdır. Böylece bilinen antijen ve antikor arasında oluşan presipitat çizgisinin diğer örneklerde oluşacak presipitat çizgileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi açısından önemlidir. Nemli ortamda, birkaç günlük inkubasyon süresi sonunda sonuçlar incelenir (Şekil 10.8).

Şekil 10.8

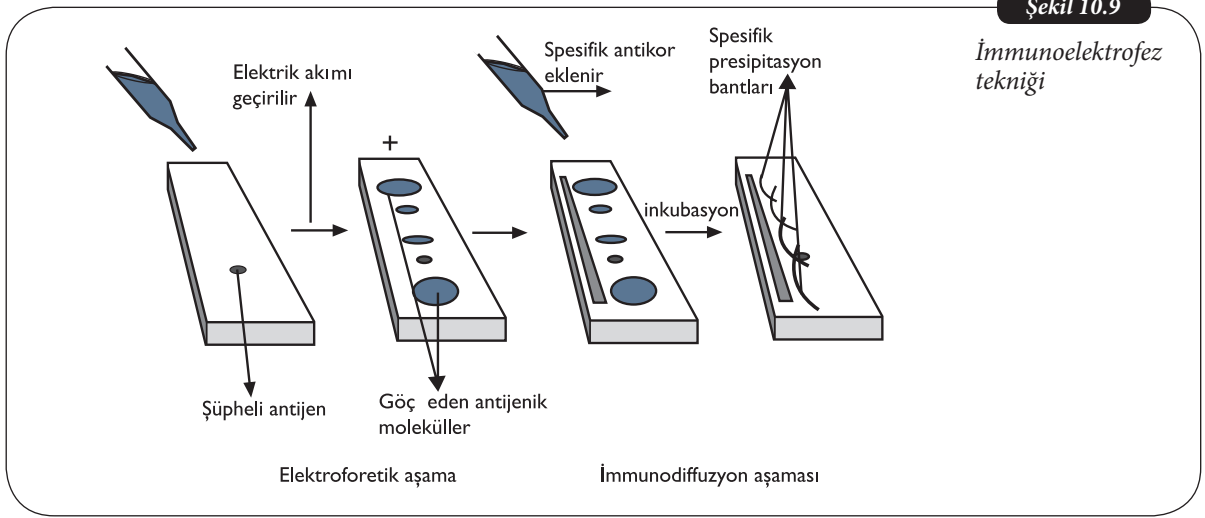
Çift Yönlü
İmmunodiffüzyon
Tekniği: 1, 3, 4 ve
5 nolu örnekler
pozitif, 2 nolu örnek
negatif.



Radial İmmunodiffüzyon Tekniği: Jel ortamında immunodiffüzyon tekniğinin uygulandığı diğer bir yöntemdir ve “Mancini Yöntemi” olarak da bilinmektedir. Radial immunodiffüzyonun en önemli avantajı aynı zamanda miktar tayini yapılabilmesidir. Bu teknikte agar içine antiserum karıştırılır ve petri kabına dökülerek katılaşması sağlanır. Ortasına açılan kuyucuk içine incelenecek antijen konur ve inkubasyona bırakılır. İnkubasyon süresi sonunda antijen kuyucuğunun çevresinde dairesel presipitasyon bantı oluşur. Antijenin agar içinde diffüzyon ile yayılması sonucu oluşan presipitasyon halkasının çapı antijenin konsantrasyonu ile direkt olarak ilişkilidir. Bu tekniğin en yaygın kullanım alanı, serum proteinlerinin miktarlarının saptanmasıdır. Örneğin kan serumundaki IgG, IgM, lizozim, komplement vb. proteinler bu yöntem ile saptanır.

İmmunoelektroforez Teknikleri

Kompleks yapıları antijenik moleküller ile yapılan jel diffüzyon tekniklerinde, presipitat bantlarının tam olarak oluşmadığı durumlarla karşılaşılabilir. Bu durumlarda immunoelektroforezis yöntemi daha net sonuçlar vermektedir. İmmunoelektroforezis, önce ortama elektrik verilerek sağlanan elektroforetik aşama ile daha sonra uygulanan immunodiffüzyon aşamasından oluşur. Bu yöntemde uygun koşulları taşıyan agar ince bir katman halinde dökülerek dondurulur. Ortasına bir kuyucuk açılarak incelenecek antijen örneği konur ve elektrik akımı geçirilerek elektroforeze tabi tutulur. Bu aşamada incelenen örnek içindeki antijenik moleküller elektrik yüklerine göre farklı alanlara göç ederler. İkinci aşamada kuyucuğun ön kısmına ve elektroforez yönüne paralel olarak ince bir kanal açılır ve bu kanala incelenen örneğe spesifik antiserum eklenir ve inkübe edilerek diffüzyonu sağlanır. İnkubasyon süresi sonunda antiserum içindeki antikorlar diffüzyon ile ilerleyerek agar içinde farklı yerlere göç etmiş antijen molekülleri ile karşılaştıkları yerlerde presipitasyon bantları oluştururlar (Şekil 10.9).



İmmunoelektroforez tekniği diğer immunodiffuzyon tekniklerine göre bazı avantajlara sahiptir. Öncelikle elektriksel alanda göç ettirilen protein molekülleri çok daha net birbirlerinden ayrılır ve farklı alanlara göç ederler. Böylece antikorların agar içinde diffuzyon ile yayılmasından sonra oluşan presipitasyon bantları diğer tekniklere göre daha açık ve temiz bir görüntü verir. İmmunodiffuzyon teknikleri birkaç günlük inkübasyon süresine ihtiyaç duyarken elektroforez ile daha kısa sürede sonuç alınabilmektedir. İmmunoelektroforez tekniği ile serum proteinlerinin içerikleri incelenerek herhangi bir anomali (kongenital eksiklikler veya myelomaya bağlı yüksek protein düzeyi gibi) olup olmadığı saptanır. Ayrıca vücut sıvılarında çeşitli antijenik moleküllerin varlığı da bu yöntem ile incelenmektedir.

Aglutinasyon

Aglutinasyon, partiküler yapıdaki antijen ile homolog antiserumun bir araya gelmesi sonucu oluşan reaksiyonlara verilen isimdir. Aglutinasyon reaksiyonunda antijen partikül halindedir ve bivalan yapıdaki spesifik antikorlar ile reaksiyona girdiklerinde kümelenirler. Aglutinasyon reaksiyonlarına katılan antijenlere aglutinojen, antikorlara ise aglutinin adı verilir. Aglutinojenlere örnek olarak bakteriler, kan hücreleri verilebilir. IgG ve IgM'ler güçlü aglutininlerdir. Aglutinasyonun mekanizması diğer sekonder bağlanma testlerinde olduğu gibi iki basamaklıdır. İlk basamakta aglutinojen ve spesifik aglutinin bir araya gelerek spesifik determinantları ile bağlanırlar. Bu dönem reversible (geriye dönebilir)'dir ve ısı, pH, elektrolit dengesi gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. İkinci basamakta ise antijen - antikor moleküllerinin determinantları arasındaki bağ oluşan köprüler ile güçlenir ve irreversible (geri dönmeyen) immunkompleks oluştururlar. Bir araya gelen antijen-antikor moleküllerinin bu kompleks yapıyı oluşturmalarına lattice (örgü) kuramı adı verilir. Oluşan bu kompleks yapı daha sonra kendi ağırlığı ile dibe doğru çöker ve gözle görülebilir bir çökelti oluşturur, bu çökeltiye "aglutinat" adı verilir. Aglutinasyon testleri başlıca; kan serumunda spesifik antikor saptanması veya vücut sıvılarında antijen saptanması, kan grubu belirlenmesi amaçları ile uygulanan ve kısa sürede sonuç veren testlerdir.

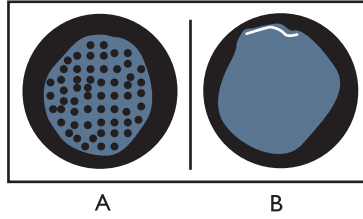
Laboratuvarlarda farklı tekniklerle uygulanan çeşitli aglutinasyon testleri bulunmaktadır.

Çabuk Lam Aglutinasyon Testi: Lam üzerinde uygulanan ve birkaç dakika gibi kısa sürede yanıt veren testlerdir. Bu teknikte bir öze dolusu yoğun bakteri suspansiyonu bir öze dolusu yoğun antiserum ile bir lam üzerinde bir araya getirilerek karıştırılır ve homojenize edilir. Pozitif reaksiyon aglutinasyon sonucu birkaç dakika içinde oluşan tipik granüllerin gözlenmesi ile saptanır. Negatif reaksiyonda ise antijen-antikor karışımı homojen bir yapıda gözlenir (Şekil 10.10).

Bu test şüpheli kan serumunda antikor varlığını ortaya koymak veya bakterilerin identifikasyonu amaçları ile uygulanmaktadır. Lam aglutinasyon testinde incelenen örnekte antijen veya antikorun titresinin saptanması mümkün olmayıp sadece var veya yok şeklinde sonuç elde edilir.

Şekil 10.10

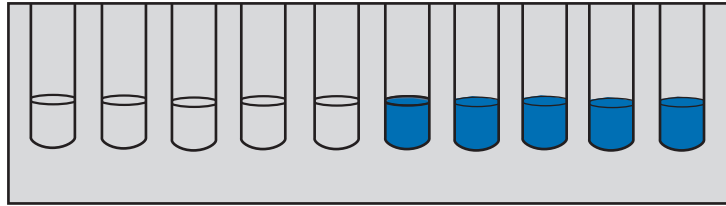
Çabuk lam
aglutinasyon testi
A: pozitif
B: negatif



Tüp Aglutinasyon Testi: Tüp aglutinasyon testleri antijen veya antikor titresinin belirlenmesi amacı ile uygulanır. Çoğunlukla şüpheli hayvanlara ait kan serumlarında antikor titresinin belirlenmesi amacı ile uygulanan bu testlerde; serumun bir seri sulandırması yapılarak üzerine bilinen antijenden eşit miktarda eklenir. İnkubasyon süresi sonunda pozitif reaksiyonda; antijen antikor kompleksi tüpün dibinde dantela şeklinde bir çökelti oluşturur ve tüpün üst kısmı berrak bir görüntü alır. Negatif reaksiyonda ise tüpün üst kısmı bulanık yapıda olup, tüpün dibinde birleşmemiş antijen moleküllerinin kendi ağırlıkları ile çökmesi sonucu oluşmuş düşme şeklinde bir görüntü vardır (Şekil 10.11).

Şekil 10.11

Tüp aglutinasyon
testi.



SIRA SİZDE



Titre nedir? Nasıl belirlenir?

Diğer Aglutinasyon Testleri: Yukarıda açıklanan lam ve tüp aglutinasyon testleri laboratuvarlarda en sık kullanılan testlerdir. Bu testler dışında süt halka (ring) testi, vaginal mukus ile aglutinasyon, seminal plazma ile aglutinasyon, pasif aglutinasyon testi, antiglobulin (Coombs) testi gibi farklı amaçlarla ve farklı koşullarda uygulanan aglutinasyon testleri bulunmaktadır.

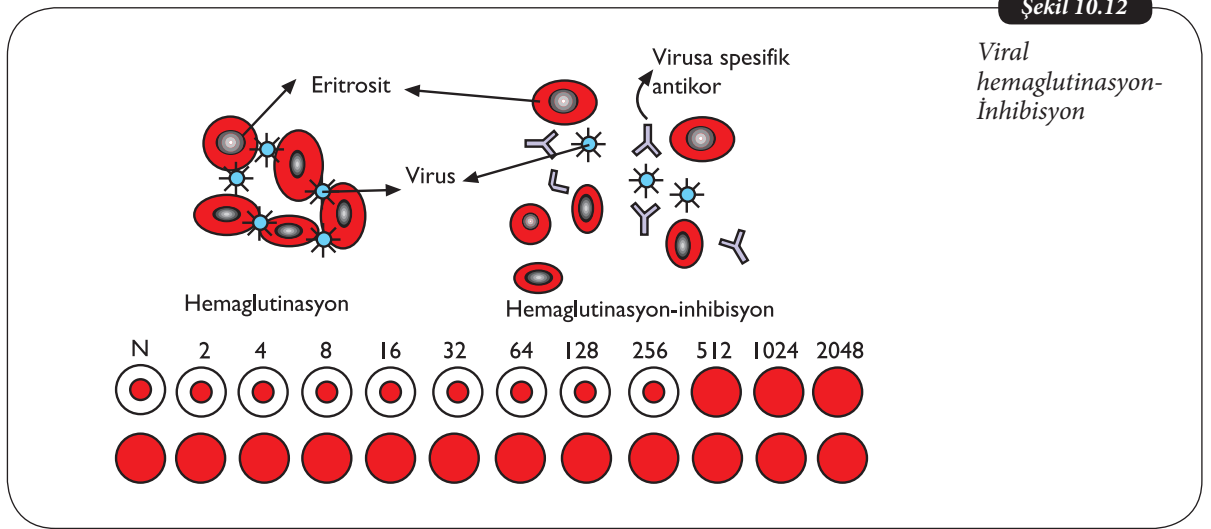
K İ T A P



Aglutinasyon testlerinin diğer uygulama yöntemlerine K.Serdar DİKER'e ait İmmunoloji (Medisan Yayın Serisi:37, İkinci Baskı 2005) kitabından ulaşabilirsiniz.

Viral Hemaglutinasyon ve İnhibisyonu

Bazı viruslar memeli veya kanatlı eritrositlerine bağlanarak kümelenendirme ve aglutine etme özelliğine sahiptir. Hemaglutinasyon (HA) olarak tanımlanan bu özellik serolojik bir reaksiyon değildir ve sadece bu özelliğe sahip virusların karakterizasyonu amacı ile kullanılır. Hemaglutinasyon inhibisyon ise; HA özelliğine sahip viruslara karşı oluşan spesifik antikorlar aracılığı ile bu virusların HA özelliklerinin ortadan kaldırılması, diğer bir ifade ile inhibe edilmesidir. Bu reaksiyon temel alınarak geliştirilen hemaglutinasyon-inhibisyon (HI) testi ile HA özelliğine sahip virusların oluşturduğu hastalıkların tanısı konulmakta veya bu virusların identifikasyonu yapılmaktadır. HI testinin mekanizması; HA özelliğine sahip antijen (virus) ile spesifik antikorunun bir araya gelerek reaksiyona girmesi ve ardından ortama eklenen eritrositlerin bu viruslar tarafından aglutine edilememesidir (Şekil 10.12).



Reaksiyona ikinci aşamada eklenen eritrositler oluşan HI reaksiyonunun görülebilir olmasını sağlayan indikatör hücrelerdir. HA özelliğine sahip viruslar arasında orthomyxoviruslar, paramyxoviruslar, flaviviruslar, bunyaviruslar, coronaviruslar, adenoviruslar, reoviruslar, parvoviruslar bulunmaktadır. Ayrıca mycoplasmalar gibi bazı bakterilerde de HA özelliği bulunmaktadır.

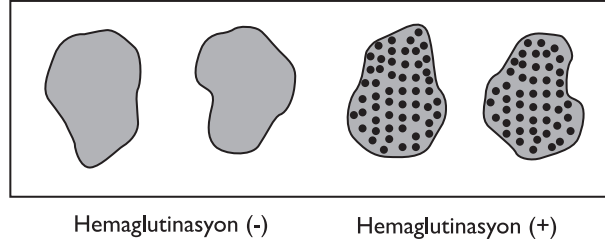
Viral Hemaglutinasyon Testi

Viral HA testi; virusların tanımlanması ve HI testinde kullanılacak virusun (antijenin) HA titresini saptanması olmak üzere başlıca iki amaçla uygulanır. HA testi virus ile eritrositler arasında gerçekleşen bir reaksiyondur ve reaksiyona antikor molekülü katılmadığı için serolojik bir test değildir. HA testleri lamda veya tüpte olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmaktadır.

Çabuk Lam HA Testi: Virusların identifikasyonu amacı ile uygulanan bu testte, temiz bir lam üzerine bir damla %2'lik eritrosit konur ve üzerine bir damla antijen eklenir. Birkaç saniye içinde gözlenen kümeleşmeler pozitif olarak değerlendirilir (Şekil 10.13)

Şekil 10.13

Çabuk lam
hemaglutinasyon
testi



Mikropleyt: Mikrolitre düzeyinde küçük miktar sıvılarla çalışma olanağı sağlayan, üzerinde 6-96 adet göz bulunan sert malzemelerden yapılmış laboratuvar gereçleridir.

Yavaş Tüp HA Testi: Antijenin iki katlı dilusyonları yapılarak ardından bütün tüp- lere eşit miktarlarda %1-2'lik eritrosit suspansiyonundan eklenir. Oda sıcaklığında 30-45 d. inkubasyona bırakılır. Pozitif reaksiyonda tüpün dibinde dantela şeklinde bir çökelti oluşur. Pozitif reaksiyonun gözlemlendiği en yüksek antijen sulandırması be- lirler ve incelenen enfeksiyonun özelliğine göre standart HA ünitesi de dikkate alı- narak antijenin (virusun) HA titresini hesaplanır. Bu test, HI testi öncesinde antijenin HA titresinin belirlenmesi amacı ile uygulanır. Günümüzde pratik olması açısından HA ve HI testleri **mikropleytlere** uygulanmaktadır (Şekil 10.14)

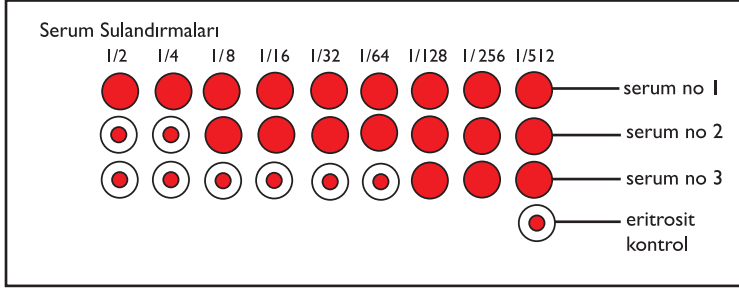
Şekil 10.14

Mikropleytle
hemaglutinasyon
testi

Serum No	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Pos.	Neg.	Titre
1	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	●	○	64
2	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	●	○	8
3	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	●	○	512
4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	<2
5	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	●	○	32
6	○	○	●	●	●	●	○	○	○	○	●	○	128
7	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	●	○	32
8	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	4

Viral Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi: Antikor aranması amacı ile uygulanan HI testinde, ilk aşamada şüpheli serumun iki katlı dilusyonları yapılır ve ardından HA titresini daha önce belirlenmiş bilinen antijen tüm dilusyonların üzerine eşit miktarda eklenir. Uygun ısıda ve sürede inkübe edilen karışımın üzerine %1-2'lik eritrosit suspansiyonundan eklenir ve tekrar uygun ısıda ve sürede inkübe edilir. Şüpheli serumda antikor varlığında antijen ve antikor ilk aşamada reaksiyona girer ve ikinci aşamada ilave edilen eritrositler açıkta kalarak kendi ağırlıkları ile çökerler. Sonuçta pozitif reaksiyonlarda dipte düğme şeklinde eritrosit kümelenmesi gözlenir. Şüpheli serumda antikor bulunmadığı durumda ise, ilk aşamada bilinen antijen antikor ile reaksiyona girmeyeceği için ikinci aşamada eklenen eritrositler ile reaksiyona girer ve aglutine eder. Sonuçta negatif reaksiyonlarda dipte aglutine olmuş eritrositler dantela şeklinde gözlenir (Şekil 10.15).

Şekil 10.15



Viral hemaglutinasyon İnhibisyon Testi:
 1 nolu serum: negatif
 2 nolu serum: 1/4
 3 nolu serum: 1/64

Pozitif reaksiyonun (hemaglutinasyon inhibisyonun) gözleendiği en yüksek serum sulandırması belirlenir ve incelenen hastalığın özelliğine göre standart HA ünitesi de dikkate alınarak serumun HI titresi hesaplanır. Veteriner hekimlikte özellikle kanatlı hayvanların infeksiyonlarının tanısı amacı ile sıklıkla kullanılan testlerden biridir.

Viral hemaglutinasyon ve inhibisyon testlerinde HA üniteleri ile birlikte titre hesaplanmasına Ayşin ŞEN'e ait İmmunoloji-Seroloji Dersi Uygulama Notları (U.Ü. Veteriner Fakültesi, 2010) ders notundan ulaşabilirsiniz.



K İ T A P

Komplement Fiksasyon

Komplement antijen-antikor reaksiyonlarına katılarak hücre lizisine neden olan bir serum proteindir. Örneğin bir eritrosit hücresi ile spesifik antikor bir araya getirilirse ve ortamda komplement varsa antijen(eritrosit)-antikor kompleksine bağlanan komplement eritrositi lize eder. Komplement fiksasyon (CF) testi komplementin bu özelliğinden yararlanarak serumdaki antikor varlığını ortaya koyan ikincil bağlanma testidir. Test iki aşamalı olarak uygulanır:

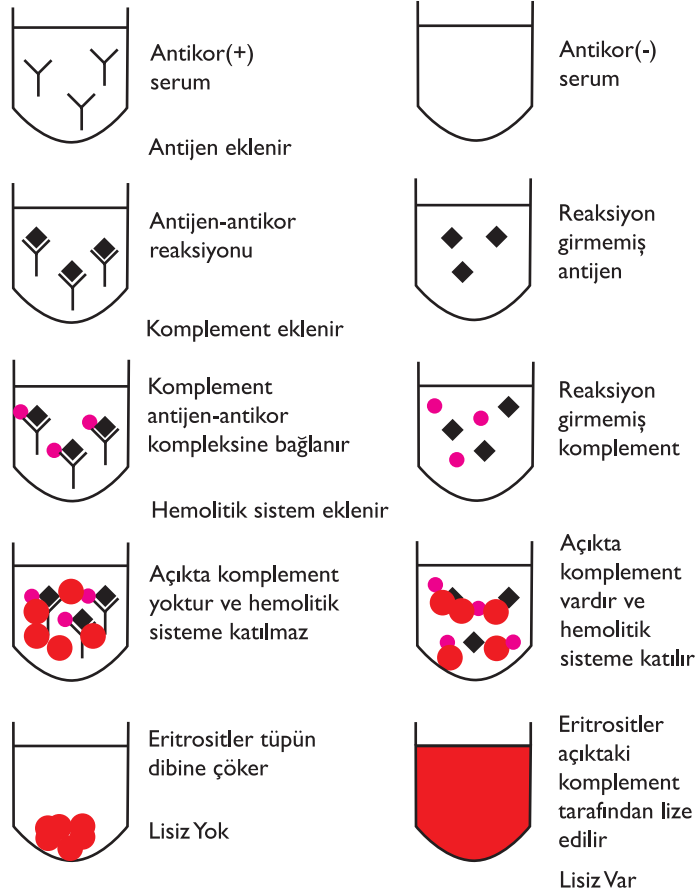
- İlk aşamada; şüpheli serum-bilinen antijen ve komplement kaynağı olarak kobay serumu bir araya getirilir ve inkübe edilir. Testte komplement kaynağı olarak kobay serumunun kullanılmasının nedeni, içerdiği komplementin koyun eritrositlerini lize etme özelliğidir. Kullanılan kobay serumu taze ve önceden titre edilmiş olmalıdır.
- İkinci aşamada; inkubasyon süresi sonunda ortama "hemolitik sistem" olarak koyun eritrositi (antijen) ve tavşanda koyun eritrositlerine karşı elde edilmiş antikor (amboseptör) eklenir ve tekrar inkübe edilir.

Testin yorumlanması: Şüpheli serumda antikor varsa; ilk aşamada bilinen antijen ile şüpheli serumdaki antikorlar reaksiyona girecek ve ortamdaki komplement de bu reaksiyona katılarak kullanılacaktır. İkinci aşamada ortama katılan hemolitik sistemde komplement etkili olamayacağından **hemoliz** görülmeyecektir. Diğer bir ifade ile hemolizin görülmemesi sonucun pozitif olduğunun (serumda antikor bulunduğunun) göstergesidir. Şüpheli serumda antikor yok ise; ilk aşamada bilinen antijen ile reaksiyona girecek antikor olmayacağından ortamdaki komplement de kullanılmayacaktır. İkinci aşamada ortama katılan hemolitik sisteme ilk aşamada kullanılmamış olan komplement de katılarak koyun eritrositlerini lize edecektir. Sonuçta hemolizin görülmemesi sonucun negatif olduğunun (serumda antikor bulunmadığının) göstergesidir (Şekil 10.16).

Hemoliz: Eritrositlerin hücre zarının parçalanması sonucu hemoglobin molekülünün açığa çıkması.

Şekil 10.16

*Komplement
fiksasyon testinin
mekanizması*



CF testinde incelenen serumun sulandırılmaları yapılarak titresini de saptanabilir. CF testi güvenilirliği yüksek bir test olmakla birlikte, kullanılan antijen, komplement ve ambioseptörün sürekli titre edilme gerekliliği, taze kobay serumu kullanma zorunluluğu gibi nedenlerle genellikle araştırma ve referans laboratuvarlarında kullanılmaktadır.

Üçüncül Bağlanma Testleri

Üçüncül bağlanma testleri birincil ve ikincil bağlanma testlerinden farklı olarak test sonuçlarının canlı ortamlarda (deney hayvanı, hücre kültürü, embriyolu yumurta) ölçüldüğü testlerdir. Bazı mikroorganizmalar veya antijenik moleküller çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptirler. Bu biyolojik aktivitelere örnek olarak; hayvanlarda hastalık veya ölüme neden olmak, bazı bakterilerin toksin sentezlemesi, bazı virusların çekirdekli hücreleri lize etmesi verilebilir. Mikroorganizmalar veya antijenik moleküller spesifik antikörleri ile bir araya getirilirlerse bu biyolojik aktivitelerini kaybederler. Diğer bir ifade ile spesifik antikörler tarafından bu biyolojik aktiviteler nötralize edilir. Ancak canlı ortamlarda uygulanan bu testlerin değişken faktörleri oldukça fazla olduğundan ve dış koşullardan fazla etkilendiğinden elde edilen sonuçların standardize edilmesi büyük önem taşır. Bu nedenle üçüncül bağlanma testlerinde sonuçlar; test edilen grubun %50'sini infekte eden (ID₅₀) doz veya test edilen grubun %50'sini öldüren (LD₅₀) doz vb. olarak ifade edilir. Üçüncül bağlanma testleri temel olarak iki farklı şekilde uygulanır;

Nötralizasyon Testleri: Nötralizasyon testlerinin temeli antijenlerin biyolojik aktivitelerinin spesifik antikorlar tarafından nötralize edilmesine dayanır. Test iki aşamada uygulanır. İlk aşamada bilinen antijen ile şüpheli serum **in vitro** koşullarda bir araya getirilerek inkübe edilir. İkinci aşama **in vivo** koşullarda gerçekleşir. Bu amaçla ilk aşamada reaksiyona giren karışım deney hayvanı, embriyolu yumurta, hücre kültürü gibi canlı bir ortama verilir ve inkübe edilir. Sonuçta canlı ortamlarda bir değişiklik gözlenmemesi şüpheli serumda antikor bulunduğunu ortaya koyar. Ancak şüpheli serumda antikor yoksa antijen antikor ile reaksiyona girmeyeceği için nötralize olmaz ve sonuçta deney hayvanlarında hastalık veya ölüm, embriyolu yumurta ve hücre kültürlerinde de antijene özgü değişiklikler gözlenir. Nötralizasyon testleri ile bilinmeyen bir virusun identifikasyonu yapılır veya şüpheli serumda antikor varlığı ya da titresi saptanır. **Spesifitesi** ve **sensitivitesi** yüksek testler olmakla birlikte donanımlı ve gelişmiş laboratuarlarda uygulanabilirler.

In vitro: Laboratuvar ortamı veya yapay olarak oluşturulan ortam.

In vivo: Deney hayvanı, hücre kültürü veya embriyolu yumurta gibi canlı ortam.

Spesifite: Bir serolojik testin gerçek negatif sonuçları verme yeteneğinin ölçüsü.

Sensitivite: Bir serolojik testin gerçek pozitif sonuçları verme yeteneğinin ölçüsü.

Koruma (Proteksiyon) Testleri: Koruma testleri nötralizasyon testleri ile aynı temele dayanır ancak tamamen canlı ortamda uygulanması yönü ile farklılık taşır. Koruma testlerinde deney hayvanlarına önce koruma özelliği saptanacak olan spesifik antiserum farklı dilasyonlarda verilir. Ardından hayvanlar standart dozda bilinen **patojenik mikroorganizma** veya toksin ile **eprüve edilir**. Gözlem altında tutulan hayvanlarda ölüm veya hastalık oluşup oluşmadığı incelenir. Şüpheli serumdaki antikor varlığı ve düzeyine bağlı olarak deneme gruplarında yer alan hayvanlarda ölüm/hastalık gibi değişiklikler gözlenir. Koruma testlerinde kullanılan deney hayvanlarında infeksiyonlara duyarlılık, antiserum emilimi gibi çeşitli faktörler bireysel değişkenlik gösterebilir. Bu durum testlerin duyarlılığını olumsuz etkileyen faktörlerdir. Bu olumsuzlukları gidermek için lisanslı deney hayvanları ünitelerinden mümkün olduğunca çok sayıda hayvan temin edilmesi ve testlerde kullanılacak mikroorganizma veya toksinlerin eprüve edilen dozlarının iyi standardize edilmesi gereklidir.

Patojenik mikroorganizma: Hastalık yapma yeteneği olan mikroorganizma.

Eprüve etmek: Bir deneme grubuna standardize edilmiş dozda bilinen patojenik mikroorganizma veya toksin verilmesi.

Antijen-antikor reaksiyonları soyut kavramları içermektedir. Ayrıca serolojik testlerin öğrenilmesinde uygulamanın büyük önemi vardır. Bu nedenle konuların anlaşılır olmasında farklı ve çeşitli görsel unsurların mutlaka kullanılması gereklidir. Farklı kaynaklardan (kitap, internet vb.) resim, video görüntüleri ile konuların pekiştirilmesi yararlı olacaktır.



DİKKAT

Serolojik reaksiyonları şekiller eşliğinde genel olarak tekrar gözden geçirmek için <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/ab-ag-rx.htm> sayfasını inceleyebilirsiniz.



İNTERNET

Özet



Antijen-antikor reaksiyonlarının temel mekanizmasını tanımlamak.

Antijenik moleküller canlı vücuduna girdiğinde kendilerine karşı spesifik antikor oluşumuna neden olurlar. Antijen ve spesifik antikor molekülleri canlı vucudunda (in vivo) veya uygun koşullardaki laboratuvar ortamında (in vitro) bir araya gelerek çeşitli yöntemlerle saptanabilen reaksiyonlar oluştururlar. Antijen antikor reaksiyonları lattice (örgü) kuramı ile açıklanmaktadır. Bu kurama göre; bivalan yapıya sahip bir antikor molekülü iki antijenik moleküle bağlanarak bir reaksiyon oluşturur. Ortamda birden fazla sayıda antijen ve antikor molekülü olduğunda moleküller arasında iki aşamalı olarak meydana gelen spesifik birleşme sonucu çözünmeyen bir immun kompleks yapı oluşur.



Tanı amaçlı kullanılan serolojik testleri ilişkilendirerek karşılaştırmak.

Antijen-antikor reaksiyonları temel alınarak geliştirilen serolojik testler, antijen-antikor reaksiyonlarının iki aşamalı olmasına paralel olarak iki farklı temele dayanmaktadır. Birincil bağlanma testleri olarak tanımlanan grup antijen-antikor reaksiyonunun birinci aşamasını ortaya koyan testleri kapsar. Bu aşamada antijen ve antikor molekülleri uygun reseptörleri ile bağlanmıştır ve henüz gözle görülebilir kümelenme ve çökme oluşmamıştır. Bu nedenle bu gruptaki testlerin sonuçlarının görülebilir şekle dönüştürülmesi için özel işaretleme teknikleri ile hazırlanmış konjugatların kullanılması ve reaksiyonların özel cihazlarla okunması gereklidir. Bu testlerin spesifite ve sensitiviteyi yüksek olduğu için güvenilir testlerdir. ELISA, immunofluoresan tekniği, radyoimmunoassay bu testlere örnek olarak verilebilir. İkincil bağlanma testleri ise antijen-antikor reaksiyonlarının ikinci aşamasını saptayan testleri içerir. Bu aşamada spesifik antijen ve antikor molekülleri bir araya gelerek örgü tarzında kümelenir ve oluşan immun kompleksler çöker. Bu aşama gözle görülebilir özelliktedir. Bu nedenle sonuçların değerlendirilmesi için konjugat ve özel cihazların kullanımına gereksinim göstermezler. Tanı laboratuvarlarında kolaylıkla uygulanabilen bu

testlere örnek olarak aglutinasyon ve presipitasyon testleri verilebilir. Bu iki gruptan ayrı olarak, üçüncül bağlanma testleri olarak tanımlanan grupta ise nötralizasyon ve koruma testleri yer alır. Bu testlerde antijen- antikor reaksiyonlarının sonucu deney hayvanı, embriyolu yumurta, hücre kültürü gibi canlı ortamlarda izlenir. Doğal koşullardaki sonucu yansıtan testler olmakla birlikte kullanılan canlı materyaldeki bireysel farklılıklara dayalı dezavantajlara da sahiptir.



Serolojik testlerin uygulama alanlarını ayırt etmek.

Serolojik testler en basit ifade ile antijen veya antikor saptanması amacı ile uygulanmaktadır. Diğer bir ifade ile serolojik testlerde şüpheli materyalde antijen veya antikor aranır. Bilindiği gibi antikor en fazla kan serumunda bulunur ve bu nedenle antikor aranması için şüpheli materyal olarak kan serumu kullanılır. Antijen aranmasına yönelik serolojik testlerde ise kan, vücut sıvıları, hücre kültürü sıvıları vb. şüpheli materyal kullanılır. Bazı durumlarda besiyerinde üretilmiş bakterilerin veya hücre kültürlerinde üretilmiş virusların identifikasyonu amacı ile de antijen aramaya dayalı serolojik testler kullanılmaktadır. Serolojik testler ile antijen ve antikor titreleri de saptanır. Özellikle yenidoğanların maternal bağışıklığını, aşılama öncesi ve sonrası koruyucu bağışıklığı, hastalıklar sonucu oluşan spesifik antikor yanıtını saptamak için serum antikor titrelerinin saptanması gereklidir.

Kendimizi Sınavalım

- Antijen-antikor reaksiyonlarının iki aşamalı olduğu dikkate alındığında aşağıdakilerden hangisi birincil bağlanma aşamasının özelliklerinden biri **değildir**?
 - Hızlı oluşması
 - Geriye dönüşebilir olması
 - Çıplak gözle görülebilmesi
 - Isıya bağımlı olmaması
 - Antijen ve antikor molekülünün uygun reseptörlerle birbirine bağlanması
- Aşağıdakilerden hangisi ikincil bağlanma testlerinden biridir?
 - ELISA
 - Komplement fiksasyon
 - Radyoimmunoassay
 - İmmunofluoresan
 - İmmunoperoksidaz
- İmmunofluoresan teknikleri ile ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi **yanlıştır**?
 - Birincil bağlanma testidir.
 - Konjugat fluoresan boyalarla işaretlenir.
 - Sonuçlar fluoresan mikroskop altında incelenir.
 - İn vivo uygulanır.
 - Antijen veya antikor saptanır.
- Presipitasyon testi ile ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi **yanlıştır**?
 - Eriyebilir antijen ile spesifik antikorun reaksiyonudur.
 - Sıvı veya yarı katı ortamlarda uygulanır.
 - Sonuçların gözlenmesi için özel alet ve ekipman gereklidir.
 - Serum veya antijenin titresi saptanabilir.
 - Antijen-antikor kompleksine presipitat adı verilir.
- Aglutınasyon ile presipitasyon testleri arasındaki temel fark aşağıdakilerden hangisidir?
 - Reaksiyona katılan antijenin yapısı
 - Reaksiyona katılan antikorun yapısı
 - Uygulama amaçları
 - Konjugat kullanımı
 - Uygulama ortamları
- Aşağıdaki testlerden hangisinde eritrosit hücreleri indikatör olarak kullanılır?
 - Yavaş tüp aglutinasyon
 - Direkt immunofluoresan
 - Radial immunodiffüzyon
 - ELISA
 - Hemaglutinasyon-inhibisyon
- Üçüncül bağlanma testlerini diğerlerinden ayıran temel özellik aşağıdakilerden hangisidir?
 - Uygulama amacı
 - Uygulama ortamı
 - İnkübasyon süresi
 - İnkübasyon ısısı
 - İncelenen şüpheli materyal türü
- Aşağıdakilerden hangisi komplement fiksasyon testine katılan reagentlerden biri **değildir**?
 - Amboseptör
 - Antijen
 - Antikor
 - Kobay serumu
 - Konjugat
- Radyoimmunoassay tekniklerinin rutin tanı laboratuvarlarında uygulanan testlerden biri olmamasının sebebi aşağıdakilerden hangisidir?
 - İnkübasyon süresinin uzun olması
 - Canlı materyal kullanımı gerektirmesi
 - Radyoaktivite riski olması
 - Yeterli duyarlılıkta olmaması
 - Standardizasyonunun zor olması
- Viral hemaglutinasyon ile ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi **yanlıştır**?
 - Eritrosit kullanılır.
 - Kolay uygulanır.
 - Serolojik bir testtir.
 - Antijenin titresi saptanır.
 - Lamda, tüpte veya mikropleytlerde uygulanır.

Kendimizi Sınavalım Yanıt Anahtarı

1. c Yanıtınız yanlış ise “Serolojik reaksiyonların iki basamağı” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
2. b Yanıtınız yanlış ise “İkincil bağlanma testleri” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
3. d Yanıtınız yanlış ise “İmmunofluoresan teknikleri” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
4. c Yanıtınız yanlış ise “Presipitasyon” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
5. a Yanıtınız yanlış ise “İkincil bağlanma testleri” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
6. e Yanıtınız yanlış ise “Viral hemaglutinasyon ve inhibisyonu” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
7. b Yanıtınız yanlış ise “Üçüncül bağlanma testleri” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
8. e Yanıtınız yanlış ise “Komplement fikzasyon” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
9. c Yanıtınız yanlış ise “Radyoimmunoassay” konusunu tekrar gözden geçiriniz.
- 10.c Yanıtınız yanlış ise “Viral hemaglutinasyon ve inhibisyonu” konusunu tekrar gözden geçiriniz.

Sıra Sizde Yanıt Anahtarı

Sıra Sizde 1

Tabii ki burada bildirilen ELISA teknikleri dışında başka teknikler de bulunmaktadır. Örneğin, yarışmacı (kompetitif) ELISA tekniği hem antijen hem de antikor aranması amacı ile farklı olarak uygulanabilen bir tekniktir. Bu teknikte bilinen antijen ile kaplı test ortamına antijene spesifik bilinen antikorlar ile şüpheli serum birlikte eklenir ve böylece antijene bağlanmak üzere antikorlar arasında bir yarışma ortamı oluşturulur. Bunun dışında da farklı ELISA teknikleri bulunmaktadır. Laboratuvarlarda amaca uygun seçilen ELISA teknikleri ile hastalık tanıları yapılır.

Sıra Sizde 2

Enzim İmmunoassay olarak bilinen ve enzim ile işaretleme esasına dayanan başka birincil bağlanma testleri bulunmaktadır. Bunlar arasında immunoperoxidaz (IP) ve immunoblot teknikleri yer almaktadır. IP tekniği özellikle dokulardaki antijen varlığını işaretli antikorlar aracılığı ile ortaya koyan immunohistokimyasal tekniklerdir. İmmunoblot teknikleri içinde en bilineni Western blotting yöntemidir. Bu yöntem özellikle bir karışım içinde yer alan protein yapılı antijenleri veya bu antijenlere spesifik antikorları ayırt etmek amacı ile kullanılır. Son yıllarda özellikle kliniklerde geniş kullanım alanı bulan “strip testler” de enzim işaretli testlerdendir ve kolay uygulanabilir olması, kısa sürede yanıt vermesi nedeni ile oldukça pratik testlerdir.

Sıra Sizde 3

Serolojik testlerde özellikle ELISA, IF gibi pirmer bağlanma testlerinde kullanılan reagentler araştırma laboratuvarlarında araştırmacılar tarafından bizzat hazırlanır. Örneğin; ELISA’da ilk basamakta kullanılan antijen veya antikor kaplı polisteren yüzeyler (pleyt vb.) ya da IFA’da kullanılan üzerine antijen fikze edilmiş lamalar testleri uygulayanlar tarafından uygun yöntemlerle hazırlanır. Rutin tanı laboratuvarlarında ise genellikle hazır kitler kullanılmakta ve bu kitler içinde testlerde kullanılan tüm reagentler kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

Sıra Sizde 4

Serolojik testlerde antijen veya antikor varlığının ortaya konulması önemli olmakla birlikte, bazı durumlarda bu yeterli olmayıp amaca göre antijen veya antikorun düzeyinin diğer bir ifade ile titresinin belirlenmesi de gerekir. Örneğin serum titresinin belirlenmesi için; bir seri serum sulandırması yapılarak her bir sulandırma üzerine eşit miktarda bilinen antijen eklenir. Pozitif reaksiyonun görüldüğü en yüksek serum sulandırmasının karşılığı serum titresi olarak ifade edilir. Eğer antijen sulandırması yapılmış ise; bu kez spesifik antikor ile reaksiyon veren en yüksek antijen sulandırması antijen titresi olarak ifade edilir.

Yararlanılan Kaynaklar

- Crowther, J.R. (2009). **Methods in Molecular Biology 516, The ELISA Guidebook**, NY, Humana.
- Diker, K.S. (2005). **İmmunoloji**, Ankara: Medisan Yayınevi.
- Hudson, L., Hay, F.C. (1991). **Practical Immunology**, Oxford: Blackwell.
- Özbal, Y. (1994). **Temel İmmunoloji**, İstanbul, Nobel Yayınevi.
- Tizard, I.R. (2000). **Veterinary Immunology An Introduction**, USA: W.B. Saunders Company.
- Todd, I., Spickett, G. (2005). **Immunology Lecture Notes**, USA, Blackwell.
- Anonim. <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/ab-ag-rx.htm>
- Anonim: <http://sumanasinc.com/webcontent/animation/content/ELISA.htm>