

**SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK
YÜKSEKOKULU**

TIBBİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ

TLT114-İMMÜNOLOJİK YÖNTEMLER

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

1

ELISA**TLT114-İMMÜNOLOJİK YÖNTEMLER**

Hafta-4,5,6

2

İŞARETLİ KATI FAZ YÖNTEMLERİ

İşaretili katı faz yöntemlerinin ortak ve temel mekanizması;

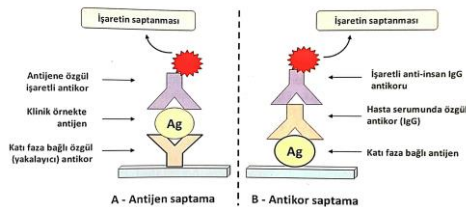
- reaktiflerden birisinin (antijen veya antikor) katı faza bağlanarak hareketsizleştirilmesi
- daha sonra özgül birleşmenin işaretili bir reaktif (konjugat) kullanılarak gösterilmesidir.

❖ İşaret maddesini taşıyan reaktiflere **konjugat** denir.

3

Yöntem	Orjinal adı	Kısa adı	İşaret	Katı faz	Saptama sistemi
Enzim bağlı immünoelotik yöntem	Enzyme-linked immunosorbent assay	ELISA	Enzim (HRP, AP)	Mikroplatt, cakurları, manyetik biyalır	Spektrofotometre ile absorbanz ölçümü
Radioaktif madde bağlı immünoelotik yöntem	Radioimmunoassay	RIA	Radioaktif madde (¹²⁵ I)	Tüpler veya cam biyalır	Gama sayıcı veya sıvı şinilasyon sayacı ile radyoaktivite ölçümü
İmmünofloresans yöntemi	Immunofluorescence assay	IFA	Fluorokrom madde (FITC)	Üzerine antijenlerin fiks edildiği lamalar	Fluoresan mikroskopu ile sıvı ya da katı ortama görünmesi
Kemilüminesan yöntem	Chemiluminescence assay	CLA	Bioluminesan madde (luminol, tiorover)	Manyetik partiküller, mikroplatt, cakurlar	Luminometre ile ışık (foton) salınımının ölçümü
İmmünoelot	Immunoblotting	IB*	Enzim	Antijen içeren nitroelotizentler	Görsel olarak koyu renkli bant oluşumunun izlenmesi
Optik immünoelotik yöntem	Optical immunoassay	OIA	Enzim (HRP)	Silikon yüzeyler (ince film)	Görsel olarak (altın renkli zeminde pembe-mor noktaların oluşumu)
İmmüno-kromatografi (Lateral akım yöntemi)	Immuno-chromatography (Lateral flow assay)	ICA	Altın nanopartiküller	Nitroselüloz membranlar	Görsel olarak

4

İŞARETLİ KATI FAZ YÖNTEMLERİ

5

ELISA

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi;

- ✓ antijen-antikor ilişkisini antikorlara bağlanmış bir enzimin aktivitesini izlemekle araştırma temeline dayanır.

Konjugat: Enzim ile işaretili antikorlar

Kullanılan başlıca enzimler;

- ✓ Peroksidaz
- ✓ alkalin fosfat
- ✓ betagalaktosidaz'dır.
- ❖ Bu enzimler Spesifik substratları renkli ürünlere çevirirler.

6

ELISA yöntemi:

Hepatit virüsleri, Rotavirüs, EBV, Adenovirüs, Herpes virüsler, CMV, human Immunodeficiency virüs(HIV), Rubella, Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Entamoebahistolytica, T. gondii gibi pek çok bakteriyel, viral ve protozoal hastalıkta;

- ✓ antijen arama,
- ✓ antikor arama
- ✓ ve bunları kantite etmek amaçlı kullanılmaktadır.



7

• ELISA yönteminde;

- özgül antikor kullanılarak örnekteki antijenin miktarını,
- özgül antijen kullanarak örnekteki antikorum miktarını ölçebiliriz.



8

ELISA

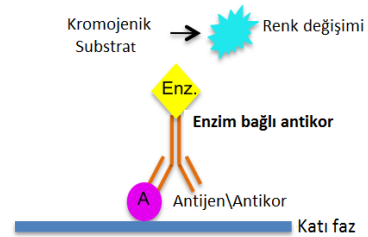
Uygulanması kolay, güvenilirliği yüksek, hızlı sonuç verebilen testler olduğu için çok fazla tercih edilen bir yöntemdir.

- 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
 - ✓ Sonuçların kalitatif ya da kantitatif olarak alınabilmesidir



9

ELISA Yönteminin Prensibi



10

ELISA Yönteminin Bileşenleri

Katı faz (Matriks)

- Manuel ELISA yöntemlerinde kullanılan katı faz, genellikle
 - çukurlarına analitlerin (antijen veya antikor) bağlanmış olduğu 96 çukurlu mikroyerlerdir
- ELISA prensibi ile çalışan otomatize sistemlerde ise
 - submikron boyutlarda manyetik bilyalar veya lateks partikülleri kullanılır



11

ELISA Yönteminin Bileşenleri

Konjugat: Enzim ile işaretli antikorlar

Konjugatın yapısındaki antikor

- Tespiti amaçlanan etken için spesifiktir
 - ✓ Örneğin ELISA testi "A" antijenin varlığını araştırmak için yapılıyor ise antikor "A" antijenine karşı oluşmuştur
- Primer antikora spesifiktir.
 - ✓ Örneğin sığır serumunda bir antikor varlığı aranıyor ise, anti-sığır Ig G'ler konjugatın yapısında bulunur
 - ✓ Direkt ELISA testinde konjugat antijene karşı, indirekt ELISA testinde ise primer antikora karşı hazırlanmıştır.



12

ELISA Yönteminin Bileşenleri

Enzim ve substratlar

- **Substrat:** Konjugatın yapısındaki enzim ile reaksiyona girerek, antijen-antikor komplekslerinin oluşumunu ortaya koyan maddedir.
- Reaksiyon sonucunda substratın yapısındaki kromajen maddenin yapısına göre mavi, yeşil, sarı, vb. renklerde ürünler oluşur.



13

ELISA Yönteminin Bileşenleri

Enzim ve substratlar

- Konjugatın işaretlenmesinde en sık kullanılan enzimler
 - alkalen fosfataz (AP)
 - ✓ substrat BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium)
 - horseradish peroksidaz (HRP)
 - ✓ substrat TMB (tetramethylbenzidine)
- Bu enzimlerin kromojenik substratlarıyla birleşmesiyle renk değişimi görülür.
 - **Kromojenik özellik:** Önceden renksiz olup reaksiyona girdiğinde renkli ürün oluşturan moleküller.



14

ELISA Yönteminin Bileşenleri

Yıkama

- ELISA yöntemlerinde her bir safha arasında fosfatlı tampon solusyonu (PBS, wash buffer) ile yıkama işlemi önemli bir yer tutmaktadır
- Bu işlem, özgül bağlanmaları etkilemezken özgül olmayan bağlanmaları gidermektedir
- Yıkama işlemleri iyi yapılmadığında **yalancı pozitiflikler** saptanabilir



15

ELISA Yönteminin Bileşenleri

Durdurma

- ELISA'nın son safhası olan "reaksiyonun durdurulması" basamağında asidik veya bazik çözeltiler kullanılır
 - H_2SO_4 , HCl, NaOH
- Böylece enzim-substrat reaksiyonu istenilen sürede sona erdirilir
- Bu işlemin yapılmaması ya da geç yapılması,
 - kromojenik substratın bir süre sonra kendiliğinden (özgül olmayan) renk değiştirmesine, dolayısıyla da geçersiz sonuçların elde edilmesine neden olur.



16

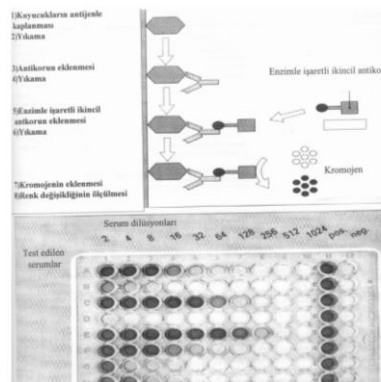
ELISA Yönteminin Bileşenleri

Okuma

- Reaksiyon sonunda oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülür.
- Okumada en sık kullanılan dalga boyu 405, 450 ve 630 nm'dir
- Sonuçlar tek bir dalga boyunda okutulabileceği gibi çift dalga boyuyla da okutulabilir
- Çukurların renk şiddeti (absorbans değeri = optik dansite) örnekteki analitin konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir

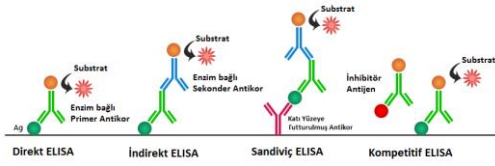


17



18

ELISA Yönteminin Çeşitleri

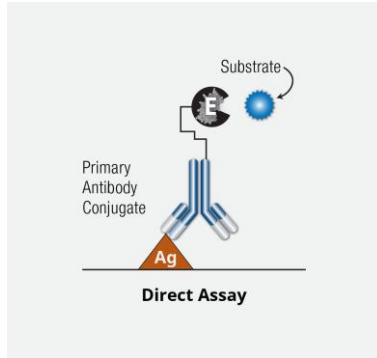


19

Direkt ELISA

- Tek basamaktan oluşur. Primer antikor konjugattır.
- Yüksek molekül ağırlıklı antijenin miktar tayini için uygundur.
- Numune içindeki antijenler nonspesifik olarak mikrotitre kabının kuyu yüzeyine bağlanır.
- İşaretli antikor kuyucuklara eklenir.
- Belirli sürelerde inkübe edilir.
- Yapılan yıkama işlemi ile bağlanmamış işaretli antikorlar ortamdaki uzaklaştırılır.
- Kuyulardaki bağlanmış enzim işaretli antikor miktarı, ortama enzimin substratının eklenmesi ile oluşan renk değişimi sayesinde belirlenir.

20

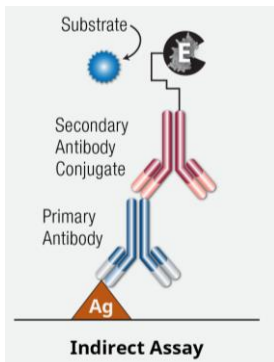


21

İndirekt ELISA

- İki basamaktan oluşur. Sekonder antikor konjugattır.
- Numune içindeki antijenler mikrotitre kabının kuyu yüzeyine bağlanır.
- İlk olarak işaretli primer antikorlar kuyulara eklenir.
- Antijen ve primer antikor belirli sürelerde inkübe edilir.
- Yapılan yıkama işlemi ile bağlanmayan primer antikorlar ortamdaki uzaklaştırılır.
- Sonrasında primer antikorlara spesifik, enzim ile işaretli sekonder antikor kuyulara eklenir.
- Belirli sürelerde inkübe edilir.
- Tekrar yapılan yıkama işlemi ile bağlanmayan işaretli sekonder antikorlar ortamdaki uzaklaştırılır.
- Son olarak enzimin substratı kuyulara eklenir ve elde edilen renk değişimi ile antikorlar belirlenir.

22



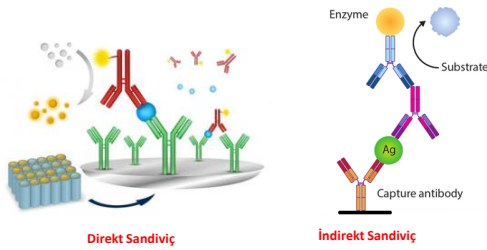
23

Sandviç ELISA

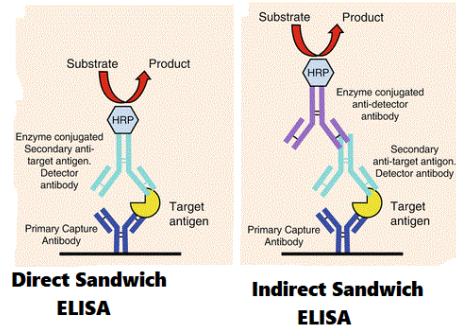
- Bu test ile bilinmeyen örneklerin içindeki antijen miktarı belirlenir.
- Direkt veya indirekt ELISA ile oluşan renk değişimi antikorun varlığına işaret ederken;
- Sandviç ELISA da oluşan renk değişimi antijenin varlığına işaret eder.
- Direkt veya indirekt olarak uygulanabilir.

24

Sandiviç ELISA



25



26

Sandiviç ELISA

- Sandwich ELISA' da antikorlar (yakalama antikor) mikrotitre kabının kuyucuklarının katı fazına immobilize edilir.
- Antijeni içeren örnek daha sonra ilave edilir ve antijen-antikor kompleksinin oluşması beklenir.
- Bağlanmamış proteinler yıkama basamakları ile uzaklaştırılır.
- Enzim işaretli ikinci bir antikor (deteksiyon antikor), yakalama antikoruna bağlanmış antijene farklı bir epitopundan bağlanır.
- Bağlanmayan deteksiyon antikorunun yıkama işlemi ile uzaklaştırılmasından sonra, ortama enzime ait substrat eklenir.
- Substrat deteksiyon antikoruna bağlı enzimle reaksiyona girerek renk değişimine neden olur.
- Bu renk değişimi de spektrofotometre ile ölçülür.

27

Sandiviç ELISA

- Renkli ürün oluşumu, işaretli ligandın (serumdaki antijen veya antikor) konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.
- Bu tekniğin ana avantajı, antijenin kullanılmadan önce saflaştırılmasına gereksinim olmamasıdır ve sandiviç ELISA çok spesifik.
- Bu tekniğin dezavantajı ise her antikorun kullanılmamasıdır.
- Seçilen monoklonal antikor kombinasyonları aynı antijen üzerinde üst üste binmeden farklı epitoplara tanınmalıdır.

28

Kompetitif ELISA

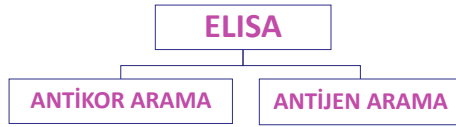
- Mikrotitre kabının kuyucuklarının katı fazına antijen veya antikor bağlanır.
- Çukurlara serum (işaretsiz ligandı çerir) ve reaktif (işaretli ligand içerir) eklenir.
- İnkübasyon süresince immobilize antijen veya antikora bağlanmak için işaretsiz ligand ile enzim işaretli ligand yarışır.
- İnkübasyon ve yıkama işleminden sonra substrat eklenir.

29

Kompetitif ELISA

- Reaksiyon sonucu oluşan renk değişikliği, hasta örneğindeki işaretsiz ligand miktarı ile ters orantılıdır.
- Örnekte ne kadar az işaretsiz ligand varsa birleşen işaretli ligand miktarı da o kadar fazla olacaktır.
- Sonuçlar spektrofotometrik olarak değerlendirilir.
- Kompetitif ELISA yöntemi, sıklıkla antikor ölçümünde kullanılmaktadır.

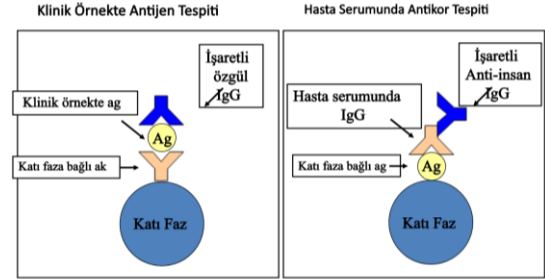
30



ELISA plakları hazırlanırken, antijen aranacaksa antijene özgül antikor veya antikor aranacaksa antikora özgül antijen katı faza (plastik çukur veya boncuğa) bağlanmalıdır.



31



32

ANTİKOR ARAMA

- Mikropleyt çukurlarına özgül antijen bağlıdır
- Çukurlara hasta serum dilüsyonları eklenir
- Hasta serumunda aranan Özgül antikor (IgG veya IgM) varsa katı yüzeye bağlı antijenle birleşir.
- İndirekt ELISA antikor tespiti için sıklıkla kullanılır.



33

ANTİKOR ARAMA

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



34

ANTİKOR ARAMA

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



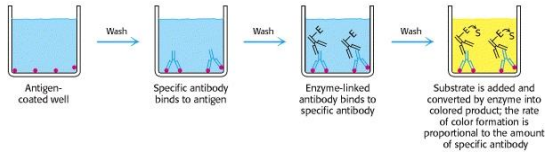
35

- 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

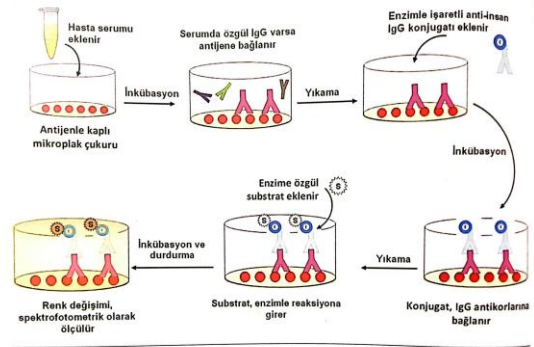


36

ANTİKOR ARAMA



37



► Şekil 6.5 ELISA ile antikor tespiti (indirekt yöntem).

38

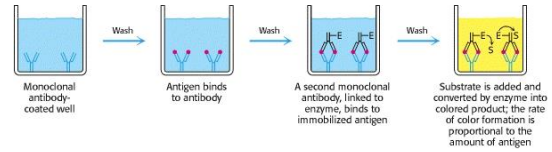
ANTİJEN ARAMA

- 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



39

ANTİJEN ARAMA



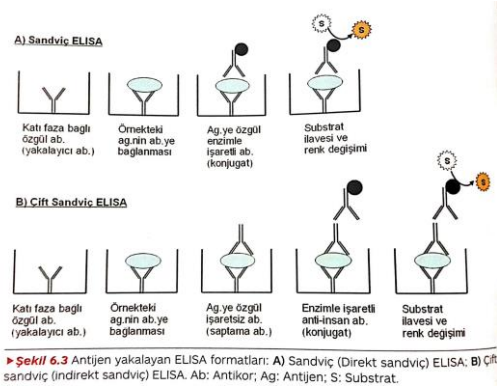
40

ANTİJEN ARAMA

- Direkt Sandivîç ELISA
- İndirekt Sandivîç ELISA
- Kompetitif ELISA

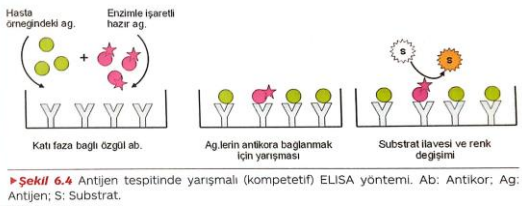


41



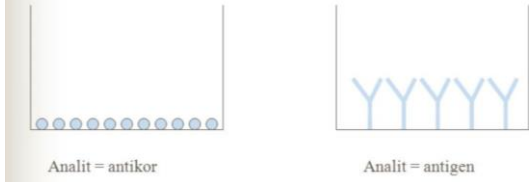
► Şekil 6.3 Antijen yakalayan ELISA formatları: A) Sandivîç (Direkt sandivîç) ELISA; B) Çift sandivîç (İndirekt sandivîç) ELISA. Ab: Antikor; Ag: Antijen; S: Substrat.

42



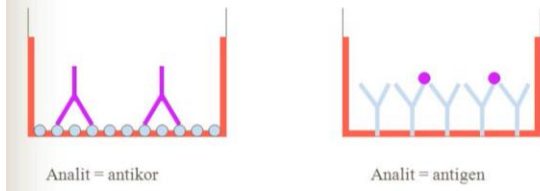
43

1. Solid faz antijen ya da antikor ile kaplanır.



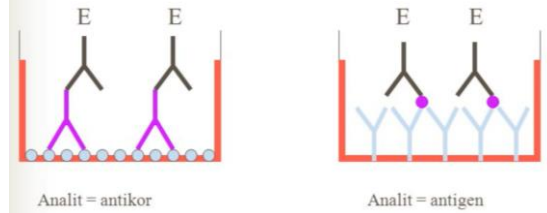
44

2. Örnek eklenir. İnkübasyon, yıkama



45

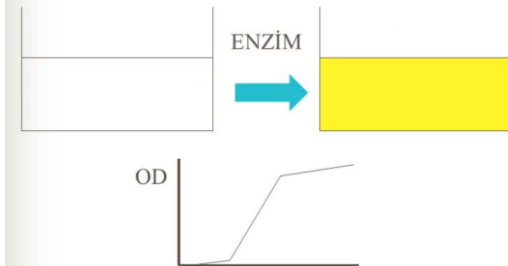
3. Konjugat eklenir. İnkübasyon, yıkama.



46

4. Substrat eklenir.

6. Stoplanır ve renk değişimi ölçülür.



47

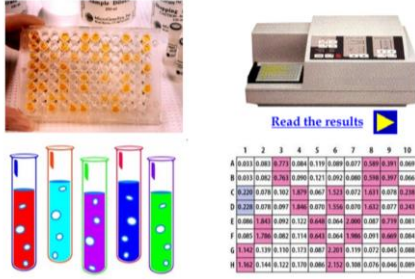
SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

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



48

Spektrofotometrik Değerlendirme



49

SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

- 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

50

Kalitatif Sonuç

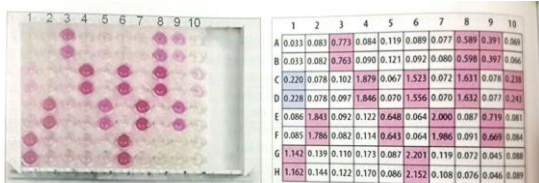
- Kalitatif sonuç veren bir yöntemde, kitin önerisine göre “pozitif ve negatif kontrol serumları” veya “kalibratör serumlar” kullanılabilir
- Bu serumların OD'lerinden hesaplanan bir “cut-off” (eşik) değeri vardır
- Örneklerin OD'leri buna göre değerlendirilerek “pozitif” veya “negatif” olarak sonuç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

51

Kalitatif sonuç

- Bu tip sonuçlar genellikle antijen, bazen de IgM varlığının ya da yokluğunun belirlenmesinde değerlidir
- IgG düzeylerinin ölçülmesi ve takibinde değer taşımaz

52



► Şekil 6.8 Sonuçlanmış HAV-IgG ELISA mikropişiği (solda) ve ölçülen OD değerleri (sağda). Bu testte, her örnek için iki çukur kullanılmıştır.

53

Şekil 6.8'de görülen bazı seçilmiş çukurların OD'leri aşağıdaki gibidir:

A1, B1 → Negatif kontrol (NK) → OD ortalaması: 0.033

C1, D1 → Pozitif kontrol (PK) → OD ortalaması: 0.224

E1, F1 → 1 nolu hasta → OD ortalaması: 0.085

G1, H1 → 2 nolu hasta → OD ortalaması: 1.152

G4, H4 → 14 nolu hasta → OD ortalaması: 0.171

E7, F7 → 25 nolu hasta → OD ortalaması: 1.993

A8, B8 → 27 nolu hasta → OD ortalaması: 0.593

“X” kitinin prospektüsünde, kalitatif sonuçlar için kullanılacak olan formülün; $Co = PK - NK$ şeklinde olduğu varsayılırsa, yukarıdaki test için $Co = 0.224 - 0.033 = 0.191$ olacaktır. Dolayısıyla bu değerin üzerindeki sonuçlar “pozitif”, altındaki sonuçlar “negatif” olarak verilir.

54

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 rölaf bir değer ifade eder
 - Örn; TU/ml (test ünitesi), AU/ml (arbitrary-keyfi-unit)



55

Semi-Kantitatif sonuç

- Bir hasta değerinin, kitte önerilen referans aralığının üzerinde olması, belirli bir düzeydeki pozitifliği göstermektedir
- Bu tip sonuçlar antikor konsantrasyonunun ölçülmesinde değer taşımaz, ancak antikor düzeyinin takibinde kullanılır.



56

"X" kitinin prospektüsünde, yarı-kantitatif sonuçlar için kullanılacak olan formül ise: S/Co = Örnek (Sample) OD'si/Eşik değer (Co) OD'si şeklinde olup, yorumlamanın şu sonuçlara göre yapılması önerilmektedir: S/Co= 0.0-0.6 TU/ml ise negatif; S/Co= 0.7-0.9 TU/ml ise sınırda (borderline); S/Co >1.0 TU/ml ise pozitif.

Bu bilgiler ışığında, yukarıdaki örnekte görülen 1, 2, 14, 25 ve 27 no'lu hastaların kantitatif ve yarı kantitatif sonuçları Tablo 6.2'deki gibidir.

► **Tablo 6.2** Yukarıda sonuçları görülen seçilmiş hastaların kantitatif ve yarı kantitatif sonuçları (Co=0.191)

Hasta No	Kantitatif değerlendirme		Yarı kantitatif değerlendirme	
	Negatif < Co < Pozitif	Sonuç	S/Co	Sonuç
1	0.085 < 0.191	Negatif	0.085/0.191	0.4 TU*/ml (Negatif)
2	1.152 > 0.191	Pozitif	1.152/0.191	6.03 TU/ml (Pozitif)
14	0.171 < 0.191	Negatif	0.171/0.191	0.9 TU/ml (Sınırda)
25	0.593 > 0.191	Pozitif	0.593/0.191	3.1 TU/ml (Pozitif)
27	1.993 > 0.191	Pozitif	1.993/0.191	10.4 TU/ml (Pozitif)

* Test ünitesi. Co: Eşik değer (Cut-off).



57

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
- Standart serumların sayısı ne kadar fazla ise ölçüm aralığı o kadar geniş olur



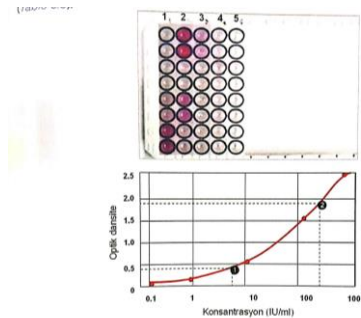
58

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
 - Örn; IU/ml, pg/ml, nmol/ml
- Bu tip sonuçlar antikor konsantrasyonunun ölçülmesinde ve antikor düzeyinin takibinde değer taşımaktadır



59



► **Şekil 6.9** Sonuçlanmış anti-HBs ELISA mikroploağı (üstte) ve standart serumların konsantrasyonlarına karşı OD değerlerini gösteren grafik (altta). Bu testte, her örnek için iki çukur kullanılmıştır. Siyah daireler, 1 (C2, D2 çukurları) ve 2 (E2, F2 çukurları) nolu hastaların değerlerini göstermektedir.



60

► **Tablo 6.3** Kantitatif anti-HBs testinde standart serumların konsantrasyon ve OD değerleri

Standart serum no.	Çukur no.*	Konsantrasyon (IU/ml)	Optik dansite
1	A1, B1	0.1	0.080
2	C1, D1	1	0.150
3	E1, F1	10	0.620
4	G1, H1	100	1.610
5	A2, B2	1000	2.480

* Standart serumların, Şekil 6.9'da gösterilen ELISA mikropiçindeki yerleşimleridir.

- ELISA kompleks bir teknik olmamasına rağmen bu teknikte birçok değişken kontrol edilmelidir. Katı faz, yıkama işlemleri, kullanılan enzim ve substratların seçimi ve etkinliği, reaksiyonların
- sonlandırılma zamanı, kontrol edilmesi gereken değişkenlerdir.



61



62