

İMMUNOLOJİ ve SEROLOJİ UYGULAMA DERS NOTLARI

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2014-2015 EĞİTİM ÖĞRETİM YILI

PROF. DR. SEYYAL AK
DOÇ. DR.SERKAN İKİZ
DOÇ. DR. A.FUNDA BAĞCIGİL

İmmunoloji ve Seroloji Uygulama Notları

Antijen- Antikor-İmmunizasyon

Vücutta spesifik antikor sentezini uyarabilen ve meydana gelen antikorlar ile özel reaksiyon verebilen maddelere ANTİJEN denir. Vücuda verildiklerinde ya da girdiklerinde spesifik bir immün yanıt (sıvısal, hücrenel, tolerans vb gibi) oluşturabilen maddelere de İMMUNOJEN adı verilir.

Vücutta antikor sentezini uyarmayan, ancak kendisine karşı meydana gelmiş antikorlarla in vitro spesifik birleşme yeteneğine sahip olan maddelere de HAPTEN denir.

İmmunizasyon; bağışıklama, hastalığa karşı bağışık kazandırma ya da antiserum hazırlamak için vücuda antijen verilmesidir. Bir antijeni bir canlıya verdikten belli bir süre sonra o canlıda antijene spesifik antikorlar oluşur. Bu hayvanın kanı alınır ve serumu çıkartılırsa, elimizdeki seruma antiserum ya da immün serum adı verilir. Ancak antijenin bir defa verilmesiyle elde edilen serumdaki antikor titresi (miktar) düşük olabilir. Genellikle belli bir orandan yüksek titrede immün seruma gereksinim duyulur ki bu amaçla aynı antijen birden fazla olmak üzere canlıya verilir ve birkaç inokulasyondan sonra kan serumu alınır. Bu serumdaki antikor titresi artık yüksek bir değerdedir ve bu seruma hiperimmün serum adı verilir.

İMMUNİZASYONU ETKİLEYEN BAŞLICA FAKTÖRLER

A- ANTİJENE BAĞLI OLAN FAKTÖRLER

(İmmunojeniteyi belirleyen faktörler)

1- Molekül ağırlığı: Bir maddenin immunojenik olabilmesi için molekül ağırlığının genellikle 10.000 Dalton'dan fazla olması gerekir. Büyük moleküller fazla sayıda antijenik determinanta sahip olduklarından daha iyi antijenik uyarım yapmaktadırlar.

2- Vücuda yabancılık: Bir antijen vücut için ne kadar ayrı özellikte (genetik, kimyasal, fiziksel) ise o kadar fazla immunojenik uyarım yapabilir.

3- Molekülün yapısı, kompleksitesi: Antijenik özellikteki molekülde bulunan determinant gruplarının belli bir kimyasal yapıda ve sağlamlıkta olması gereklidir. Örneğin; bir protein olan jelatin zayıf bir moleküler yapıya (az sayıda aminoasitlere) sahip olması nedeniyle antijenitesi de o oranda azdır. Kompleks yapıda olanlar (glikoprotein, lipoproteinler, vb) daha iyi bir uyarım yaparlar.

4- Molekülün stabilitesi: İmmunojenlerin vücutta hemen parçalanması ve özellikle antijenik determinantlarının dağılması, bunların lenfoid ve miyeloid sistem hücrelerine ulaşmadan ya da bir uyarım yapmadan dışarı atılmasına, enzimlerle ayrışmasına ya da fagositik hücrelerce yok edilmesine neden olmaktadır.

5- Antijenlerin eriyebilirliği: İmmun sistemin uyarılmasında antijenlerin partüküler ya da eriyebilir olmalarının da rolü vardır. Eriyebilir olanların daha iyi immunojenik olabildikleri bilinmektedir ancak böyle substansların antijenik determinantlarında sağlam olması ve bütünlüklerinin bozulmaması önemlidir.

6- Vücuda veriliş ya da giriş yolu: İmmunojenik substanslar vücuda parenteral verildiklerinde oral yolla verildiklerine oranla daha fazla etkin olmaktadır. Parenteral yollarda da farklılıklar vardır. Örneğin damar ve periton içine verilen immunojenler deri altı ya da kas içinden daha yüksek titrede antikor oluşumuna neden olabilirler.

7- Antijenin miktarı: Antijenlerin saptanabilir bir yanıt oluşturabilmesi için uygun bir yoldan belli bir doz ve miktarda verilmesi gerekmektedir. Çok az miktarda verilen antijenler immunkompetent hücreleri uyarmadan parçalanmalarına ve atılmalarına neden olurlar (immün tolerans). Çok fazla antijen olduğunda B-lenfositlerin tüm yüzeysel reseptörlerini bloke eder ve antikor oluşumunu engeller.

8- Antijenin aktif (canlı) olması: Aktif antijenler inaktiflere oranla daha iyi uyarım yaparlar.

9- Antijenlerin hazırlanma teknikleri: Hazırlık işlemleri sırasında antijenik determinantların parçalanmamaları ve antijenik molekül yüzeyinde çok sayıda determinantın bulunması uyarımın etkili olmasına yardımcı olur.

Bakteriyel antijenler:

a) Flagella antijeni (Flagellin, H-antijeni): Globuler yapıda bir polimer özelliğindedir.

b) Pilus antijeni (pilin): Protein yapısında olup, 160 L-aminoasit içeren bir antijendir.

c) Kapsül antijenleri: *B. anthracis*'in kapsülü polipeptid, yapısında iken bakterilerin neredeyse tamamına yakınında kapsül polisakkarid yapısındadır.

d) Somatik antijenler (hücre duvarı antijeni, O- antijeni): Bakterilerin hücre duvarında polisakkaridler, lipopolisakkaridler, proteinler, lipidler gibi değişik immunolojik özellikte ve kompleks yapıda substanslar bulunmaktadır.

e) Sitoplazmik membran antijenleri: Proteinlerle birlikte birleşik halde bulunan lipidler (lipoprotein) antijeniteyi sağlamaktadır.

f) Spor antijenleri

g) Nükleik asitler

h) Ekzotoksin, toksik substanslar, toksoidler

Isı antijeni hazırlanması:

1. 24 saatlik katı kültürlerden yoğun süspansiyon hazırlanır.
2. 4000 rpm de 40 dakika süreyle santrifüje edilir.
3. Üstteki sıvı (süpernatant) atılır.
4. Tortu (pelet) üzerine 10 ml steril PBS (/FTS) ilave edilir.
5. Yıkama işlemi 3 kere tekrar edilir.
6. Dipteki tortu yaklaşık 5 kat oranında sulandırılır.
7. 100 °C de 30 dakika ısıtılır. 4000 rpm de 30 dakika süreyle santrifüje edilir.
8. Süpernatant antijen olarak kullanılır.

B- KONAĞA AİT OLAN FAKTÖRLER

Konağın duyarlılığı: Bu durum daha çok genetik durumla ilişkilidir. Eğer konak duyarlı değilse mikroorganizma vs ne kadar antijenik olsa da bir immun yanıt elde etmek mümkün olmayacaktır. Örneğin siğir vebası virusu tek tırnaklılarda bir uyarım yapmaz.

Konağın bağışıklık durumu: Maternal antikörlerin varlığı ya da daha önceki aşılama ya da infeksiyonlar sonucu oluşan doğal antikörlerin varlığı immunizasyon çalışmalarını etkelemektedir. Konakta immunosupresif bir hastalık olması durumu.

Hayvanların genetik yapısı: Aynı genetik yapıya sahip bireylerin antijenleri birbirleri için genellikle zayıf antijenik karakterdedir.

Hayvanların yaşı: Yeni doğanlar ya da çok genç olanların immun sistemleri henüz gelişimini tamamlamadığı için daha zayıf reaksiyon/tepkime gösterirler.

Hayvan türü: Bir hayvan türü için antijenik olan substans diğer hayvan türü için zayıf antijenik olabilir.

C- ÇEVRESEL KOŞULLARA BAĞLI FAKTÖRLER

Fiziksel (fazla soğuk ya da sıcak, rutubet...) ve kimyasal faktörler (gıda, ilaçlar, hormonlar....), biyolojik nedenler.

D- DİĞER

Aksesör hücreler, T- hücrelerine bağlı nedenler, Sitokinlere bağlı nedneler, Antikorlara bağlı nedenler.

ADJUVANTLAR

Antijen ile birlikte organizmaya verildiğinde o antijene karşı oluşacak immun yanıtı arttıran ve güçlendiren maddelerdir.

Vücuda verilen antijen hızla katabolize olursa immun yanıtı yeterince uzun süre uyaramazlar. Bu nedenle örneğin inaktif aşuların etkinliğini arttırmak için, bu aşuların vücutta daha uzun süre kalmalarını sağlayacak ve immunolojik belleği uyuracak adjuvantlarla birlikte verilmeleri gerekmektedir.

Adjuvantların etki mekanizmaları:

- a- Depo etkisi. Aliminyum tuzları, Freund inkomple adjuvantı. Antijen aliminyum tuzları ile birleştirilip verildiğinde injeksiyon yerinde makrofajlardan zengin bir granulom oluşur ve antijen bu granulom içinden vucuda yavaşça verilir ve uzun süren bir antijenik uyarım sağlar. Freund tam olmayan adjuvantı su/yağ emülsiyonu şeklindedir, injeksiyon yerinde granülom ve apse oluşumuna neden olur, antijen buradan yavaşça salınır.
- b- Makrofaj ya da lenfositleri nonspesifik uyarıcısı. Bakteriyel fraksiyonlar, BCG, LPS, Freund'un komple adjuvantı (FCA). FCA nın içindeki mineral yağ depo

etkisi yaparken, içindeki ölü tüberküloz basili yada bundan elde edilen muramil dipeptid makrofajları uyararak IL₁ salgılanmasını uyarır.

c- Antijen işleme uyarıcısı (örneğin yüzey aktif ajanlar, saponinler)

Adjuvantlar genellikle beş grup altında toplanır.

- 1- Biyolojik maddeler: Freund'un tam adjuvantı
- 2- Kimyasal olarak ayrıştırılmış bakteriyel ve fungal ürünler: LPS
- 3- İmmun sistemin biyolojik ürünleri: Lenfokin, sitokin
- 4- Sentetik biyolojik analoglar
- 5- Kimyasal olarak hazırlanmış maddeler: Aliminyum bileşikler, Freund'un tam olmayan adjuvantı.

Primer ve Sekunder immün yanıt

İmmunolojik olarak ergin bir hayvana ilk defa antijen verildiğinde birçok faktöre bağlı olmak üzere değişen sürelerde (genellikle 5. günden itibaren başlar ve yaklaşık ikinci haftada pik düzeye ulaşır) kanda antikorlar saptanmaya başlar. İlk sentezlenen antikorlar genellikle IgM'lerdir. Bu birincil yanıtta latent dönem daha uzundur ve antiserumdaki antikor miktarı da daha düşüktür ve 1-2 ay içerisinde de bu antikor titresi oldukça düşecektir. Önceden antijen verilmiş bir canlıya aynı antijen tekrar verildiğinde daha kısa sürede antikor sentezi başlar. Bu ikincil

yanıtta sentezlenen antikor titresi daha fazla olup bu antikorların vücutta kalış süreleri de daha uzundur. Sekunder immün yanıtta ise özellikle IgG karakterinde antikorlar sentezlenir.

Yüksek titrede bir hiperimmün serum elde etmek için örnek immunizasyon programı:

0.gün	antijen+Freund'un tam adjuvantı	—————→	deney hayvanı
2.Hafta	antijen+Freund'un tam olmayan adjuvantı	—————→	deney hayvanı
4.Hafta	antijen	—————→	deney hayvanı
5. Hafta	Serolojik testler ile antikor titresi ölçülür. Gerekirse 4.hafta da yapılan işlemler 5. ve 6. haftalarda tekrar edilir.		

AŞILAR, AŞI TÜRLERİ, AŞILAMALARDA DİKKAT EDİLMESİ GEREKEN KONULAR

Aşılar, verildikleri canlıda immün sistemi uyararak vücudu hastalıklara karşı aktif bağışık hale getiren maddelerdir. İdeal bir aşının şu özelliklere sahip olması istenir:

İdeal bir aşı, doğal bir infeksiyonun iyileşmesinden sonra meydana gelen kadar iyi bir direnç oluşturabilmelidir.

İdeal bir aşı uzun süreli bağışık sağlamalıdır.

İdeal bir aşının dayanıklı olması, saklanması ve uygulanmasının kolay olması gerekir.

Aşılanmış hayvanların büyük çoğunluğunda koruyucu düzeyde bir bağışıklığın oluşmasını sağlamalıdır.

Kan serumunda ve dokularda bulunan normal antikorlarla etkilenmemelidir. Yan etkileri olmamalı ya da olabildiğince az olmalıdır.

Aşılama ile sağlanan immun yanıt doğal infeksiyondaki immun yanıtta ayırt edilebilmelidir. Bu durum hastalıkların kontrol ve eradikasyonunda önemlidir.

Canlı bir aşı ise bir hayvandan diğerine yayılmamalıdır.

Eğer bir aşı, yukarıda sayılan maddelerin çoğunu kapsayabiliyorsa iyi bir aşı olarak kabul edilebilir.

Aşı içerisinde, çok çeşitli antijenik yapıya sahip mikroorganizma ya da onların ürünleri bulunur ve yeterli bağışıklığı sağlamak için gerekecek olan minimum antijen miktarı her aşıya göre değişiklik gösterebilir.

Cansız bir aşı bir hayvana ilk defa verildiğinde primer antikor tepkisi genellikle yüksek düzeyde oluşmaz ve meydana gelen antikorlar kısa ömürlüdür. Ancak 2-4 hafta sonra 2. Bir doz aynı inaktif aşı uygulanırsa çok çabuk ve kuvvetli bir tepki meydana getiri ve antikor düzeyi 3-5 gün içerisinde en yüksek seviyeye ulaşır. Bu nedenle inaktif aşılarda kullanılan aşı programlarında, ilk aşından birkaç hafta sonra 2. bir aşı, hatta 3. ve 4. tekrar dozları da uygulanmaktadır. Kullanılan aşı canlı ve attenüe yani zayıflatılmış bir aşı ise, tek doz uygulanması sonucunda da yüksek titrede antikor oluşmaktadır. Çünkü canlı aşı ile organizmaya verilen etken, vücut

dokularında üremeye devam eder ve ürediği sürece antijen üretmeye de devam eder ve sürekli immun sistemi uyarır.

Belirli bir infeksiyöz hastalığı aşılama yoluyla önleyebilmek için, öncelikle dikkat edilmesi gereken dört kriter vardır:

- İmmun yanıtın hastalıktan korunmayı sağlayıp sağlayamayacağı bilinmelidir. Aşının koruyucu antijenleri içermesi de önemlidir.
- Aşılama ile alınacak riskler hastalığın vereceği zarardan fazla olmamalıdır. (Canlı aşılar, aşılama sonrası oluşacak antikorlar serolojik tanıda zorluklara neden olmakta vb gibi)
- Bir aşı uygulanmadan önce hayvanın ya da o popülasyonun o infeksiyon ile karşılaşma olasılığının ne kadar olduğuna dikkat edilmelidir.
- Aşılamada amaç bireysel bağışıklığı sağlamaktan çok, büyük hayvan popülasyonlarında hastalığı kontrol etmek ise sürü bağışıklığı kavramı üzerinde durulmalıdır.

Hazırlama yöntemleri ve içeriklerine göre aşıların sınıflandırılması şu şekildedir.

A- Klasik aşılar

Canlı aşılar

Ölü (inaktif) aşılar

Toksin aşıları (toksoidler)

Subunit aşılar

B- Yeni tekniklerle hazırlanan aşılar - Biyoteknolojik aşılar

1- Sentetik peptidler

2- Anti-idiotip aşılar

3- Genetik mühendisliği teknikleri

- Rekombinant antijenler (kategori I)

- Genetik - attenüe aşılar (Kategori II)
- Canlı rekombinant organizmalar (Kategori III)

4- DNA aşılar

A- KLASİK AŞILAR

Genellikle alışlagelmiş yöntemlerle mikroorganizmalardan ya da toksinlerinde hazırlanan aşılardır.

Canlı aşılar:

Hastalık etkenlerinin immunojenik özelliklerini kaybetmeden sadece hastalık yapma yeteneklerini kaybetmesini ya da çok zayıflatılması amacıyla yapılan işlemlere attenuasyon adı verilir. Canlı aşılar; hastalık etkeninin kendi konağı ya da değişik konaklarda, ya da değişik besiyerlerinde, hücre kültürlerinde uzun süren pasajlarla attenuue edilmesi sonucu elde edilen mikroorganizmalardan hazırlanan aşılardır.

Avantajları: Tek dozu yüksek titrede antikor oluşturur. İnaktif aşılardan çok düşük miktarda verilmesi ile yeterli bağışıklık sağlanır ve uzun süre devam eder. Uygulanma yollarında çeşitlilik vardır; göze damlatılarak, püskürtülerek, yem ya da suya ilave edilerek kullanılabilir.

Dezavantajları: Latent ve gizli seyreden infeksiyonlar canlı aşı uygulanmasını takiben tekrar aktif hale geçebilirler. Latent infeksiyonlu ya da zayıf hayvanlarda hastalık oluşturabilirler. Bu nedenle attenuasyon işlemlerinin çok dikkatli yapılmalı ve aşıdaki etken miktarı da çok dikkatli hesaplanmalıdır. Aşıya bağlı postvaksinal zararlar oluşabilir. Canlı aşı uygulanan hayvanlarda virus genellikle bu hayvanlar tarafından dışarı saçılır ve çevredeki duyarlı hayvanlar infekte olabilirler. Bir diğer

riskte, attenuasyon amacıyla kullanılan embriyololu yumurta, hücre kültürü gibi maddelerin diğer etkenlerle kontamine olmasıdır.

Ölü (İnaktif) aşılar

Ölü bakteriler ve inaktive edilmiş virusların kullanıldığı aşılardır. Örneğin bakteriyel etken uygun besiyerinde üretildikten sonra, öncelikle bakteri sayısı standart bir şekilde ayarlanır. Çeşitli yöntemlerle inaktive edildikten sonra koruyucu amaçla fenol gibi maddeler ilave edilerek kullanıma hazır hale getirilir.

Avantajları:Aşıdaki patojenden dolayı bir infeksiyon oluşma riski yoktur. Bir popülasyonda ölü aşılarla bağlı ölüm oranı canlı aşılarından daha düşüktür. Ölü aşıların başka patojenlerle kontamine olma riski yoktur. Dayanıklılık süreleri canlı aşılarla oranla daha uzun sürelidir.

Dezavantajları: Canlı aşılarından en önemli farkı, hangi tip mikroorganizma olursa olsun ekzojen antijen olarak algılanırlar ve bu nedenle antikörlerin ön plana çıktığı immun yanıtın oluşumuna neden olurlar ki bu da özellikle hücresel bağışıklığın önemli olduğu intrasellüler patojenlerden kaynaklanan infeksiyonlardan korunmada çok etkili değillerdir. İnaktif bir virusun iyi ve uzun süreli bağışıklık verebilmesi için virusun uygun ortamlarda bolca üretilmesi gerekir ki bu da aşının maliyetini arttırmaktadır. Bağışıklık çoğu kez kısa sürelidir bu nedenle adjuvantlarla birlikte kullanılırlar. İyi bir bağışıklık için genellikle ikinci bir doz gerekir ki bu ikinci enjeksiyonu takiben aşırı duyarlılık gibi alerjik bazı reaksiyonların oluşma riski daha fazladır.

Toksin aşıları (Toksoidler)

Toksin meydana getiren bakterilere karşı immunizasyonda bu aşılar kullanılmaktadır. Bakteri sıvı besiyerinde üretildikten sonra ürettiği ve ortama saldıği toksin, kültürün filtrelerden süzülmesiyle toplanır ve uygun sulandırma sonrası aşı olarak uygulanır.

Subunit aşılar:

Mikroorganizmaların patogeneğinde rol alan fimbria, flagella gibi organellerinden hazırlanan aşılara subunit aşılar adı verilir. Toksik etkileri olmadığı için inaktivasyona gerek yoktur, saf olarak elde etmek yeterlidir.

B- YENİ TEKNİKLERLE HAZIRLANAN AŞILAR (BİYOTEKNOLOJİK AŞILAR)

Genetik mühendisliği teknikleri

İstenilen antijeni kodlayan DNA izole edilir ve bu DNA kolay üreyen bir bakteriye, mayaya, başka bir hücreye sokulur. Aracı organizma bol miktarda üretildiğinde istenilen protein de bol miktarda sentezlenir. Bu protein saflaştırılarak kullanılır. Bu tip aşılar rekombinant antijenler (kategori I) aşıları olarak adlandırılır.

Bir patojen mikroorganizmanın patojenitesindeki önemli bir unsur/yapı biyoteknolojik yöntemlerle uzaklaştırılır ve elde edilen bu genetik olarak attenüe edilmiş etken aşıda kullanılırsa genetik-attenüe aşılar (Kategori II) sınıflandırılmasına girer. Böyle aşılar mutant aşılar kapsamına da girebilir. Bu tip aşılar eradikasyon programlarında da kullanılmaktadır.

Protein yapısındaki antijenleri kodlayan genler yine başka bir organizmaya klonlanıp, saflaştırılmadan direkt rekombinant organizma ile birlikte aşı olarak kullanılırsa canlı rekombinant organizmalar (Kategori III) kategorisine girer.

DNA aşıları

Vücuda protein antijeni vermek yerine, antijen kodlayan geni içeren DNA nın verilmesi işlemidir. Bu amaçla viral bir antijeni kodlayan DNA parçası bir plazmid ile birleştirilir ve bu direkt olarak hücre içine sokulur. Böylece hücreler tarafından alınan DNA, protein ürüne haline getirilir. DNA nın hücre içine girme oranı düşük ama protein üretimi uzun sürelidir. En büyük avantajı viral antijenlerin doğal

infeksiyonlardaki gibi sentezlenmesi ve böylece antijenlerin doğal formlarında sunulmasıdır.

Sentetik peptidler: Koruyucu bir antijenik determinantın aminoasit yapısı biliniyorsa, buna uygun peptidler kimyasal yöntemler ile sentezlenebilir ve aşı olarak kullanılabilir. Daha güvenilir ama maliyetleri daha yüksek aşılardır.

Anti-idiotip aşılar: Bir antijenin epitopuna karşı oluşan antikor bu epitopun komplementeri (tamamlayıcısı) dır. Bu antikorun bağlanma bölgesine karşı oluşan antikor da bir nevi şekil olarak antijenle aynı şekle sahip olacaktır. Bu aşılar sahada henüz kullanılmamakta, deneme aşamasındadır.

Aşı uygulamalarında aşağıdaki bazı noktalara dikkat edilmesi gerekmektedir.

Aşının dozu: Her aşının dozu saha çalışmaları sonucunda ortaya konmaktadır. Aşı dozu vücut ağırlığı ya da yaşa göre formüle edilmez. Çünkü aynı tür içindeki küçük ve büyük hayvanların antijene duyarlı hücre sayısı arasında çok büyük fark yoktur.

Aşının uygulanma yolu: Aşının tipine, oluşturulmak istenen immun yanıt tipine, bağışıklığın etkili olması istenilen yere göre değişiklik gösterir. Örneğin hastalığın patogenezinde sistemik bir yayılım söz konusu ise, sistemik immun yanıtın uyarılması için derialtı ya da kas içi injeksiyon tercih edilir. Bu uygulamaların en büyük dezavantajı ise oluşan lokal reaksiyonlar ve kalabalık popülasyonlardaki uygulama güçlüğüdür. Eğer mukozal bağışıklık önemli ise, örneğin solunum yolu patojenleri için burun içi, barsak patojenlerine karşı ağız yoluyla aşı uygulanması önerilebilmektedir.

Aşılama zamanı: Yeni doğan hayvanlarda maternal antikorlar olacağı için aşı uygulanması mümkün olmamaktadır. Eğer doğacak hayvanların infeksiyona yakalanma riski çok ise annenin aşılama tercih edilmektedir. Maternal antikorlar bittikten sonra aşılamanın yapılması en doğrusurdur ki bu sürede net olarak bilinmediği için genç hayvanları iki defa aşılama gerekir. Aşılama zamanı ayrıca infeksiyon tipine

göre de değişir. Örneğin aborta neden olacak bir infeksiyon için aşılama genellikle çiftleşme döneminden hemen önce yapılır.

MONOKLONAL ANTİKORLAR

Antijenik özelliğe sahip bir molekülün yüzeyinde lenfoid sistemi ve miyeloid hücreleri uyarmada rol alan birbirinden farklı kimyasal yapıya sahip bölgeler vardır, bunlara antijenik determinant adı verilmektedir. Vücutta bu şekilde farklı epitoplardan uyarılan B-hücrelerinden sentezlenen ve değişik aktiviteye sahip antikorlar bulunur, böyle antikorlara **poliklonal antikor** adı verilmektedir.

Vücuda giren antijenin determinantları tarafından uyarılmış her bir B-hücresi, vücuttan ayrılarak tek olarak üretilir ve bunlardan antikor elde edilirse, böyle antikorlara, tek bir hücre ve bunun oluşturduğu klonlardan meydana geldiği için **monoklonal antikor** adı verilir.

Ancak, plasmasitler bir haftadan fazla canlı kalamazlar ve çoğalma yetenekleri de yoktur. Devamlı olarak, yüksek titrede antikor sentezini sağlayabilmek için hibrid hücrelerden yararlanılmaktadır.

Monoklonal antikor üretmek için yapılan işlemler şu şekilde sıralanabilmektedir:

- 1- Etkin bir immunizasyon
- 2- Miyeloma hücrelerinin hazırlanması
- 3- Bağışık lenfositlerin elde edilmesi
- 4- Hibridizasyon (Hücre füsyonu)
- 5- Hibridoma elde edilmesi
- 6- İmmunoglobulin sentezinin kontrolü
- 7- Hibridomaların klonlanması

8- Hibridomaların fazla üretimi

9- Monoklonal antikorların saflaştırılması ve etkinlik kontrolü

Bakım ve beslenmesi kolay olduğunda, iyi immunize edilebilmelerinden, yeterince hücre kaynağına sahip olmalarından, kolay bulunabildiklerinden dolayı özellikle fare ve ratlar tercih edilmektedir. Saflaştırmış antijen tercih edilmektedir.

Uygun protokollerle yapılan immunizasyon sonrasında (immunizasyon prosedürü laboratuvar şartları, çalışanları ve çalışmaya uygun en iyi yöntem seçilmelidir), farelerin dalakları çıkarılıp, lenfoid hücreler hibridizasyonda kullanılır.

İmmunizasyonda çoğunlukla Balb/c fareleri kullanıldığından, miyeloma hücreleri olarak ta genelde yine bu farelere ait miyeloma hücreleri tercih edilmektedir. P3 olarak kodlanan hücre hatları sıklıkla kullanılmaktadır. Bu hücrelerin başlıca dört özelliği vardır; 1- Antikor sentezlememektedirler, 2- İn vitro olarak sonsuz üreme yeteneğine sahiptirler, 3- Yüksek oranda birleşme özelliği taşırlar, 4- Kendilerinde HGPRT defekti vardır (Hipoksantin guanin fosforibosil transferase enzimi bulunmamakta).

İmmunizasyon sonunda öldürülen hayvanların dalakları çıkartılır. İçerisinde besiyeri bulunan steril petri kutularına aktarılır ve çeşitli fizyolojik işlemlerle çevresindeki bağdokudan, hücre artıklarından arındırılır. Dalak hücreleri ve miyeloma hücreleri 3:1 oranında karıştırılır, birkaç ön işlemden sonra, uygun besleyici solusyon ile birlikte 96 gözlü steril mikropalakalara dağıtılır, ağzı kapatılıp, 37°C de %10 CO₂ li ortamda bir hafta inkube edilir.

Bu sürenin sonunda, mikropalakalar, hücre üremesi ve kontaminasyon yönünden mikroskopta kontrol edilir. Üreme olan çukurlar işaretlenir, bunlar belli aralıklarla yeniden pasajlanır.

Hibridomalarda antikor sentezi genellikle 7-10 gün arasında başlamaktadır. Bunu saptamak için, hibridoma olan çukurlardan üst sıvıdan bir miktar alınıp, serolojik testlerle antikor sentezi olup olmadığı kontrol edilmektedir. En iyi antikor sentezinin görüldüğü hücrelerin bulunduğu çukurcuklar işaretlenir.

İşaretlenen çukurcuktaki hibridomalardan yeni bir mikropalakaya pasajlar yapılır. Çünkü, hücreler belli bir süre sonra antikor sentezini azaltabilir, hatta tamamen durabilir, kontaminasyon görülebilir. Her bir kuyucuğa tek bir hücre gelecek şekilde, mikroskop altında kontrol ederek pasajlar yapılır, üzerine besiyeri ilave edildikten sonra inkubasyona bırakılır.

Elde edilen hibridomaların antikor sentezini arttırmak amacıyla in vivo (deney hayvanı) yada in vitro (hücre kültürü) olmak üzere iki farklı yol kullanılabilir.

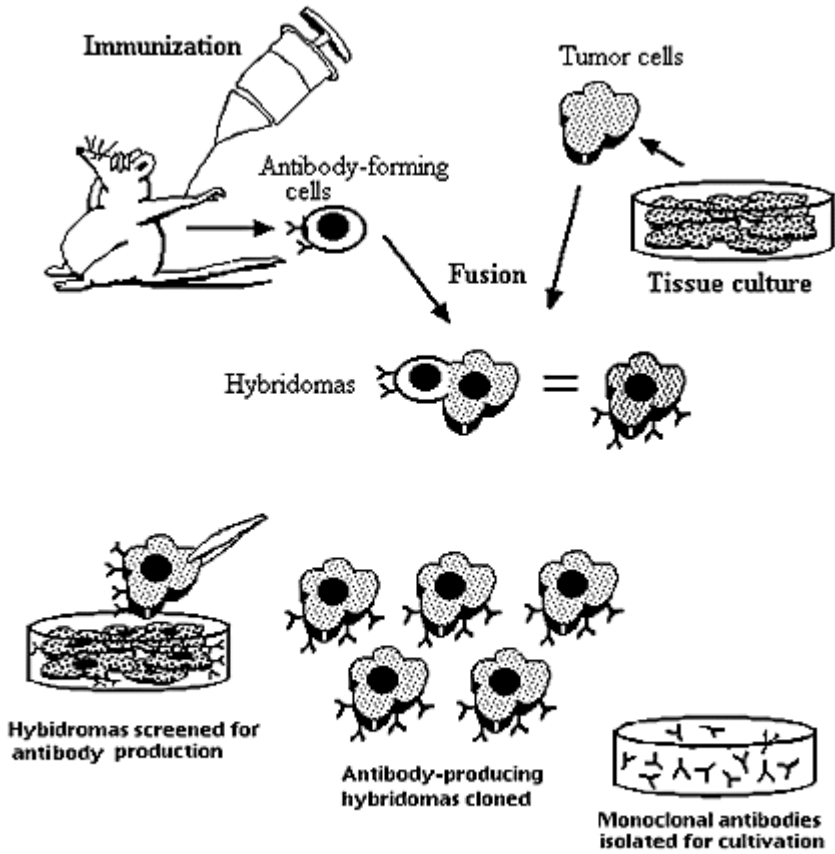
Bol miktarda elde edilen antikorların saflaştırılması gereklidir. Deney hayvanından elde edildiyse hayvanın kanından gelen bazı proteinler ya da antikorlar olabilir, bunların çeşitli yöntemlerle ayrıştırılması gerekmektedir. Saflaştırılan antikorların da tekrar aktiviteleri kontrol edilmelidir.

Monoklonal antikorların, en büyük avantajı spesifitesinin çok yüksek olmasıdır. Birbirinden çok küçük kimyasal yapı ile ayrılan iki determinatı bile rahatlıkla tanıyabilmektedir. Radiaktif amino asitler, enzim ya da boyalarla bağlanarak serolojik testlerde güvenle kullanılabilir. Ama bunun yanında, tüm serolojik testlerde kullanılabilme olasılığının olmaması, dondurulma-çözülme işlemleri sırasında titre düşüşlerinin daha çok olması gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır.

Monoklonal antikorların kullanım alanları:

- Epidemiyolojik çalışmalarda

- İnfeksiyonların tanısında
- İnfeksiyonlardan korunmada
- İnfeksiyonların tedavisinde
- Aşıların hazırlanmasında



Monoclonal Antibody Production

Resim, National Health Museum

<http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/monoclonal.html> sayfasından alınmıştır.

SEROLOJİK TESTLER

Antijen-antikor reaksiyonlarına dayanan invitro yöntemlere ortak olarak serolojik testler denilmektedir.

Serolojik testlerde iki temel unsur vardır: Antijen ve antikor. Serolojik tepkimeler tek bilinmeyenli bir denklem gibidir. Eğer elimizde bildiğimiz bir antijen varsa, ona karşı oluşmuş antikorları arayabilir, ya da tam tersi elimizde bildiğimiz bir antikor varsa antijenin kendisini arayabiliriz. Bu prensibe dayanarak, hastalıkların tanısında serolojik testler sıklıkla kullanılmaktadır.

Serolojik testlerde sıklıkla kullanılan bir terim "titre"dir. Antikor titresi, antijen ile saptanabilir pozitif reaksiyon veren en düşük antikor veya serum dilusyonudur. Eğer antijen aranıyorsa; bu tanım, serum ile pozitif reaksiyon veren en düşük antijen dilusyonu olarak değişecektir. Bunu saptamak içinde titresi ölçülmek istenen serum ya da antijen süspansiyonunun dilusyonları yapılmaktadır.

Serolojik testlerde iki önemli kavram daha bulunmaktadır: sensitivite ve spesifite. Sensitivite, bir serolojik testin aranan antikorların varlığını saptayabilme yeteneğinin ölçüsüdür. Spesifite, serolojik testin aranan antikorları saptamada ne kadar spesifik, özgül olduğunun göstergesidir.

Mikrobiyoloji alanında serolojik testlerin kullanım alanları:

Serolojik testler;

1. hastalıkların tanısında,
2. antikor titresinin saptanması mümkün olduğu için bireysel ya da sürü bağışıklığının saptanmasında, aşı zamanının belirlenmesinde,

3. bir bireyin immun yanıt gücünün ölçülmesinde,
4. dokularda ve vücut sıvılarındaki antijenlerin yada biyolojik maddelerin tesbitinde kullanılabilir.

İnfeksiyöz hastalıkların tanısı:

Direkt tanı: İnfekte hayvanlardan alınan inceleme örneklerinde, hastalık etkeninin kendisinin saptanması amacıyla serolojik testlerden yararlanılabilir. Bunun için şüphelendiğimiz hastalık etkenine spesifik antikora gereksinim vardır. Bu antikoları da önceden o antijene karşı immunize edilmiş hayvanlardan elde etmek mümkündür.

İndirekt tanı: Hastalığın indirek tanısı denildiğinde, hastalık etkeninin kendisini değil de, organizmada ona karşı oluşmuş antikoların saptanması sonucu yapılan tanı anlatılmaktadır. Bu aşamada bildiğimiz bir antijen, yani şüphelenilen hastalık etkeninin elimizde bulunması gereklidir.

Bu durmu kısaca şematize etmek gerekirse;

- Şüpheli antijen + bilinen serum.....direkt tanı amacıyla serolojik test
Bilinen antijen + şüpheli serum.....indirek tanı amacıyla serolojik test
Şüpheli antijen + şüpheli serum.....HİÇBİR ANLAMI YOK!!!

Mikroorganizmaların ve antijenlerin tanınması:

Elimizde belirli antikolar bulunduğunda, bir mikroorganizmanın antijen yapılarının ortaya konulması mümkün olmaktadır.

Organizmada bir antijene karşı farklı özellikte, farklı grupta antikolar oluşabilmektedir (IgM, IgG vs). Her serolojik tepkimede bu immunglobulinlerin hepsi aynı derecede rol oynamamaktadır. Serolojik testler anlatılırken, hangi immunglobulin sınıfının o testte daha etkin rol oynadıkları belirtilecektir.

Serolojik testler bağlanma fazlarına göre 3 grupta toplanmaktadır.

Primer bağlanma testleri: Antijen ve antikor bağlanır, ancak bu reaksiyon direkt çıplak gözle gözlenemez. Sonuçların değerlendirilmesi için reaksiyondaki antijen ya da antikorlar enzim, radyoizotop ya da bir boya ile işaretlenir. ELISA, Radioimmunoassay testleri örnek olarak verilebilir.

Sekonder bağlanma testleri: Öncelikle ortamda birbirine spesifik antijen ve antikorlar birleşir, sonra da bunlar gözle görülebilir bir kompleks oluşturular. Buna aglutinasyon, presipitasyon ve komplement fikzasyon testleri örnek verebilir.

Tersiyel bağlanma testleri: İn vivo ortamda gerçekleşir. Nötralizasyon testi örnek olarak verilebilir.

İmmunoloji seroloji dersi uygulama derslerinde primer bağlanma testlerinden ELISA, Floresans Antikor tekniği; sekonder bağlanma testlerinden aglutinasyon, presipitasyon testleri gösterilecektir.

Serolojik testlerde kullandığımız antijen ya da antikorlar zamanla bozulabilir, titresi düşebilir ya da kontamine olabilir. Bu nedenle BÜTÜN SEROLOJİK TESTLERDE POZİTİF ve NEGATİF KONTROLLERle çalışılmalıdır.

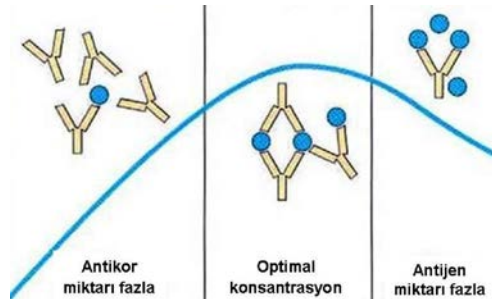
AGLUTİNASYON

Aglutinasyon, uygun bir sıvı ortamda, antijen ve ona spesifik antikorun bağlandıktan sonra kompleksler oluşturarak kümeleşmesi ile karakterize bir serolojik reaksiyondur. Sekonder bağlanma testlerinden biridir. Elektriksel olarak nötr bir ortamda bulunan hücreler yüzeylerinde negatif yük taşımakta, hücreler birbirlerini itmekteler. Ancak aglutinasyon şansını arttırmak için hücrelerin birbirlerine yaklaşmalarının sağlanması, bu itici gücün azaltılması gereklidir. Bu

nedenle aglutinasyon reaksiyonları NaCl'li ortamlarda, elektrolitli ortamlarda yapılmaktadır.

Aglütinasyon mekanizmasını etkileyen faktörler:

- 1- Antikorun karakteri: En iyi aglutinasyon veren antikor grubu IgM'lerdir, bunu IgG'ler takip etmektedir.
- 2- Antijenik reseptörlerin özellikleri
- 3- Ortamın iyonik gücü:
- 4- Isı
- 5- Antijen ve antikorların birbirlerine oranları: Antijen ve antikorların herbiri optimal konsantrasyonlarda olduklarında, reaksiyon gözle görülebilmektedir. Antikor konsantrasyonu fazla ise, bir antijene birden fazla antikor bağlanır ve antikorların çoğu boşa kalır. Ortamda spesifik antijen ve antikor bulunmasına ve bunlar birleşmelerine karşın, gözle görülebilir kompleksler oluşamaz, reaksiyon yanlış negatif olarak okunur. Bu duruma serolojide prozon fenomeni adı verilmektedir. Antijen konsantrasyonunun fazla olduğu durumlara da postzone fenomeni adı verilmektedir (Tablo-1).



Prezon fenomeniPostzone fenomeni

Tablo-1: Postzone ve prezon fenomenlerinin mekanizması

Aglutinasyon teknikleri:

Lam aglutinasyon testi: Kolay ve hızlı sonuç veren bir serolojik testtir. Eşit miktarlarda şüpheli serum ve bilinen antijen bir lam üzerinde karıştırılır. Birkaç dakika içinde aglutinasyonun görülmesi pozitif olarak değerlendirilir. Negatif kontrol olarak serum yerine FTS (fizyolojik tuzlu su); pozitif kontrol olarak bildiğimiz pozitif bir serumla elimizdeki antijeni kontrol etmemiz gereklidir. Lam aglutinasyon testi saha da daha çok tarama amaçlı olarak kullanılmakta, pozitiflik saptanan serumlar laboratuvar şartlarında titrenin saptanması için tüp aglutinasyon testi ile incelenmektedir.

Tüp aglutinasyon testi: Bu test antikor yanıtının saptanması ve ölçülmesi için en sıklıkla kullanılan serolojik testtir. Bu amaçla şüpheli serumun (içinde antikor olup olmadığı incelenen serum) tüplerde dilusyonu yapılır. Üzerine eşit miktarda antikor ilave edilir. Eğer serumda, kullandığımız antijene spesifik antikor varsa, antijen ve antikor bağlanır, kümeler oluşturur ve yer çekiminin de etkisiyle bu kümeler tüpün dibinde birikir, üst sıvı berraklaşır.

Tüp aglutinasyon testi ile şüpheli serumda spesifik antikorların varlığını saptayarak bir hastalığın tanısı yapılabilir, antikorun miktarını saptayarak hayvanın bağışıklık durumu ve aşı titresi saptanabilir. Testte yapılacak bazı modifikasyonlarla serumdaki antikorun IgM ya da IgG grubundan hangisine ait olduğu, bu şekilde bir hastalığın hangi evresinde (kronik/akut) bulunduğu saptanabilmektedir.

Tüp aglutinasyon testinin yapılışı:

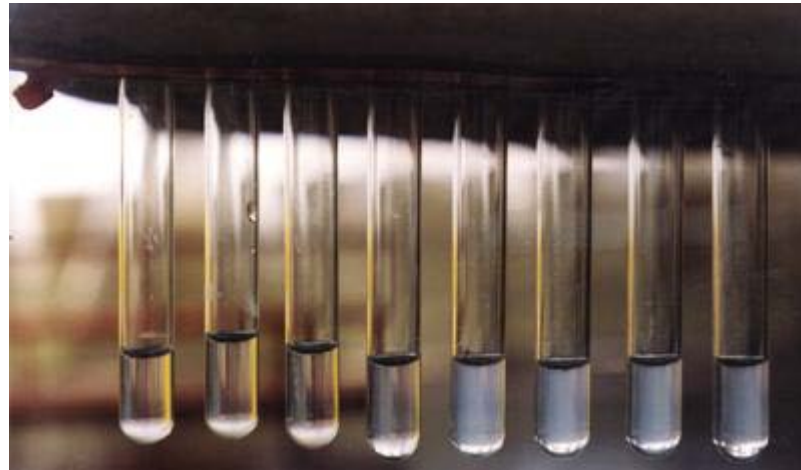
1- 11 adet aglutinasyon tüpüne FTS konulur (1. tüpe 0.8 ml, diğerlerine 0.5 ml).

2- 1. tüpe 0.2 ml şüpheli serum ilave edilir. Böylece tüpte serum örneği 1/5 oranında sulandırılmış olur. Sonra serum 2 katlı olarak sulandırılır. Son tüpe serum örneği konmaz, bu tüp antijen kontrol tüpüdür.

3- Tüm tüplere eşit miktarda (0.5 ml) standart antijen ilave edilir.

4- Hafifçe çalkalanan tüpler, ağızları kapatılıp, 37 C de 48 saat inkubasyona bırakılır.

5- İnkubasyon süresi sonunda aglutinasyon olan tüplerdeki antijen+antikor karışımı süspansiyon berrak görünmekte, hafifçe çalkalandığında dipten bir tortunun kalktığı gözlenmektedir. Bu görünüm, antijen ile antikorun birleşip dibe çöktüğünün göstergesidir. Berrak görüntünün bittiği tüp, incelediğimiz hayvanın kan serumundaki antikor titresini gösteren tüptür.



1/10 1/20 1/40 1/80 1/160 1/320 1/640 1/1280

Antikor titresini 1/80

Pasif aglutinasyon:

Antijen, taşıyıcı bir partikül (eritrosit, latex vs) ile birlikte reaksiyona girmektedir.

Co-aglutinasyon testi: Bilinen antiserumlar Fc parçaları ile Protein-A'ya bağlanırlar, reaksiyona girdiklerinde ortamdaki antijene Fab kısımları ile bağlanırlar. Oluşan aglutinasyon reaksiyonu *S. aureus* sayesinde daha iyi görünür bir hal almaktadır.

Hemaglutinasyon İnhibisyon (HI): Bazı bakteri ve viruslar, dış yüzeylerinde sahip oldukları özel yapılar sayesinde eritrositlere bağlanabilir ve onları aglutine edebilmektedirler. Bu olaya hemaglutinasyon (HA) denilmektedir. Bu reaksiyon ortama; o bakteri ya da virusa spesifik antikörlerin ilave edilmesi sonucu inhibe edilebilmektedir. Bu olaya da hemaglutinasyon inhibisyon denilmektedir. "HEMAGLUTİNASYON" BİYOLOJK BİR REAKSİYON; "HEMAGLUTİNASYON İNHİBİSYON" İSE SEROLOJİK BİR REAKSİYONDUR.

PRESİPİTASYON TESTLERİ

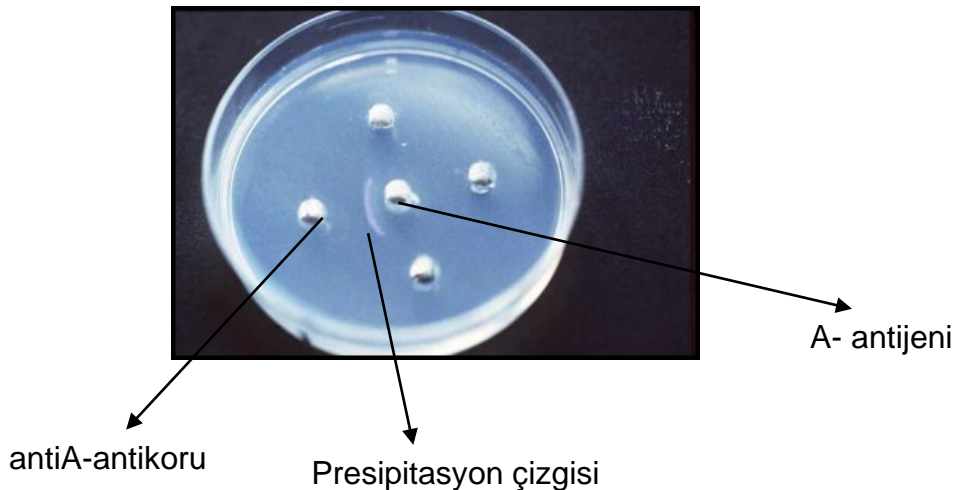
Partiküler olmayan suda erimiş durumdaki antijenlerin, elektrolitli ortamda, spesifik antikörler tarafından bağlanarak çöktürülmesi prensibine dayanan serolojik bir testtir. Antijenlerin suda erimiş ve multivalan olması; antikörlerin da en az bivalan olması presipitasyon için yeterlidir. Antikörler içerisinde IgG, IgM ve az olarak ta IgA'nın presipitan özelliği vardır.

Presipitasyon testleri, sıvı ve yarı katı ortamlarda yapılabilir. Testte kullanılan eriyebilir özellikteki antijenler, orgnizmaların kimyasal ve fiziksel yöntemlerle parçalanması ile elde edilmektedir. Aglutinasyon testindeki antijen partiküler özellikte iken, presipitasyon testindeki antijen eriyebilir özelliktedir.

1- Sıvı ortamda presipitasyon testi: Bunların arasında en sıklıkla kullanılan, kapillar tüp presipitasyon testidir. İnce bir tüp içerisine bir miktar immun serum (=antikor) konur ve üzerine antikorla karışmayacak şekilde yavaşça antijen konur. Eğer ortamda birbirine spesifik antijen ve antikor varsa iki sıvının birleştiği yerde beyaz bir presipitasyon çizgisi oluştuğu gözlenir.

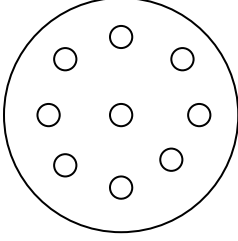
2- Yarı katı ortamda presipitasyon testi: Petri kutusu, lam ya da daha büyük camlar üzerine pH' sı 7.2' ye ayarlanmış saf agardan hazırlanmış plaklar içerisinde, antijen ve antikorların karşılaşması ile oluşan presipitasyon çizgilerinin incelenmesine dayanan yöntemlerdir. Farklı modifikasyonları ile serolojide sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

Agar Jel İmmunodiffuzyon tekniği: Bir petri kutusu içerisindeki agarda, birbirine eşit aralıklarda çukurlar açılır. Sonra bu çukurların içine suda eriyebilir özellikteki antijen ve antikorlar ilave edilir. İnkubasyon süresince, antijen ve antikor jel içerisinde diffuze olacak ve belli bir noktada birleşeceklerdir. Bu reaksiyon, jel içerisinde antijenle antikorun birleştiği noktada bulut şeklinde presipitasyon çizgisinin oluşumu şeklinde gözlenmektedir.

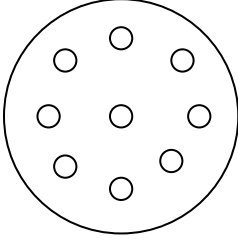


Presipitasyon testi ile:

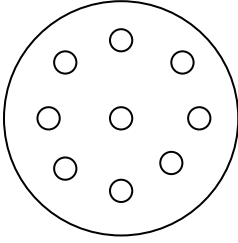
Serumda antikor saptanabilir.



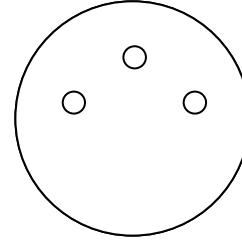
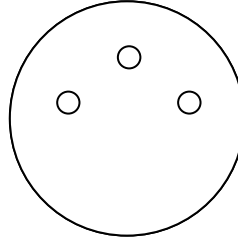
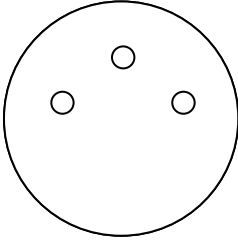
Dokularda antiijen saptanabilir.



Antiijen ya da antikor titresi saptanabilir.



İki antiijenin arasındaki ilişki incelenebilmektedir.



İŞARETLENMİŞ ANTİJEN ve ANTİKORLARLA YAPILAN TESTLER

Antijen ve antikor bağlanmasının, antijen ya da antikorların enzim, radyoaktif maddeler gibi bazı maddelerle işaretleme ve bu maddelerin oluşturduğu renklerle reaksiyonun gözle görülür bir hal alması prensibine dayalı primer bağlanma testleridir. Üç ayrı gruba ayrılırlar:

A- Immuno-Enzimoloji

B- Immuno-Fluoresans

C- Radio-İmmunoloji

Bu yöntemlerle organ ve dokularda antijen saptanabilir, kan serumunda antikor varlığı araştırılabilir, ve yine dilusyonlar yapılarak titre tayini yapılabilmektedir.

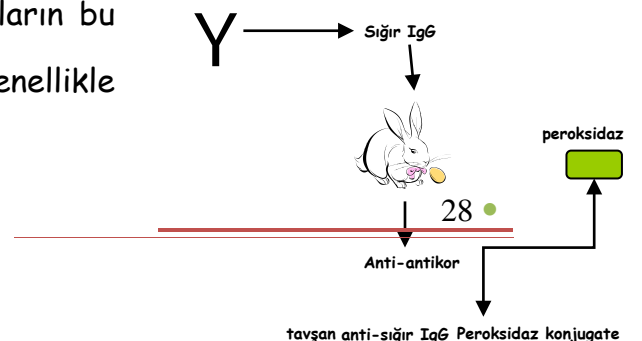
A- Immuno-Enzimoloji [Enzim İmmunoassay (EIA)]

Primer bağlanma testlerinden biridir. Antijen ve antikorun birleştiği, oluşan immunolojik reaksiyonların enzim-substrat sistemleri ile görünür hale getirildiği testlerdir. EIA teknikleri üç grupta toplanabilir: ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), immunohistokimyasal teknikler (immunoperoksidaz), immunoblot teknikleri (western blotting).

ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Taşıyıcıların seçimi: Reaksiyon katı bir taşıyıcı üzerinde gerçekleşmektedir. Nitrosellüloz membranlar, selüloz, agaroz, değişik özellikte tüpler, ve "U", "V" ya da düz tabanlı mikropalakalar kullanılmaktadır.

İmmunoadsorbsiyon: Antijen ya da antikorların bu katı yüzeye yapıştırılması aşamasıdır. Proteinler genellikle



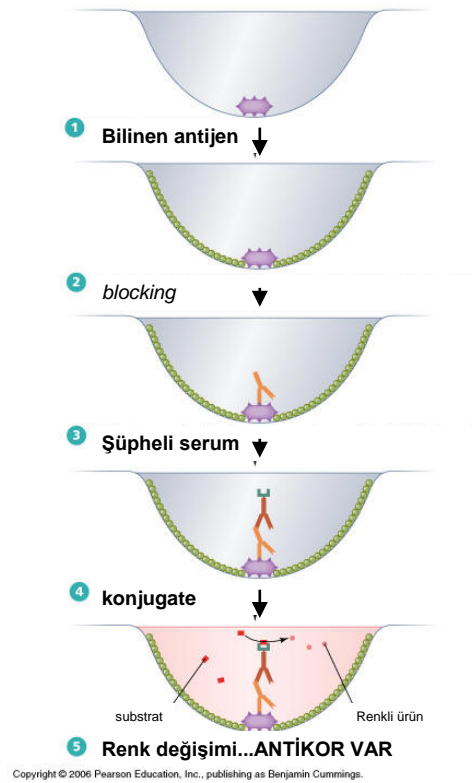
alkali bir solusyonda (ör:coating buffer, pH 9.6) dilue edilip, belli sürelerde katı yüzeyde bekletilerek yapıştırılmaktadır.

Konjugate: İşaretlenmiş immunolojik maddelere konjuge(konjugate) denilmektedir. Enzimlerden en çok peroksidaz ve alkalin fosfotaz kullanılmaktadır. Peroksidazın, ucuz olması, konjugasyonda uzun süre stabil kalabilmesi ve reaksiyon sonuçlarının gözle görülebilir olması avantajlarının yanında, substratının kansorejen özellikte olması gibi önemli bir dezavantajı da bulunmaktadır. Alkalin fosfotaz da ise bütün özellikler tam tersi durumdadır.

ELISA' da her aşamada yapılan yıkama işlemi çok önemlidir. Bu işlem sayesinde, reaksiyona katılmayan fazla reaktifler elimine edilecektir.

ELISA ile antikor aranması

- 1- Bilinen antijen ELISA plakasındaki çukurlara konur ve bir süre bekletilerek bunlara adsorbsiyonu sağlanır.
- 2- YIKAMA (yapışmayan antijenleri ortamdan uzaklaştırmak amacıyla)
- 3- Şüpheli serum ilave edilir.
- 4- İnkubasyon (Antijen ve varsa serumdaki antikorun bağlanması için gerekli süreyi sağlamak için)
- 5- YIKAMA (bağlanmayan antikorları ortamdan uzaklaştırmak amacıyla)
- 6- Enzim ile işaretli anti-immunoglobulin ilave edilir.



- 7- İnkubasyon
- 8- YIKAMA (bağlanmayan antikorları ortamdan uzaklaştırmak amacıyla)
- 9- Substrat ilave edilir. İnkubasyon süresi sonunda RENK OLUŞUMUNA GÖRE test değerlendirilir. Renk oluşumu gözle saptanabildiği gibi spektrofotometride de okunabilir.

ELISA ile antijen aranması (Sandviç ELISA)

1. Bilinen antikör ELISA plakasındaki çukurlara yapıştırılır.
2. YIKAMA (yapışmayan antikorları ortamdan uzaklaştırmak amacıyla)
3. Şüpheli antijen ilave edilir.
4. İnkubasyon (Antikör ve varsa inceleme örneğimizdeki antijenin bağlanması için gerekli süreyi sağlamak için)
5. YIKAMA (bağlanmayan antijenleri ortamdan uzaklaştırmak amacıyla)
6. Enzim ile işaretli antikör (ilk basamakta kullandığımız antikörle aynı, ancak tek farkı enzimle işaretlenmiş olması) ilave edilir.
7. İnkubasyon
8. YIKAMA (bağlanmayan antikorları ortamdan uzaklaştırmak amacıyla)
9. Substrat ilave edilir. İnkubasyon süresi sonunda RENK OLUŞUMUNA GÖRE test değerlendirilir. Renk oluşumu gözle saptanabildiği gibi spektrofotometride de okunabilir.

B- Immuno-Fluoresans Teknikleri

ELISA' ya çok benzerlik gösteren bir yöntemdir. En önemli fark reaksiyonu görmek için enzim-substrat kompleksi yerine fluorokromların kullanılmasıdır.

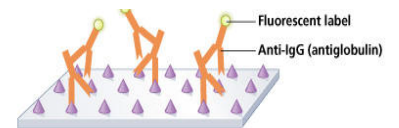
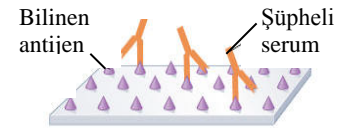
Immuno-fluoresans teknikleri, antijen ve antikor reaksiyonlarının UV ışığında fluoresans parlama veren özel boyalarla gösterilmesi temeline dayanmaktadır. En sıklıkla floresein izotiosiyanat (FITC) kullanılmaktadır. Testin değerlendirilebilmesi için floresans mikroskoba gereksinim vardır.

Fluoresans Antikor Tekniği ile antijen aranması

- 1- Antijen (şüpheli doku kesiti, vücut sıvısı vs) bir lam üzerine fikze edilir. Yapıştırma işlemi çoğunlukla aseton ile yapılmaktadır.
- 2- Aranana antijene spesifik FITC işaretli antikorlar lamın üzerine ilave edilir.
- 3- İnkubasyon süresi sonunda lam YIKANIR.
- 4- Floresans mikroskopta incelenir. Yeşil renkte floresans saptanan alanlar antijenin varlığını gösterir, test pozitif olarak değerlendirilir.

Fluoresans Antikor Tekniği ile antikor aranması

- 1- Bilinen antijen lama fikze edilir.
- 2- Şüpheli serum lam üzerine ilave edilir.
- 3- İnkubasyon süresi sonunda lam YIKANIR.
- 4- Üzerine FITC ile işaretlenmiş anti-Ig ilave edilir. (Bir önceki basamakta antijen ve antikor bağlandıysa, bunu gözle görülür hale getirmek için konjugat ilave edilmektedir)
- 5- İnkubasyon süresi sonunda lam YIKANIR. Floresans mikroskopta incelenir. Yeşil renkte parlak alanların görülmesi, incelenen serumda antikor olduğunu gösterir.



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

HEMAGLUTINASYON TESTİ (HA)

Hemaglutinasyon, bazı virusların kapsidlerinde ve varsa zarfın dışına taşan glikoprotein yapısındaki hemaglutininlerin eritrositler üzerindeki reseptörlere bağlanıp onları çökeltmesidir. Hemaglutinasyon testi, serolojik bir reaksiyon değildir, tamamen virusun yapısındaki bir özelliğe bağlı olarak şekillenir.

Amaç:

- a- Virusun hemaglutinasyon özelliğinin saptanması.
- b- Hemaglutinasyon inhibisyon testinde kullanılacak virus materyalinin **1 Hemaglutinasyon ünitesinin (1HAÜ)** saptanması

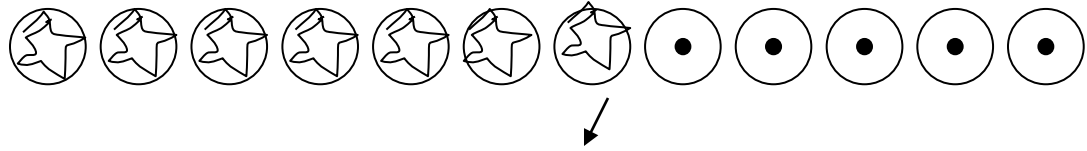
Testin yapılışı

Çabuk Hemaglutinasyon testi:

Bir lam üzerine bir damla şüpheli virus süspansiyonundan ve %5'lik eritrosit süspansiyonundan konur. Karıştırılır ve aglutinasyon görülmesi virusun hemaglutinasyon özelliği olduğunu gösterir, pozitif olarak değerlendirilir.

Yavaş Hemaglutinasyon testi

- Tüm kuyucuklara 50 µl FTS konur
- 1. tüpe şüpheli virus materyalinden 50 µl ilave edilir, karıştırılır, 50 µl çekilip ikinci kuyucuğa aktarılır. Bu işlem 10. kuyucuğa kadar devam eder. Böylece virus 2 katlı olarak sulandırılmış olur.
- Tüm kuyucukların üzerine %2 oranında sulandırılmış eritrosit süspansiyonundan 50 µl ilave edilir. 40-60 dakika inkubasyona bırakılır.
- İnkubasyon süresi sonunda dantela şeklindeki görünüm, eritrositlerin aglutine olduğunu gösterir(POZİTİF), kuyucuklarda düğmelenme şeklinde bir çökme varsa aglutinasyon olmadığını(NEGATİF) gösterir.



$$1\text{HAU} = 1/128$$

Virusun aglutinasyon verdiği en son dilusyon = 1 Hemaglutinasyon titresidir (1HAU).

Hemaglutinasyon inhibisyon testinde 4 HAU ya da 8 HAU kullanılır. Yukarıdaki örnekte virusun 1HAU= 1/128, 4 HAU= 1/32, 8HAU=1/16' dır.

HEMAGLUTINASYON İNHİBİSYON TESTİ (HI)

Hemaglutinasyon özelliğine sahip virusun eritrositleri aglutine etme özelliğinin hasta ya da aşılınmış hayvanın kan serumunda bulunan spesifik antikorlarla inhibe edilmesi prensibine dayanır. Bu test ile hastalıktan şüpheli hayvanların kanında antikor arayarak hastalığın indirekt tanısını yapmak mümkündür. Gerek bireysel gerekse sürünün bağışıklığını saptamak amacıyla da sıklıkla kullanılan bir testtir.

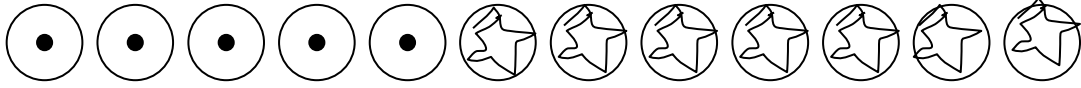
Gerekli malzemeler:

8HAU' ne ayarlanmış virus süspansiyonu; şüpheli serum; %2 sulandırılmış eritrosit süspansiyonu

Testin yapılışı

- Tüm kuyucuklara 50 µl FTS konur

- Birinci kuyucuğa 50 µl şüpheli serum konur, ve 2 katlı olarak sulandırılır.
- Tüm kuyucuklara 50 µl 8 HAU sinde virus süspansiyonu ilave edilir.
- 20 dakika inkubasyona bırakılır
- Tüm kuyucuklara 50 µl %2 lik eritrosit süspansiyonu ilave edilir. 40-60 dakika inkubasyona bırakılır.
- Aglutinasyonun inhibe olduğu son sulandırma, serumun HI titresini gösterir. Ancak bu değer 8 HAÜ değerine göre saptandığından gerçek titrenin saptanması gerekmektedir. Bu amaçla bulunan titre 8 HAÜ ile çarpılır. Örneğin aşağıdaki örnekte serumun gerçek titresi 1/256 dır. Bu da $\log_2 2^{-8}$ dir.



Komplement Bağlanma Testi

Komplement sistemi, normal kan serumunda bulunan protein yapıda kompleks bağışıklık elemanlarından oluşur. Bu sistem antijen-antikor kompleksinin varlığında tetiklenir ve bunu takiben hücre lizisine kadar giden çeşitli reaksiyonlar gelişir. Komplement bağlanma testi, komplementin bu özelliğinden faydalanarak kan serumunda bildiğimiz antijene spesifik antikorların varlığının belirlenebildiği bir serolojik testtir.

Komplement bağlanma testi (Complement Fixation Test- CFT), birçok bakteriyel ve viral antijenin tanısı için kullanılan bir serolojik testtir. Ancak, yapılışı karmaşık olan bu test iyi laboratuvar koşulları, eğitilmiş personel ve düzgün titre edilmiş ve doğru koşullarda saklanmış reaktifler ile çalışmayı gerektirmektedir.

Komplement bağlanma testinde kullanılan malzemeler

- Komplement

Komplementin taze kaynağı kobaylardır. Ancak kobay serumundan taze elde edilen komplement ısı ile kolayca inaktive olabilir. Komplement liyofilize edilerek, dondurularak ve koruyucu maddeler eklenerek inaktivasyondan korunabilir. Günümüzde komplement ticari olarak da elde edilebilmektedir. Komplement testten önce üreticinin önerileri doğrultusunda uygun şekilde sulandırılır.

- Sulandırıcı

Magnezyum ve kalsiyum iyonları eklenmiş FTS sulandırıcı olarak kullanılabilir.

- Amboseptör - Hemolitik sistem

Test için; kullandığınız yöntemle göre değişen konsantrasyonlarda (%2,%2,5,%3 ve %5 vb...) yıkanmış koyun eritrositleri eşit hacimde tavşan-anti koyun eritrosit antikorları karıştırılır. Bu duyarlılaştırılan eritrositlere amboseptör yada hemolitik sistem ismi verilir ve testte indikatör sistem olarak kullanılır.

- Antijen

Antijen, serumda hangi hastalığa ait antikorların varlığını belirlemek istiyorsanız o hastalığa spesifik olmalıdır. Genellikle ticari olarak temin edilir. Ancak, anti-komplementer aktiviteye sahip olmaması önemlidir. Antijen testten önce üreticinin önerileri doğrultusunda sulandırılır.

- Hastaya ait kan serumu

Normal kan serumu içerisinde immun sistemin yapı taşlarından biri olan komplementi barındırmaktadır. Bu nedenle, var olan komplementin giderilmesi için test edilecek kan serumları, 30 dakika 60°C de tutularak inaktive edilir. Serumlar testten önce sulandırılır.

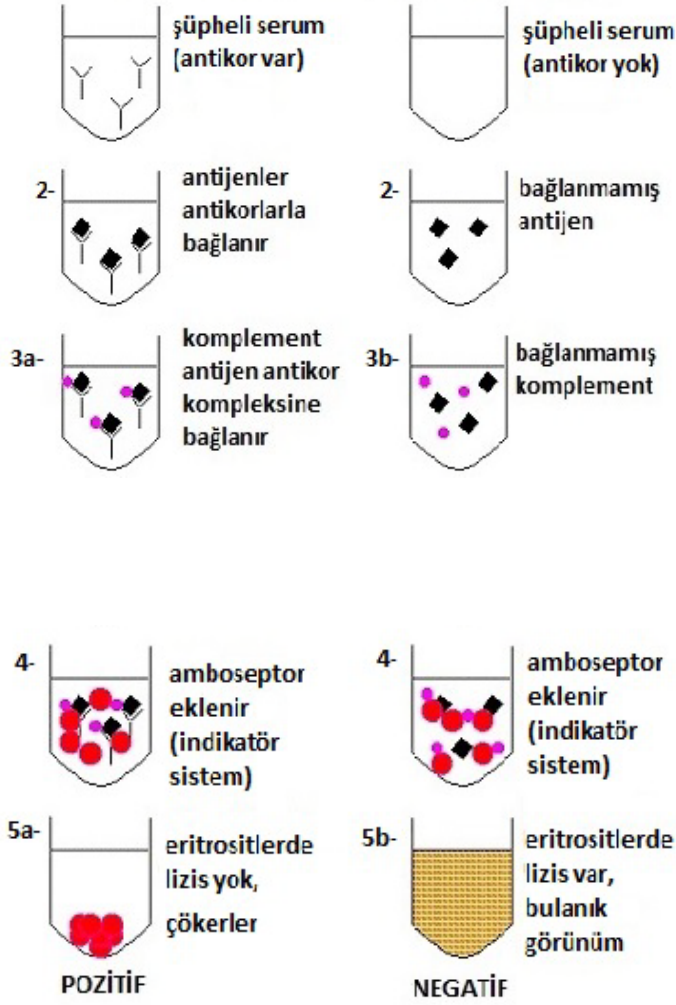
Testte, antijen ve serum anti-komplementer aktivite yönünden,

komplement sulandırmanın uygunluğu yönünden,

koyun eritrositleri otoliz varlığı yönünden kontrol edilmelidir.

Ayrıca her test pozitif ve negatif kontrol serumları ile çalışılmalıdır.

Testin Mekanizması



Birinci basamak:

2- Bilinen antijen, inaktive edilmiş kan serumu ve standardize edilmiş belirli miktarda komplement ile inkübe edilir.

3a- Eğer serum bilinen antijene spesifik antikorları içeriyorsa, oluşan antijen-antikor kompleksi komplementin aktivasyonunu sağlayacak ve komplement bu komplekse bağlanacaktır.

3b- Ancak, kan serumunda spesifik antikor yoksa antijen-antikor kompleksi oluşmadığından komplement bağlanmayacak ve serbest halde kalacaktır.

İkinci basamak:

4- İkinci basamağın amacı indikatör sistemin (amboseptör) eklenmesi ile komplementin ilk basamakta kullanılıp kullanılmadığını belirlemektir.

5a- Eğer komplement ilk basamakta gelişen antijen-antikor kompleksine bağlandıysa ortada serbest halde kalan komplement yoktur. Bu durumda bir diğer antijen-antikor kompleksi olan koyun eritrositi/tavşan anti-koyun eritrositi kompleksine bağlanamaz. Eritrositlerde lizis gelişmez ve inkübasyon sonucunda mikrotitrasyon plakasının dibinde düğme tarzında bir çökme gözlenir (Pozitif Test Sonucu).

5b- Ancak, spesifik antikor yoksa ilk basamakta komplement serbest halde kalmıştır, indikatör sistem eklendiğinde koyun eritrositi/tavşan anti-koyun eritrositi kompleksine bağlanır ve aktive olur. Bu aktivasyon sonucunda eritrositlerde lizis gelişir ve inkübasyon sonucunda kuyucuklarda düğme şeklinde çökme görülmez (Negatif Test Sonucu).

