

**SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK
YÜKSEKOKULU**

TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ

TLT114-İMMÜNOLOJİK YÖNTEMLER

Öğr. Gör. Nüket ÇALIŞKAN
nuket.caliskan@omu.edu.tr

1

AGLÜTİNASYON TESTLERİ

TLT114-İMMÜNOLOJİK YÖNTEMLER

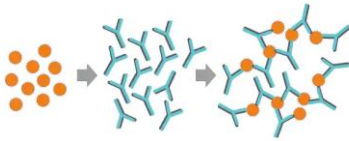
Hafta-3, 4



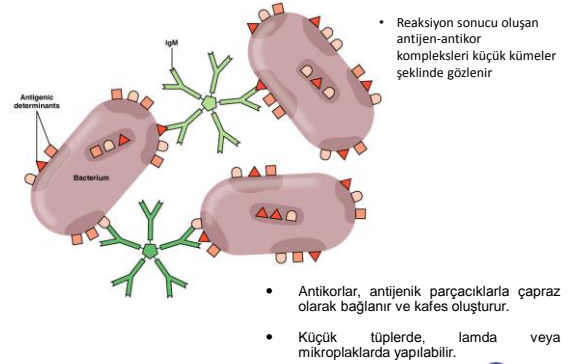
2

AGLÜTİNASYON

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



3



4

Aglütinasyonun Kullanım Alanı

- Mikroorganizma antijenlerine karşı hasta serumlarında antikor aranarak hastalık tanısı koymak
- Bilinen antikorlarla kaplı partiküller (lateks, bentonit vb.) kullanarak hastalık materyalinde antijen arayarak tanı koymak
- Bilinen antikorları (antiserumları) kullanarak muayene maddelerinden kültürde üretilen mikroorganizmaların serotip tayinini yapmak
- Ayrıca titrasyon yapılarak antikor miktarı da belirlenebilir.



5

Partiküler antijen olarak,

- Doğal olarak antijen taşıyan
 - ✓ Bakteriler, Eritrositler, Lökositler
- Yüzeylerinde yapay olarak antijen bulunan taşıyıcı partiküller
 - ✓ Eritrosit, Latex, Bentonit
 - ✓ Polistren gibi sentetik parçacıkların



6

Aglütinasyonun meydana gelmesi için bazı şartlar gerekir:

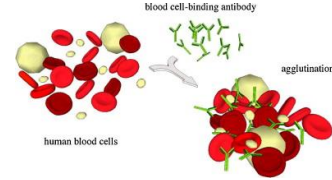
- ✓ Ortamda elektrolitler olmalıdır. Bu nedenle aglütinasyon testleri serum fizyolojikle yapılır.
- ✓ pH'ın nötral veya nötrale yakın olması gerekir.
- ✓ Isının önemi vardır; aglütinasyon optimal ısı derecesinde yapılmalıdır.
- ✓ İyi bir aglütinasyon elde etmek için antijenin tuzlu suda iyi süspansiyon olması gerekir.



7

Aglütinasyon testleri

- Partiküler antijen olarak eritrositin kullanıldığı aglütinasyon testlerine **hemagglütinasyon testleri** denir.



8

Aglütinasyon testleri

- İkiye ayrılır
 - Direkt (Aktif) aglütinasyon testleri
 - İndirek (Pasif) aglütinasyon



9

Direk Aglütinasyon Testleri

Antijen veya antikorların herhangi bir taşıyıcı aracılığı olmadan direkt olarak araştırılmasıdır.

- Özgül antikorların varlığında mikroorganizma antijenlerinin kümelenmesini içerir.
- Riketsiyoz tanısında: Weil-Felix testi,
- Tifo tanısında: Gruber-Widal testi
- Bruselloz tanısında: Rose Bengal ve Wright testleri



10

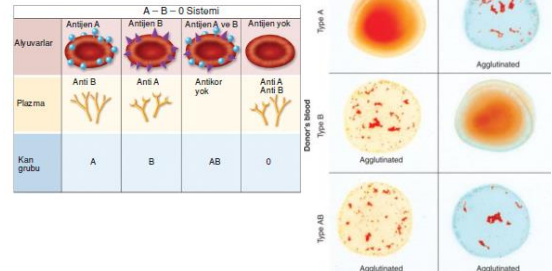
Direk Aglütinasyon Testleri

Aglütinasyonda rol alan **antijen partikülün kendisidir**

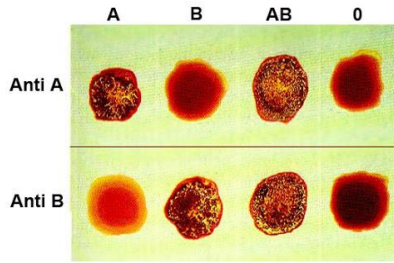
- ✱ Bakterilerin antijenleri kullanılabilir
 - ✱ Gruber-Widal, Wright, WF
- ✱ Eritrositlerin antijenleri kullanılabilir.
 - ✱ **Aktif (direk) hemagglütinasyon**
 - ✱ ABO, Rh, Vd
 - ✱ Soğuk aglütinasyon
 - ✱ **M.pneumoniae**
 - ✱ Paul-Bunnell
 - ✱ **EBV**



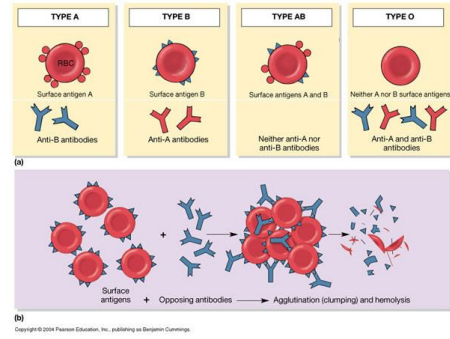
11



12



13



14

Direk Aglütinasyon Testleri

- Rose-bengal: Brusellozis tanısında kulanılan, bir lam aglütinasyon deneyidir.
- Kan grubu tayini: Lamda veya tüpte yapılan bir hemaglütinasyon deneyidir.
- Gruber-widal: Salmonellozis tanısında kullanılan tüp aglütinasyon deneyidir.
- Wright: Brusellozis tanısında uygulanan tüp aglütinasyon deneyidir.
- Weil-felix: Riketsiya hastalıklarının tanısında uygulanan tüp aglütinasyon deneyidir

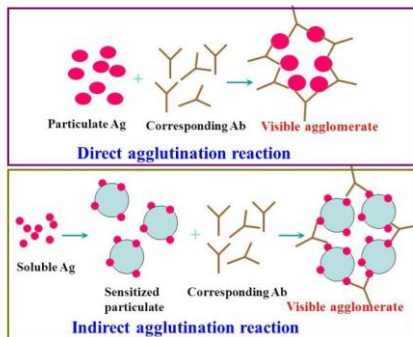
15

İndirek (Pasif) aglütinasyon

Bu yöntemde çözünebilir antijen eritrosit ve lateks parçacıkları gibi partiküler yapıdaki taşıyıcılara bağlanmaktadır.

- Bu sayede antijene partiküler bir yapı kazandırılmış olur.
- Böylece, eğer incelenen örnekte özgül antikor varsa gözle görülebilir bir çökme elde edilir.

16

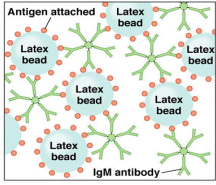


17

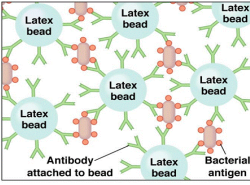
İndirek (Pasif) aglütinasyon

- **Lateks lam aglütinasyonları:** Lateks partiküllerine çeşitli antijenlerle kaplanarak çok sayıda mikrobik hastalık için tanı testleri üretilmiştir. Örn. CRP tayini, streptokok tip tayini vb.
- **Ters pasif aglütinasyon:** Antikoron taşıyıcı parçacıklara bağlanarak antijen aranması

18

Lateks lam aglütinasyonları

(a) Reaction in a positive indirect test for antibodies. When particles are coated with antigens, agglutination indicates the presence of antibodies, such as the IgM shown here.

Ters pasif aglütinasyon:

(b) Reaction in a positive indirect test for antigens. When particles are coated with monoclonal antibodies, agglutination indicates the presence of antigens.

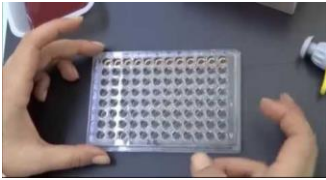
İndirek (pasif) hemaglütinasyon (İHA)

Çeşitli antijenler (bakteriyel, viral, fungal, paraziter), eritrosit (genellikle koyun eritrositleri) yüzeyine bağlanmıştır

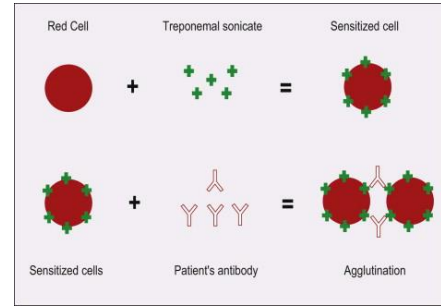
- Bu yöntem antikor saptanmasında kullanılan ve 96 çukurlu "U" tabanlı mikropleytlerde gerçekleştirilir
- Duyarlılığı yüksek bir yöntemdir ortamda çok az antikor bulunması halinde bile sonuç vermeye yeterli olur

19

20



21



22

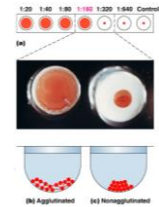
İHA

- Bu yöntemde, etkenin direkt HA göstermesine gerek bulunmamaktadır.
- Reaksiyonun kısaca mekanizması şöyledir: Bakterilerin etrafında bulunan protein, glikoprotein, glikolipoprotein, vs. özelliğindeki antijenik strüktürlerin ekstraksiyonu yapılır.
- kullanılacak alyuvarlar önce tannik asitle muamele edildikten sonra antijenik substanslarla direkt temasa geçirilerek bu maddelerin alyuvarlarının yüzeyine adsorbe olması sağlanır.
- Sonra böyle hazırlanan alyuvar suspansiyonu, testin karakterine göre belli oranda sulandırılarak kullanılır.
- Bunlar taşıdıkları antijenlerin antikorları ile karşılaştıklarında aglütinasyon verirler

İndirek (pasif) hemaglütinasyon

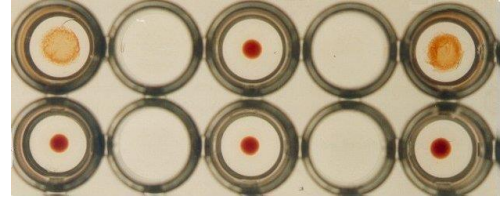
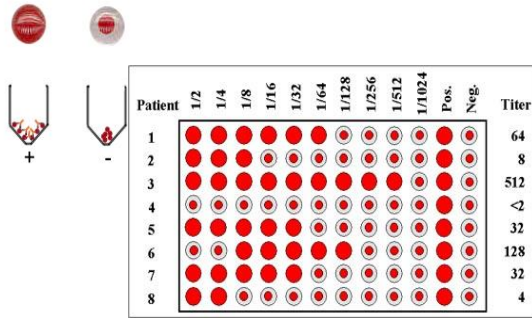
- Hasta serumu dilüsyonları üzerine duyarılaştırılmış eritrositler eklenir

- Pozitiflik olduğunda hemaglütinasyon, negatiflik varsa düğme gibi çökme görülür



23

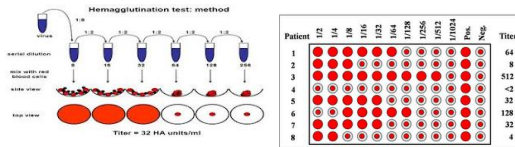
24



25

26

İndirek (pasif) hemaglütinasyon



27

İndirek (pasif) hemaglütinasyon

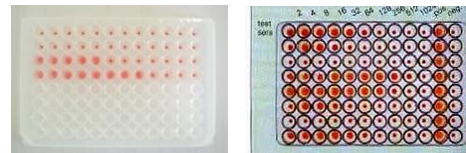
- Teste hasta serumu kontrolü ve eritrosit kontrolü kullanılmalı ve bunlarda çökme olduğunda değerlendirme yapılmalıdır
- Hasta serumu kontrolünde hemaglütinasyon olması; serumda koyun eritrositlerine karşı heterofil antikor varlığını gösterir.
- Bu durumda hasta serumu, adsorban (konsantre koyun eritrosit süspansiyonu) ile muamele edilir, santrifüj ile heterofil antikorlar uzaklaştırılır ve test tekrar çalışılır

28

İndirek (pasif) hemaglütinasyon

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

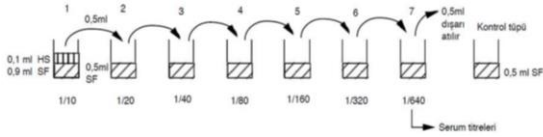
İndirek (pasif) hemaglütinasyon



29

30

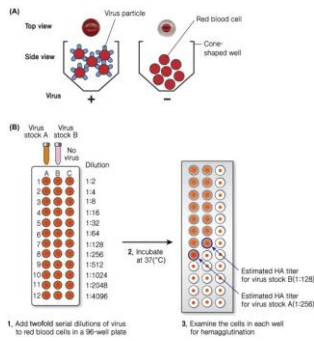
- Serolojik testlerde antikor varlığını göstermek kadar, antikor düzeyinin(miktarının) belirlenmesi de önem taşır. Bu nedenle çoğu infeksiyon hastalığında antikor miktarını belirlemek için serolojik testlerde serum sulandırılmaları yapılır.



31

- Deney sonucunda hiç bir sulandırmada reaksiyon görülmezse, serolojik test(-) negatiftir, aranan antikor yok demektir. Serolojik test tüplerinde reaksiyon varsa antikor varlığını gösterir. Reaksiyonun görüldüğü en son tüpün dilüsyonu, o serumun antikor titrasyonu olarak ifade edilir

32

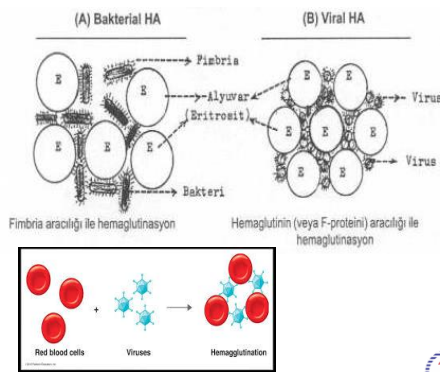


33

Hemagglütinasyon İnhibisyon (Hi) testi

- Bazı bakteri ve viruslar dış yüzeylerinde sahip oldukları yapılar sayesinde eritrositlere bağlanabilir ve onları çöktürebilirler.
- Olay bir antijen antikor olayı değildir
- Direk olarak bazı mikroorganizmlarda bulunan eritrositlerdeki algaçlara yapışma ve onları çöktürme özelliğidir.
- Aslında Bu durum direk hemagglütinasyon olayıdır.

34



35

Hemagglütinasyon İnhibisyon (Hi) testi

- Bu özelliği gösteren virüslerin başında İnfluenza virüsleri gelir
- Bunlardan başka
 - Kabakulak
 - Kızamıkçık
 - Kızamık
 - Çiçek
 - Suçiçeği
 - Adenovirüsler
 - Reovirüsler

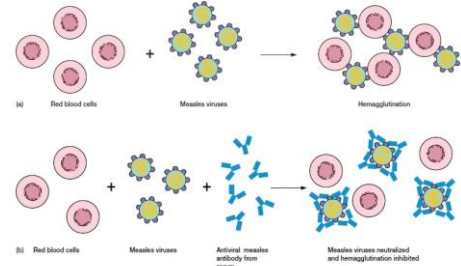
36

Hemaglütinasyon İnhibisyon (Hi) testi

- Virüslerin hemaglütinasyon olayı, antijen – antikor temeline dayalı bir olay değildir
- Ancak bu virüslerle enfekte olmuş kimselerin kanında oluşan bazı antikorlar, o virüsün eritrositlerle birleşmesini engeller



37



38

Hemaglütinasyon İnhibisyon (Hi) testi

- İşte bundan yararlanılarak birçok virüs enfeksiyonunun tanısında kullanılan önemli bir serolojik deney geliştirilmiştir
- Buna, **Hemaglütinasyon önlenim** (Hemaglütinasyon inhibisyonu) deneyi adı verilir

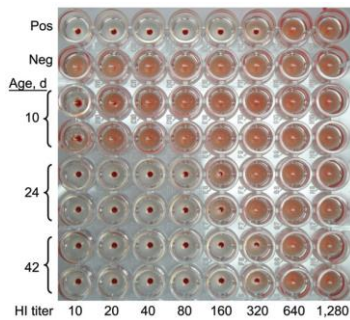


39

	Eritrositler		
Kontrol			Aglütinasyon yok
Hastalığ Geçirmemiş	Virus + Eritrositler		Hemaglütinasyon Negatif
Hastalığ Geçirmiş	Virus + Antikor + Eritrositler		Hemaglütinasyon İnhibisyon Pozitif



40



41

Hemaglütinasyon İnhibisyon testi Deneyde uygulanacak temel işlemler

- Eritrositler, Serum Fizyolojik ile %0,5 olacak şekilde süspansiyon edilir
- Antijen olarak kullanılacak virüs, sulandırılır ve eritrositlerle titre edilir
 - Amaç eldeki virüsün hangi dilüsyonda eritrositleri aglütine edebileceğini saptamaktır



42

Hemaglütinasyon İnhibisyon testi Deneyde uygulanacak temel işlemler

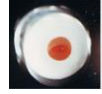
- **Hasta serumu** bir sıra tüp içinde uygun hacimde (0,25 ml) ve uygun şekilde sulandırılır
- Deneye pozitif ve negatif kontrol serumları da kontrol olarak sokulur
- Sulandırılmış her tüpteki serum üzerine titre edilmiş **virüslerden** 0,25 ml konur



43

Hemaglütinasyon İnhibisyon testi Deneyde uygulanacak temel işlemler

- Tüm tüplere aynı hacim **eritrosit** süspansiyonu konur ve oda ısısında bir saat bekletildikten sonra okunur
- Serumda virüse karşı antikorlar oluşmuş ise o virüsün eritrositlerle birleşmesini önlerler
- Bu nedenle hemaglütinasyon oluşmaz (Pozitif)
 - Eritrositler tüp dibine yoğun olarak ve bir düğme görüntüsünde çökerler



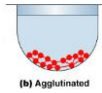
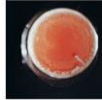
(c) Nonagglutinated



44

Hemaglütinasyon İnhibisyon testi Deneyde uygulanacak temel işlemler

- Serumda antikor yoksa virüs, eritrositleri aglütine eder (Negatif)
 - Tüp dibinde çökelti oluşur



(b) Agglutinated



45

Hemaglütinasyon önlenim (HÖ) testi Dikkat edilecek noktalar

- Test oda ısısında yapılmalı ve değerlendirilmeli
- Test yapılmadan hemen önce virusun HA titresini yeniden saptanmalı HA ünitesi iyi belirlenmeli
- Virus ve alyuvar stok süspansiyonları kullanılmadan önce homojen olarak, iyice karıştırılmalı
- Serum dikkatli bir şekilde sulandırılmalı ve kabul edilen metoda göre iki kat yapılmalı (1/2, 1/4, 1/8, ..)
- Sonuçlar 45-60 dk içinde okunmalı



46