



# Serolojik Yöntemler

# Antijen ?

- Özgül bir bağışık yanıt oluşturabilen maddelere genel olarak **antijen** denir
- Antijenler için immunojen deyimi de kullanılabilir

# Antikor ?

- **Antikor**; antijenlere karşı sıvısal bağışık yanıt sonucunda oluşan yapılar
  - ❖ B lenfositleri tarafından oluşturulur
  - ❖ Antijenleri ile özgül olarak birleşme özelliğinde

# Antijen-Antikor ilişkileri

- **Epitop**; Antijende, antikorlara bağlanabilen aktif bölgelerdir
- **Paratop**; Antikorda epitopa karşılık gelen özgül uçlar

# Antijen-Antikor ilişkileri

- Antikorum bağlayıcı bölgesi ile epitop arasındaki bağlantı nonkovalan bağlar ile sağlanır
- Bu bağlantı geri dönüşümlüdür
  - ❖ Yüksek iyonik güç veya uç noktalardaki pH ile ayrılabilir

# Antijen antikor birleşmesi

1. Özgüldür
2. Kimyasal bir reaksiyondur
3. Geriye dönüşür bir reaksiyondur
4. Antijen antikor birbirleriyle eş uygun oranlarda birleşir
5. İki safhalı bir reaksiyondur

# Sonuç

- Günümüzde, antiijen-antikör birleşme reaksiyonuna dayanan pek çok serolojik yöntem geliştirilmiştir
- Bu yöntemlerle
  - ❖ hem immün cevap ve patolojisi belirlenmekte,
  - ❖ hem de antiijen veya antikörün kalitatif ve kantitatif ölçümü yapılmaktadır

# Aglütinasyon testleri

- Aglütinasyon reaksiyonu, partikül halindeki antijenlerin özgül antikolarla birleşmesi ve çapraz bağlar (kafes) oluşturarak kümeleşme esasına dayanır



# Aglütinasyon testleri

- Aglütinasyon testleri;
  - ❖ Kültürde üretilmiş bir bakterinin tiplendirilmesi
  - ❖ Hazır antiserumlar kullanılarak klinik örnekte antijen tayini
  - ❖ Bilinen antijenler kullanılarak serumda antikor tayini ve kantitasyonu amacıyla yaygın olarak kullanılır

# Aglütinasyon testleri

- Partiküler antijen olarak, bakteri hücresinin ya da eritrositlerin kendisi veya taşıyıcı partiküller kullanılır
- Eritrositlerin kullanıldığı yöntemler "hemagglütinasyon" olarak isimlendirilir
- Reaksiyon sonucu oluşan antijen-antikor kompleksleri küçük kümeler şeklinde gözlenir

# Hemaglutinasyon testleri

- İkiye ayrılır
  - ❖ Direk hemaglutinasyon testleri
  - ❖ İndirek (pasif) hemaglutinasyon (İHA)

# Direk hemaglutinasyon

- Bu yöntem,
  - ❖ bazı enfeksiyonlarda eritrosit yüzeyindeki antijenlere karşı doğal olarak oluşan antikorların tespitinde kullanılır
- Bu testler hızlı tanı için yararlı olmalarına rağmen özgüllük ve duyarlılıkları düşüktür

# İndirek (pasif) hemaglütinasyon (İHA)

- Bu yöntem antikor saptanmasında kullanılan ve 96 çukurlu "U" tabanlı mikropleytlerde gerçekleştirilir
- Çeşitli antijenler (bakteriyel, viral, fungal, paraziter), eritrosit (genellikle koyun eritrositleri) yüzeyine bağlanmıştır
- Bu bağlanma işlemi kimyasal maddeler kullanılarak (örn. tannik asit) yapılır

# İndirek (pasif) hemaglütinasyon (İHA)

- Aynı eritrosite ya da parçacığa aynı anda birden fazla antijen kaplanabilir
- Dolaylı hemaglütinasyon adı verilen bu deneyler çok duyarlı olup ortamda çok az antikor bulunması halinde bile sonuç vermeye yeterli olur

# İndirek (pasif) hemaglütinasyon (İHA)

- Bu şekilde, kaplanmış oldukları antijenin taşıyıcısı durumuna gelen eritrositler elektrolitli ortamda süspansiyon halinde kalırlar
- Bunlar taşıdıkları antijenlerin antikorları ile karşılaştıklarında aglütinasyon verirler

# İndirek (pasif) hemaglutinasyon (İHA)

- Hasta serumu dilüsyonları üzerine duyarlılaştırılmış eritrositler eklenir
- Pozitiflik olduğunda hemaglutinasyon, negatiflik varsa düğme gibi çökme görülür



# İndirek (pasif) hemaglütinasyon (İHA)

- Bu yöntem laboratuvarımızda
  - ❖ Sifiliz serolojisinde (TPHA testi)
  - ❖ Amip ve ekinokok antikorlarının araştırılmasında kullanılmaktadır

# ELISA

- 1980'lerde Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) teknolojisi yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır
- Günümüzde birçok tanı laboratuvarında yaygın olarak kullanılmaktadır

# ELISA

- Antijen-antikor ilişkisini, antikorlara bağlanmış bir enzimin aktivitesini izlemek temeline dayanır
- ELISA testlerinin avantajları;
  - ❖ Geniş enfeksiyon tanı parametrelerinin ticari olarak kolayca temin edilebilmesi
  - ❖ Yöntemin otomasyona uyarlanabilirliği
  - ❖ Böylece çok sayıda örneğin kısa sürede çalışılabilmesi
  - ❖ Sonuçların spektrofotometrede objektif olarak değerlendirilmesi

# ELISA - Antikor aramak

- Mikropleyt çukurlarına özgül antijen bağlıdır
- Çukurlara hasta serum dilüsyonları eklenir
- Özgül antikor (IgG veya IgM) varsa antijenle birleşir

# ELISA - Antikor aramak

- İnkübasyondan ve yıkama işleminden sonra hangi tip antikor araştırılıyorsa ona özgül konjugat eklenir
  - ❖ IgG araştırılıyorsa enzimle işaretli anti-insan IgG
  - ❖ IgM araştırılıyorsa enzimle işaretli anti-insan IgM

# ELISA - Antikor aramak

- İnkübasyon ve yıkama sonrası çukurlara kromojenik substrat eklenir
- Reaksiyon sonucu oluşan renk değişikliği hasta serumundaki antikor miktarı ile DOĞRU orantılıdır ve spektrofotometrik olarak değerlendirilir

# ELISA - Antikor aramak

- Antikor aramak;
  - ❖ Antijen kaplı katı faz
  - ❖ Aranan antikor
  - ❖ Antikor varsa antijene yapışır
  - ❖ Enzim işaretli antoglobulin
  - ❖ O da komplekse yapışır
  - ❖ Enzime uygun kromojen substrat
  - ❖ Oluşan renk klorometrik olarak ölçülür

# Antikor arama amacıyla kullanılan ELISA yöntemleri

1. Katı faz sandviç yöntemi ile antikor arama
2. Sandviç inhibisyon yöntemi ile antikor arama
3. ELISA kompetitif yöntemi ile antikor arama



# ELISA - Antijen aramak

- Antijen aramak;
  - ❖ Antikor kaplı katı faz
  - ❖ Aranan antijen
  - ❖ Antijen varsa antikora yapışır
  - ❖ Enzim ile kaplı antikor
  - ❖ O da antijene yapışır
  - ❖ Kromojen substrat
  - ❖ Oluşan renk kolorimetrik olarak ölçülür

# Antijen arama amacıyla kullanılan ELISA yöntemleri

1. Direkt ELISA (Sandviç yöntemi) ile antijen arama
2. Direkt ELISA tek basamaklı sandviç yöntemi ile antijen arama
3. İndirekt ELISA ile antijen arama
4. Kompetitif ELISA yöntemi ile antijen arama

# ELISA yönteminde sonuçların değerlendirilmesi

- ELISA yönteminde enzim-substrat reaksiyonu sonucu ortaya çıkan renk değişimi spektrofotometrik olarak ölçülür
- Elde edilen absorbanans değeri "optik dansite (OD)" olarak ifade edilir

# ELISA yönteminde sonuçların değerlendirilmesi

- Kullanılan ELISA kitinin özelliğine göre, kontrol ya da standartlardan alınan OD değerleri hasta serumlarının OD'leri ile oranlanarak;
  - ❖ kalitatif
  - ❖ semi-kantitatif
  - ❖ kantitatif, sonuçlar elde edilir

# Kalitatif sonuç

- Kalitatif sonuç veren bir yöntemde, kitin önerisine göre "pozitif ve negatif kontrol serumları" veya "kalibratör serumlar" kullanılabilir
- Bu serumların OD'lerinden hesaplanan bir "cut-off" (eşik) değeri vardır
- Örneklerin OD'leri buna göre değerlendirilerek "pozitif" veya "negatif" olarak sonuç verilir

# Semi-Kantitatif sonuç

- Semi-kantitatif sonuç veren bir yöntemde, benzer olarak "pozitif ve negatif kontrol" serumları veya "kalibratör serumlar" kullanılabilir
- Ancak burada hasta serumlarından alınan OD'ler, cut-off OD'sine bölünerek sayısal bir değer elde edilir
- Bu değer örnekte bulunan antikor düzeyinin gerçek değeri olmayıp rölatif bir değer ifade eder

# Kantitatif sonuç

- Kantitatif sonuç veren bir yöntemde, konsantrasyonları bilinen "standart serumlar" kullanılır
- Fakat kitlere göre değişmek üzere kitin içerdiği standart serum sayısı 3-8 arasında değişmektedir

# Kantitatif sonuç

- Bu tip değerlendirmede, standart serumların konsantrasyonuna karşılık OD'leri kullanılarak bir grafik elde edilir
- Hasta serumları OD'lerinin bu grafikteki karşılıkları gerçek değer olarak ifade edilir
- Bu tip sonuçlar antikor konsantrasyonunun ölçülmesinde ve antikor düzeyinin takibinde değer taşımaktadır



# İmmünofloresans yöntemi (IFA)

- Floresanlanmış antikolar, lamlardaki preparatlarda bulunan antiijenleri ile birleşirler
- Bu lamlar floresan mikroskopunda incelenecek olursa floresans vererek görünür hale gelirler
- Bu yöntemde katı faz lam'lardır ve değerlendirme floresans mikroskobu ile yapılır
  - ❖ En sık kullanılan boya "fluorescein isothiocyanate (FITC)"tır
  - ❖ FITC, yeşil ışık halinde objektife yansıtmaktadır

# İmmünofloresans yöntemi (IFA)

- İncelenecek materyal
  - ❖ Doku kesitleri
  - ❖ İçlerinde bakteri, mantar, parazit ve virüslerin ya da bunların antijenlerinin bulunduğu kültürle ya da hastalık materyali bulunabilir

# İmmünofloresans yöntemi (IFA)

- Uzun zaman alan çeşitli testlerin aksine floresanlı antikor deneyi hemen 1-2 saat içinde sonuç verir
- Ancak özel ayıraçlar ve deneyimli personele ihtiyaç vardır
- İki şekilde uygulanır
  - ❖ Direkt IFA (DFA)
  - ❖ İndirek IFA (IIFA)

# Direkt IFA (DFA)

- Bu yöntemde klinik örnekte **antijen tespiti** yapılır
- Alınan örnek lam üzerine yayılır ve metil alkol ya da aseton ile tespit edilir
- Daha sonra üzerine FITC ile işaretli özgül antikor (konjugat) eklenir ve inkübe edilir
- Floresan mikroskopunda 10x ya da 40x objektif ile incelenir

# İndirek IFA (IIFA)

- Hasta serumunda **antikor tespiti** yapılır
- Kullanılan lamlar, üzerine istenilen antijenlerin fikse edilmesiyle hazırlanır
- Hasta serum örnekleri bu lamlar üzerindeki özel alanlara damlatılır ve inkübe edilir
- FITC işaretli anti-insan antikor (konjugat) eklenir

# İndirek IFA (IIFA)

- IIFA, gerek enfeksiyon hastalıklarının gerekse otoimmün hastalıkların serolojik tanısında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır
- Özellikle otoantikörlerin tespitinde referans yöntem olarak kabul edilmektedir

# Radioimmunoassay (RIA)

- Antijen veya antikor bazı radioizotop maddeler ile işaretlenerek yapılabilmektedir
- Temel mekanizma;
  - ❖ radioizotop bir madde ile işaretli antijen veya antikor aracılığı ile karşılığı olan (özgül olduğu) antikor veya antijenin varlığını ve miktarını saptamaktır
- Özellikle düşük miktardaki antijen tayininde spesifitesi çok yüksek olan bir testtir

# Radioimmunoassay (RIA)

## RIA ile antijen aramak

1. Antikor kaplanmış plastik yüzey
2. Aranmakta olan antijen
3. Varsa o da plastik yüzeye bağlanır, fazlası yıkanır
4. Radyoaktifli antikor
5. O da plastik yüzeye bağlanır, yıkamadan sonra radyoaktifleri ölçülür



# Radioimmunoassay (RIA)

## RIA ile antikor aramak

1. Antijen kaplı plastik yüzey
  2. Aranmakta olan antikor
  3. Varsa o da plastik yüzeye yapışır, fazlası yıkanır
  4. Radyoaktifli antiglobulin
  5. O da komplekse yapışır, sonuç yıkama işleminden sonra radyoaktivite ölçülerek anlaşılır
- 4a. Antiglobulin yerine radyoaktiflendirilmiş bir bağlantı molekülü (örneğin stafilokok A proteini) kullanılabilir
  - 5a. O da antikorun Fc kısmına yerleşir ve radyoaktivite verir

# Presipitasyon testleri

- Özgül antijen ve antikor belirli oranlarda karıştırıldığında, bunların birleşmesine bağlı olarak oluşan kompleks (presipitat) gözle görünür hale gelebilmektedir
- Presipitasyon reaksiyonu
  - ❖ Çözünür haldeki antijenlerin özgül antikorlarla birleşmesi ve kafes oluşturarak çözünür olmayan presipitin (çökelek) oluşturması esasına dayanır

# Presipitasyon testleri

- Presipitasyon temeline dayalı çok sayıda yöntem mevcuttur
- Bunlar genel olarak;
  - ❖ Jelde (immunodifüzyon)
  - ❖ Sıvı ortamda (turbidometrik veya nefelometrik)

# İmmünodifüzyon Yöntemleri

- Bu yöntemler;
  - ❖ Antijen ve antikorun agaroz jel ortamında difüze olarak karşılaşması ve uygun oranlarda karşılatıkları bölgede presipitin bandı oluşturması temeline dayanır

# İmmünodifüzyon Yöntemleri

- İki şekilde uygulanabilir
  - ❖ Çift yönlü difüzyon
    - Ortadakine bilinen antiserum kenarlardakilere ise antijen aranan hasta serumu dilüsyonları damlatılır
    - Presipitasyon bantları değerlendirilir
  - ❖ Tek yönlü difüzyon
    - Antikor jel içine eklenmiştir
    - Çukurlara araştırılacak antijeni içeren serum damlatılır
    - Oluşan halkanın çapı antijen konsantrasyonu ile doğru orantılıdır

# Elektro-immuno difüzyon tekniğine bağlı presipitasyonlar

- Protein karakterindeki maddelerin elektrik yükleri birbirinden farklıdır
- Bu nedenle elektriksel bir alanda hareketleri farklılık gösterir
- Elektriksel alanda antijenlerin elektroforetik olarak ayrıştırılma işlemi "elektroforez" olarak tanımlanır
- İmmünodifüzyon ve elektroforezin birleştirilmesiyle yapılan tekniğe "immünoelektroforez yöntemi" denir

# Elektro-immuno difüzyon tekniğine bağlı presipitasyonlar

- Elektroforez için değişik tipte matriksler kullanılabilir
  - ❖ Kağıt
  - ❖ Agar
  - ❖ Poliakrilamid jel

# Elektro-immuno difüzyon tekniğine bağlı presipitasyonlar

- Antijen ve antikor moleküllerinin agaroz jeldeki hareketleri elektrik akımı kullanılarak kolaylaştırılmış ve hızlandırılmıştır
- Moleküllerin uygun oranlarda karşılaştıkları bölgelerde presipitin bantları oluşur



# Elektro-immuno difüzyon tekniğine bağlı presipitasyonlar

- İki şekilde uygulanabilir
  - ❖ Basit, tek yönlü immunodifüzyon (Laurell tekniği)
  - ❖ Karşıt immunoelektroforez (Counter Immuno Electrophoresis = CIE)

# Turbidometrik ve Nefelometrik ölçümler

- İmmunodifüzyon testi teknik olarak kolaydır
- Ancak çok sayıda ayrı örneği aynı anda değerlendirilmesi gerektiğinde iş zorlaşmaktadır

# Turbidometrik ve Nefelometrik ölçümler

- Bu nedenle;
  - ❖ antijen ve antikor bağlanması ile oluşan immün kompleks miktarını daha hızlı ölçmek için
    - Turbidometrik
    - Nefelometrik, yöntemler geliştirilmiştir
- Bulanıklık ölçümü esasına dayanan yöntemlerdir

# Turbidometrik ve Nefelometrik ölçümler

- Bu tekniklerde;
  - ❖ İmmün kompleks süspansiyonu içeren küvete monokromatik bir ışık gönderilir
  - ❖ Gönderilen ışık immün kompleksler tarafından hem absorbe edilir, hem de defleksiyona (sapmaya) uğratılır

# Turbidometrik ve Nefelometrik ölçümler

- Turbidometrik ve nefelometrik yöntemde absorbe edilen veya defleksiyona uğratılan ışık miktarı sıvı ortamdaki immün kompleks miktarı ile doğru orantılıdır
- Bilinen antijen ve antikor miktarı ile önce standart eğri oluşturulduğunda, içeriği bilinmeyen örneklerdeki antijen veya antikor miktarı saptanabilir

# Turbidometrik

## ➤ Turbidometrik yöntemde

- ❖ immün kompleksler tarafından absorbe edilen ışık miktarı spektrofotometrik olarak ölçülür
- ❖ partikülün bulunduğu süspansiyondan geçen ışığın ölçümüdür

# Nefelometrik

- Nefelometrik yöntemde
  - ❖ çözeltide süspansiyon halinde bulunan immün kompleksler tarafından saçılan ışığın ölçümüdür
- Nefelometrik ölçümlerin avantajları
  - ❖ düşük konsantrasyonlarda daha yüksek duyarlılığa sahiptir

# Kemilüminesans yöntemi

- Bir kimyasal reaksiyon sonucu ışık salınmasıdır
- Kimyada pek çok uygulaması görülür



# Kemilüminesans yöntemi

- Bazı enzim reaksiyonları ışık üretirler ve bu yolla ürün oluşumu ölçülebilir
- Yaygın kullanımı;
  - ❖ Enzimatik kemilüminesans ile peroksidaz tespiti
  - ❖ Western blot ile antikorların tespiti

# Kemilüminesans yöntemi

- En iyi bilinen KLM sistemleri;
  - ❖ luminol ve türevleri
  - ❖ oksalat esterleri
  - ❖ lusigenin
  - ❖ lusiferin

# Kemilüminesans yöntemi

- KLM sistemleri
  - ❖ yüksek duyarlılık
  - ❖ yüksek özgüllük
  - ❖ geniş saptama aralıklarına, sahiptir

# Kemilüminesans yöntemi

- Bu tip sistemlerde ikincil antikolar,
  - ❖ substratları ışık sinyali (kemilüminesan) oluşturacak ürünlere dönüştüren enzimlerle işaretlidir

# Akım sitometri yöntemi

- Akım sitometri;
  - ❖ Hücrelerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir
- Oluşan sinyallerin kaynağı,
  - ❖ hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi
  - ❖ hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir

# Akım sitometri yöntemi

- Bu yöntem ile bir süspansiyon halindeki hücreler;
  - ❖ lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir ve
  - ❖ hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir

# Akım sitometri yönteminin çalışma prensibi

- Bu sinyaller dijitalleştirilerek, histogramlar olarak ekrana aktarılır
  - ❖ Histogram, ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarının görsel sunumudur

# Akım sitometri yöntemi

- Bu yöntem ile hücrelerin aşağıdaki özellikleri hakkında bilgi toplanabilir
  - ❖ İmmünofenotipi
  - ❖ DNA içeriği
  - ❖ Enzim aktiviteleri
  - ❖ Hücre membran potansiyeli
  - ❖ Canlılığı



