

Mikro Lab7-SEROLOJİK TESTLER

Arş. Gör. Evrim GENÇ

Mikrobiyoloji-I

Veterinerlik Mikrobiyolojisi AD.



Teşhis yöntemleri

1. Direkt teşhis

- a. Kültür
- b. DNA tespiti
- c. Antijen tespiti (serolojik)

2. İndirekt teşhis

- a. Antikor tespiti (serolojik)

Seroloji nedir? Serolojik testler hangi amaçlarla kullanılır?

- Antijen-antikor reaksiyonlarına ve antikor teşhisine yönelik çalışmaları kapsayan immünoloji dalına **seroloji** denir.
- Serolojik testler çeşitli amaçlarla kullanılır;
 1. Enfeksiyonların teşhisi (direkt-indirekt)
 2. Aşılama öncesi pasif bağışıklık varlığı veya düzeyinin saptanması
 3. Aşılama sonrası bağışıklık düzeyinin ölçülmesi
 4. Humoral immun yetmezliklerin teşhisi
 5. Doku ve vücut sıvılarında antijen veya biyolojik maddelerin tespiti

TANIMLAR

➤ Serum:

Hiçbir madde ilave edilmeden bir süre beklenildiğinde kan pıhtılaşır ve bu pıhtıdan sarı renkli bir sıvı ayrılır.

İçerisinde **fibrinojen bulunmayan** bu sıvıya serum denir.

➤ Plazma:

Bir pıhtılaşma önleyici antikoagülan ile koagülasyonu önlenmiş, içerisinde **fibrinojen bulunan** kanın sıvı kısmıdır.



Konvalesan serum

*Doğal olarak enfekte olan canlılar infeksiyonu geçirdikten sonra vücutlarında antikor yanıtı oluşur.

*Bu canlılara ait kan serumlarında bu infeksiyon etkenine karşı spesifik antikorlar bulunur.

Konvelesan serum bu şekilde oluşan yüksek titreli serumlara denir.

Hiperimmunserum

Deneme hayvanına belirli aralıklarla antijenin verilmesi ile sağlanan seruma denir.

Hiperimmunserumlar;

- Yeni doğanların hemolitik hastalıklarında,
- *C. tetani* ile riskli yaralanmalarda,
- Kuduz şüpheli bir köpek tarafından ısırılma,
- Yılan akrep sokmalarında
- İmmün yetmezlik durumlarında
- Enfeksiyondan korunma amacıyla kullanılır.



Antijen:

Organizmaya girdiğinde,

- kendisine karşı bir bağışık yanıt oluşmasına
- bu yanıt sonucunda oluşan antikor ile birleşebilen maddelere denir.

Bir madde girdiği organizmanın yapısına,

yabancı ise antijenik özellik gösterir.

-Antijenler: Protein veya glikoprotein özellikte

Antikorlar

Antijenlere karşı bağışık yanıt sonucunda oluşan moleküllerdir.

Özellikleri

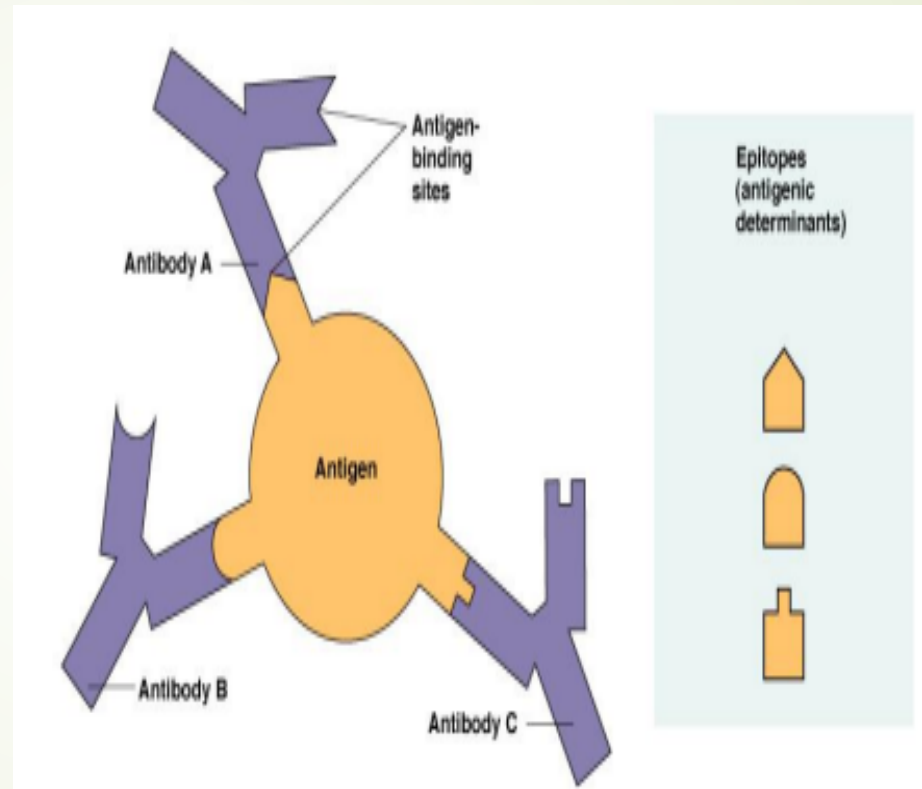
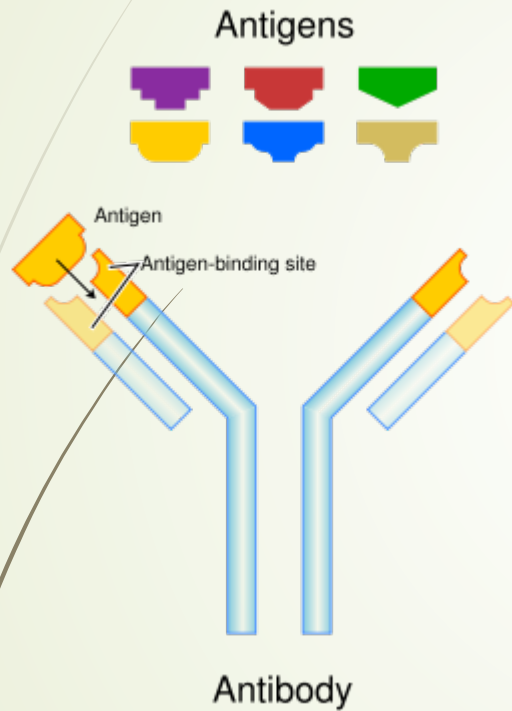
- Antijen ile bağlanabilme özelliğine sahip,
- B lenfosit hücre zarında bulunur
- Plazma hücrelerince salgılanır
- Dolaşımda, dokularda, mukozal bölgelerde bulunan **glikoprotein yapısında** moleküllerdir.

Antijen Antikor Reaksiyonlarının Yapısı

- Antijen ve antikor arasındaki bağlanma
- Epitop-Paratop
- Anahtar-Kilit uyumu

-Antijen epitopu ile özgül antikorum antijen bağlama yeri arasındaki birleşme bir anahtar kilit uyumuna benzetilebilir.

Antijen Antikor Reaksiyonlarının Yapısı





Epitop

- Antijen molekülünün yüzeyinde bulunan,
- kendi özgül antikorları ile birleşmeyi sağlayan,
- böylece antijenin özgüllüğünü belirleyen
- kimyasal uç yapıları belirten
determinant/lardır.

Paratop

- Antikorlarda epitopa karşılık gelen özgül uçlardır.

TANIMLAR

➤ **Affinite**

Antijen ve antikor molekülü arasındaki bağlanma gücünün kalitatif ölçüsü

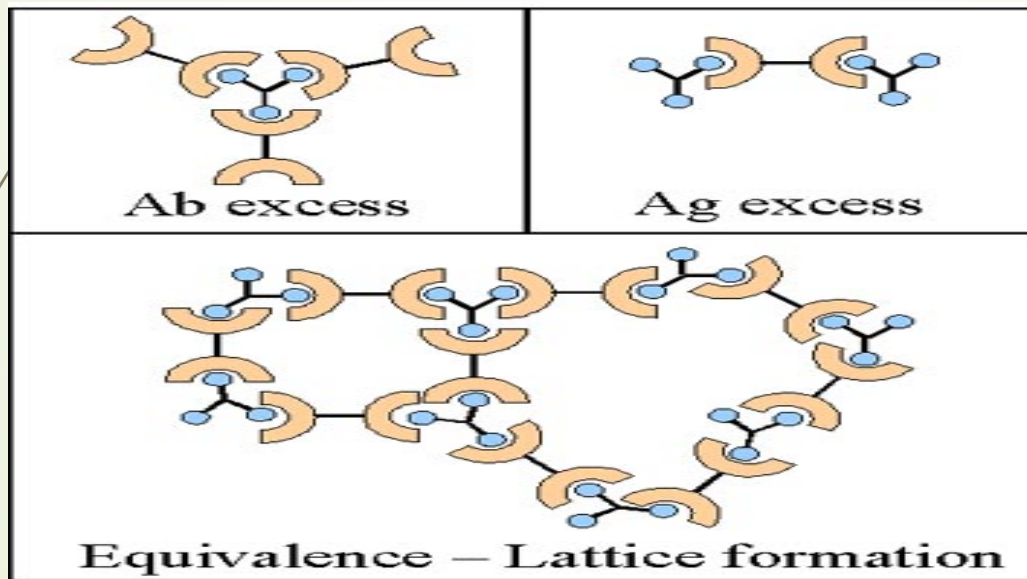
➤ **Avidite**

➤ Bir test ortamındaki antijenik epitoplar ve antikorlardaki paratoplar arasındaki total bağlanma kuvveti

➤ **Serolojik reaksiyonlarda, dikkate alınan ölçüt aviditedir.**

Lattis Oluşumu

- Antijenler ve antikorlar arasında köprüler kurulması ve çok sayıda antijen ile antikorun ağ şeklinde birleşmesiyle **lattis** oluşumu şekillenir.



Serolojik Testlerde Ölçütler nelerdir?

1- Titre

Antijen ile saptanabilir reaksiyon veren (pozitif reaksiyon)

- en düşük antikor veya
- serum dilusyonudur.

Titreyi saptamak için,

- incelenen şüpheli serumun 2 katlı
- 10 katlı sulandırılmaları yapılır.

Daha sonra her bir dilüsyona

- antijen katılır
- pozitif reaksiyon görülen en son dilüsyon belirlenir.

Serolojik Testlerde Ölçütler melerdir?

2. Sensitivite (Testin Duyarlılığı)

Bir serolojik testin;

- aranan antikorların varlığını saptayabilme yeteneğinin ölçüsüdür.

3. Spesifite (Testin Özgüllüğü)

Bir serolojik testin;

-aranan antikorları saptamada ne kadar spesifik olduğunun göstergesidir.

Serolojik Testler nelerdir?

1. In vivo testler

- a. Nötralizasyon testleri
- b. Korunma testleri (etkinlik)

2. In vitro testler

- Primer bağlanma testleri: Enzim, floresan ve radyoaktif madde kullanılarak yapılan testler
Örn: ELISA
- Sekonder bağlanma testleri:
Örn: Aglütinasyon

İn vitro Testler

1- Primer bağlanma testleri:

Antijen ile antikor arasındaki bağlanmayı gösterir.

Antijen veya antikor konsantrasyonundan etkilenmez.

Bu nedenle **daha duyarlıdır.**

Sonuçların değerlendirilebilmesi için teste sokulan antijen veya antikor

- radioizotop,
- floresans boya
- enzim gibi bir araç ile işaretlenir.

BU TESTLER:

Radyoimmunoassay

Enzim immunoassay

immunofloresans testleri olarak üçe ayrılır.



ELISA

(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

Antijen antikor ilişkisinin enzim-substrat sistemleri ile **görünür** hale getirilmesi esasına dayanır.

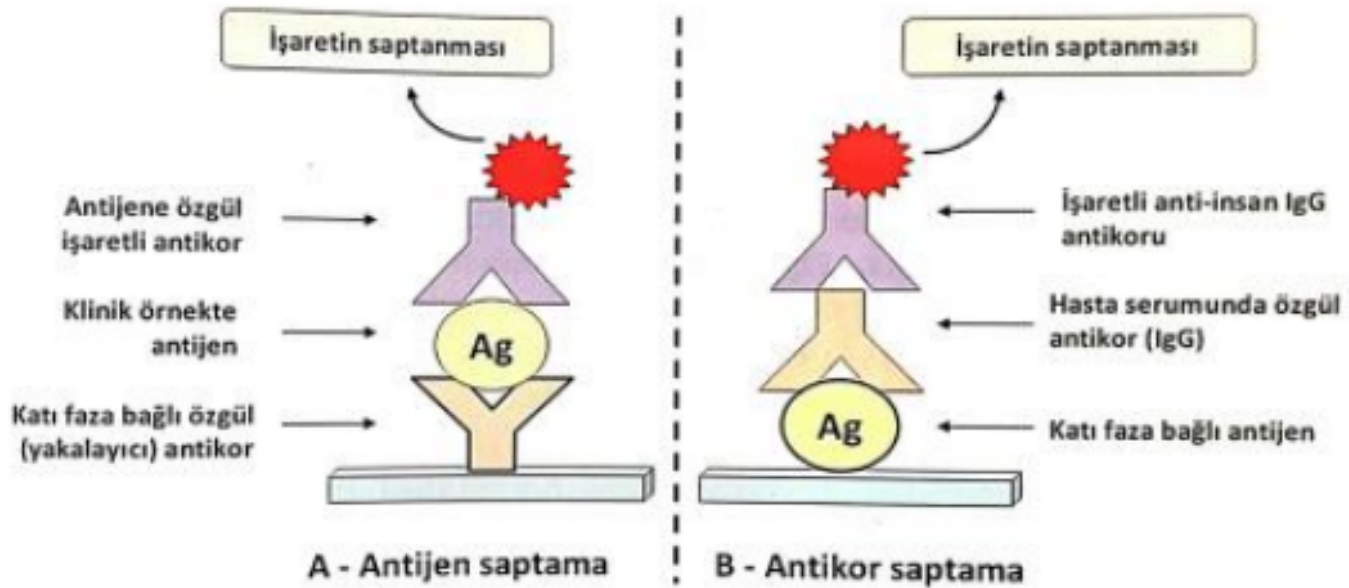
Test katı yüzeyler (mikropleytlar) üzerinde gerçekleştirilir.

Enzim ile işaretli antikorlar (**konjugat**) ve substrat kullanılır

- Şüpheli materyalde bulunan **etken/antijen veya**
- Bunlara karşı oluşmuş **antikor** varlığının araştırılması amacıyla yapılır

ELISA

96 çukurlu mikroyeytler kullanılır.



ELISA



Konjugat: Enzim ile işaretli antikor (alkalen fosfataz (AP), horseradish peroksidaz (HRP))

Substrat: Konjugatın yapısındaki enzim ile reaksiyona giren reaktiftir.

Değerlendirme:

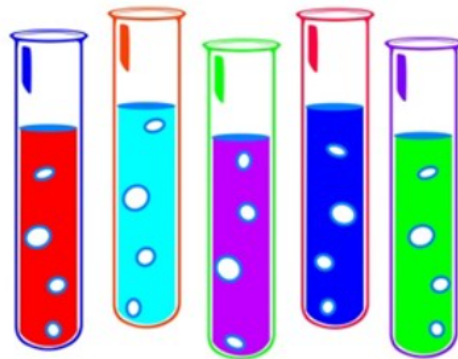
➤ Substrat,

- konjugatın yapısındaki enzim ile reaksiyona girer,
- Parçalanır mavi,yeşil, sarı,vb. renk oluşumuna neden olur.

Reaksiyon sonunda oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülür.

Okumada en sık kullanılan dalga boyu 405, 450 ve 630 nm'dir.

Elde edilen absorbans değeri "optik dansite (OD)" olarak ifade edilir.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.033	0.083	0.773	0.084	0.119	0.089	0.077	0.589	0.391	0.069
B	0.033	0.082	0.763	0.090	0.121	0.092	0.080	0.598	0.397	0.066
C	0.220	0.078	0.102	1.879	0.067	1.523	0.072	1.631	0.078	0.238
D	0.228	0.078	0.097	1.846	0.070	1.556	0.070	1.632	0.077	0.243
E	0.086	1.843	0.092	0.122	0.648	0.064	2.000	0.087	0.719	0.081
F	0.085	1.786	0.082	0.114	0.643	0.064	1.986	0.091	0.669	0.084
G	1.142	0.139	0.110	0.173	0.087	2.201	0.119	0.072	0.045	0.088
H	1.162	0.144	0.122	0.170	0.086	2.152	0.108	0.076	0.046	0.089

İn vitro Testler

2- Sekonder Bağlanma testleri

ilk olarak antijen antikor bağlanması gerçekleşir.

Daha sonra gözle görünebilir kompleksler oluşur. Buna **lattis formasyonu** denir.

- eriyebilir antijenleri çöktürebilir (**presipitasyon**),
- partiküllü antijenleri kümелendirebilir (**aglütinasyon**)
- Aglütinasyon testleri. Örneğin
 - tüp aglütinasyon
 - lam aglütinasyon testleri

Oluşan antijen antikor reaksiyonu (lattis formasyonu) gözle görülebilir

Aglütinasyon Testleri

Tüp Aglütinasyon testi:

önce şüpheli serumun tüplerde dilusyonları yapılır,

-üzerine eşit miktarda bilinen antijen eklenir

-belli süre inkubasyonda bırakılır.

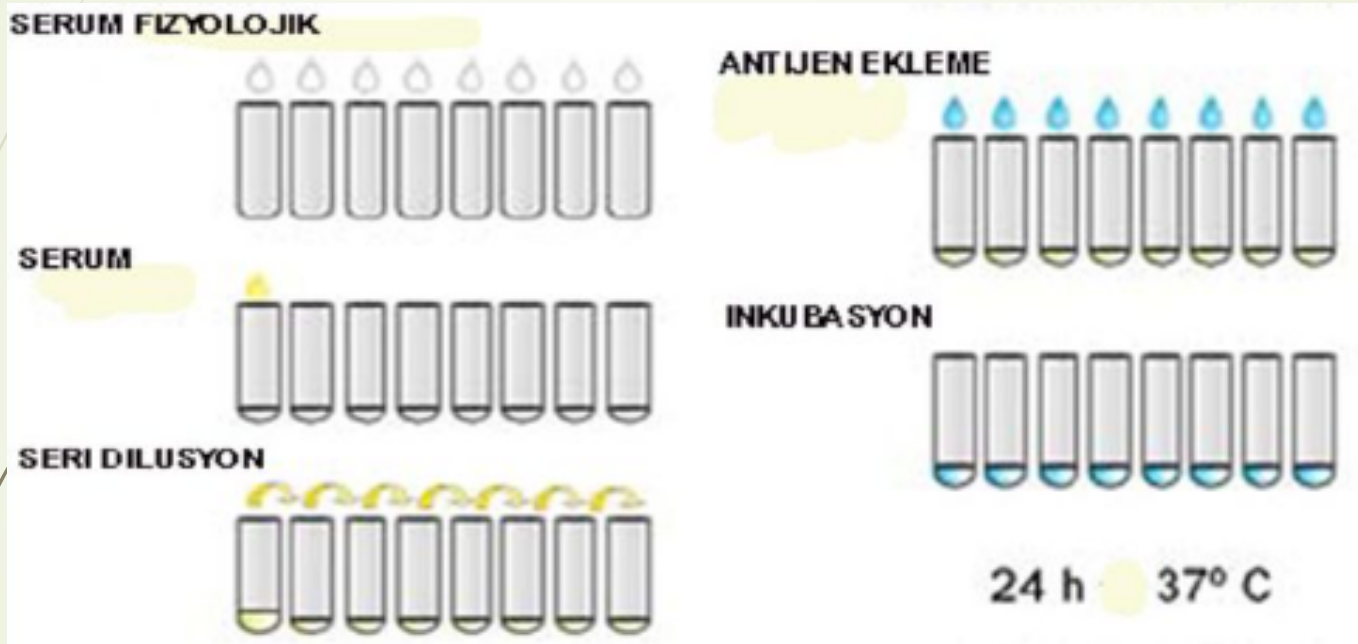
Değerlendirme:

-Eğer serumda kullanılan antijene spesifik antikorlar varsa aglütinasyon reaksiyonu gerçekleşir.

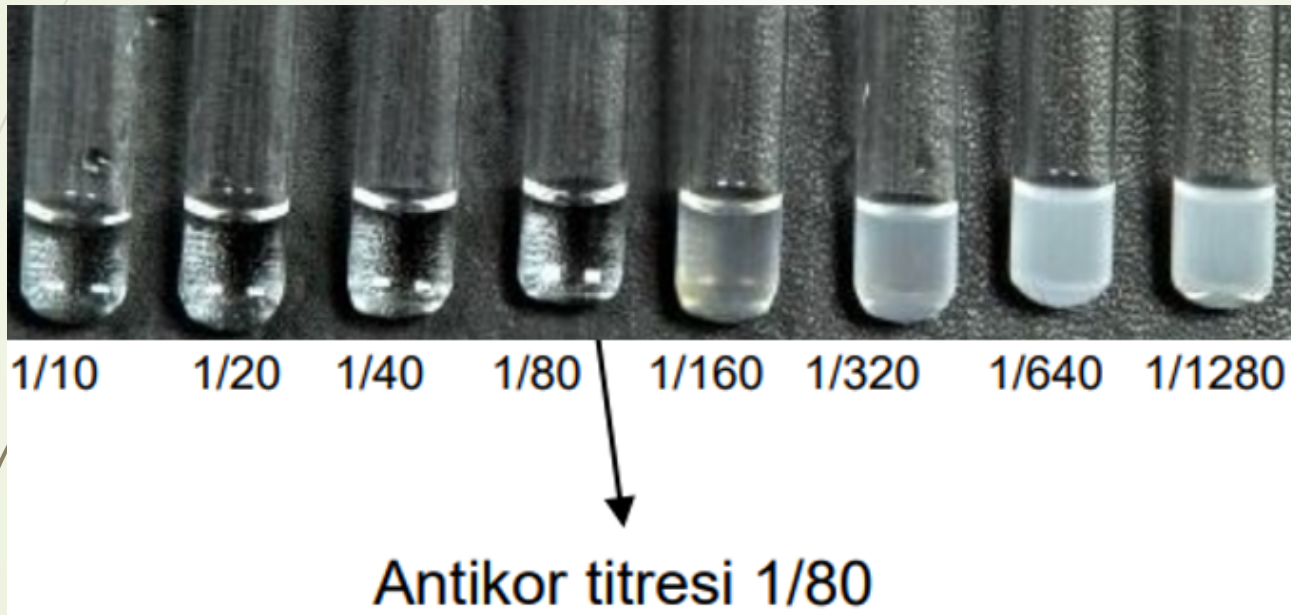
Pozitif tüplerde: şüpheli serumdaki antikor antijen ile birleşerek tüpün dibine çöker (**dantela tarzında** görünüm). **Tüpün üstü berrak.**

Negatif tüplerde: şüpheli serumda antikor olmadığı için aglütinasyon gerçekleşmez. Dolayısıyla **antijen** tüpün dibinde **düğme tarzı**nda çöküntü oluşur. Üst sıvı bulanıktır.

Tüp Aglütinasyon testi:



Tüp Aglütinasyon testi:



-Lam Aglutinasyon Testi

- Eşit miktarlarda şüpheli serum
- bilinen antijen bir lam üzerinde karıştırılır.

Değerlendirme:

-Eğer serumda kullanılan antijene spesifik antikorlar varsa birkaç dakika içinde antijenin kümeleşmesi pozitif sonuç verir.

-Lam Aglutinasyon Testi

