

*Serolojik Tepkimeler-Devam
*Cerahat İnceleme

TOKSİN-ANTİTOKSİN TEPKİMELERİ

Ekzotoksin

- Bakterinin metabolizması esnasında ortama salgıladığı, çok iyi antijen yapısı gösteren ve girdikleri organizmada hastalandırıcı etki yapan, zehirli, hücre dışı metabolitlere **ekzotoksin** denir.

- Sınırlı ısı (40 °C) ve formol ile muamele sonucunda toksin özelliğini kaybeden fakat antijenik özelliği korunan ekzotoksinlerin bu parçasına **toksoid** ya da **anatoksin** adı verilir.

- Ekzotoksin veya toksoid organizmaya girdiğinde oluşan özgül antikorlara **antitoksin**, bunları içeren bağışık serumlara da **antitoksik serum** denir.

- İn vivo deneylerde duyarlı deney hayvanlarına tek başına toksin verildiğinde, hayvanın belirli patolojik bulgularla öldüğü görülmüştür. Ancak **toksin + antitoksin** karıştırılıp bir süre bekletildikten sonra hayvana verildiğinde hiçbir patolojik bulgunun oluşmadığı görülmüştür. Bu nedenle, sağaltım amacıyla antitoksinlerden yararlanır.

Danyz Olayı

- Hayvan deneyi ile birbirini tam olarak nötralize eden toksin ile antitoksin miktarları saptandıktan sonra tek seferde karıştırılıp bir süre bekletilerek duyarlı bir hayvana enjekte edilirse hiçbir patolojik bulgu ortaya çıkmaz.
- Aynı miktar antitoksin üzerine bu kez aynı miktar toksinin önce bir kısmı, bir süre sonra arta kalanı eklenecek olursa toksinin tam olarak nötralize olmadığı ve bu durumda enjekte edildiği hayvanda toksik etkilere bağlı bulguların ortaya çıktığı saptanır.

- Bu olayda, parçalı şekilde ilave edilen toksinin ilk kısmı ortamdaki antitoksinin nispeten fazla kısmı ile birleşir. Daha sonra ilave edilen toksin ise ortamda birleşebilecek antitoksin bulamayacağından bir miktar serbest halde kalacak ve etkisini gösterecektir. Bu olay antijen - antikor kompleksinin oluşumunun yavaş olduğunu gösteren bir deneydir.

- Toksin-antitoksin birleşmesi antijen-antikor birleşmesi esaslarına benzer. Ancak ekzotoksinler değişken özellik gösterdiklerinden zamanla toksik etkileri azalır, antijen özellikleri değişmez.
- Bu yüzden liyofilize toz formunda saklanmaları ve her deneyden önce test toksininin titre edilmesi gerekir.
- Bunun için standart test toksininin bulunması gerekir.

- Örn: Difteri için Kopenhag Serum Enstitüsünde bulundurulan Standart Kuru Antitoksin kullanılır. Bunun 0,0628 mg' ında bulunan antitoksin miktarına **1 Uluslararası Antitoksin Birimi (İ.Ü)** adı verilir.
- Bu standart kuru antitoksinden başlayarak önce test toksini titre edilir. Sonra bu toksin kullanılarak istenilen bir serumdaki antitoksin miktarı belirlenir.

Lt (Ölüm Dozu)

- Difteri toksini için in vivo çalışmalarda ölçme birimi **Lt (Ölüm dozu)** kullanılır.
- **Lt**
- Bir uluslararası antitoksin birimi (IU) ile karıştırılıp bir süre bekletildikten sonra 250 gr'lık kobayın derisi altına verildiğinde 4 günde belirgin bulgularla ölüme yol açan toksin miktarına **Lt (ölüm dozu)** denir. Buna aynı zamanda **TEST TOKSİNİ**'de denir.
- Standart Kuru Antitoksine göre test toksini titre edilir ve istenen serumdaki antitoksin miktarı belirlenir.

Lf (Flokölasyon Dozu)

- Bir uluslararası antitoksin (IU) ile karıştırıldığında en çabuk ve belirgin flokölasyon (**presipitasyon**) veren toksin miktarıdır.
- Deney tüpler içerisinde yapılır ve elde hangi bilinen varsa onunla diğer bilinmeyen titre edilir. Örneğin elde standardize edilmiş bir toksin varsa bundan dizideki tüplere 1 Lf miktarında konur. Her tüpe titre edilecek antiserumdan değişen miktarlarda eklenir. 45 °C'de bekletildiğinde en erken ve belirgin bulanma ve çökelti oluşan tüpteki serum miktarında **1 uluslar arası antitoksin birim** var demektir.

MLD (Minimal Letal Doz)

- 250 gr'lık kobayın derisi altına verildiğinde 4 günde belirgin bulgularla ölüme yol açan en düşük toksin miktarına denir.

Lo (Sıfır Sınırı Dozu)

- Bir uluslararası antitoksin (IU) ile karıştırılarak kobay derisi altına verildiğinde hiçbir etki göstermeyen en fazla toksin miktarına denir.

Lr (Reaksiyon Sınır Dozu)

- Bir uluslararası antitoksin (IU) ile karıştırılarak kobay derisi altına verildiğinde kızarıklık, ödem, sertlik ve nekrozdan ibaret en az tepkimeye yol açan toksin miktarıdır.

Antitoksik Serumların Elde Edilmesi ve Kullanım Alanları

- **Neden önemli !!!**
- Difteri, Tetanus, Botilismus vb. gibi primer toksik (doğrudan ekzotoksinlerin etkisi ile ortaya çıkan) hastalıkların sağaltımı ve korunmasında antitoksik serumlar başarı ile kullanılır.
- Bu serumlar hayvanların bağışıklanması ile elde edilirler.
- En uygun hayvan çabuk, bol, yüksek düzeyde serum eldesi yönünden attır. Ayrıca sığır, keçi, koyun ve tavşanlarda kullanılabilir.

- Sağlıklı hayvanlar gittikçe artan dozlarda (gün aşırı) toksoid enjekte edilerek bağışıklanır. Zaman zaman antitoksin titresi ölçölüp, titrenin en yüksek düzeyde bulunduğu zamanda hayvandan bol miktarda kan ya da kanın tamamı alınıp, serum ayrılır. Koruyucu maddeler eklenir. Bir süre karanlık ve soğukta saklanıp antitoksin titresi sabitleşince şişelenip kullanılır.
- Bugün çeşitli yöntemlerle serumlar arındırılarak (saflaştırılarak) saf immun gamaglobulinleri içeren preparatlar elde edilmekte, daha etkin ve daha az yan etkili olarak kullanıma sunulmaktadır.

Nötralizasyon Deneyleri

- Genellikle viral ve daha az ölçüde bazı bakteriyel antijenlerin ve antikörlerin saptanması amacıyla kullanılan deneylerdir.
- Deney 2 amaca yönelik olarak kullanılabilir:
 1. Elde bilinen canlı virüse karşı antikor araştırıp hastalık tanısı koymak,
 2. Elde bilinen bağışık serumlarla bilinmeyen virüsleri karşılaştırarak virüsleri tanımak,

Deneyin Esası

- Virüs inokülasyon ortamları;
 - Deney hayvanları
 - Döletli yumurta
 - Doku kültürü
- Bu canlı sistemlerdeki virüsler kendilerine karşı elde edilmiş bağışık serumlar ile karıştırılıp, bir süre bekletildikten sonra bu canlı sistemlere verilirse nötralize olacaklarından patolojik olaylar ortaya çıkmaz.

- Deneysel niceliksel yapılır bunun için önce antijen olarak kullanılan canlı virüsün etkinliğinin titre edilmesi gerekir. O virüsa karşı duyarlı olan deney hayvanlarına (gruplar halinde) virüsün değişik sulandırımıları enjekte edilir.
- Daha sonra ölen ve hastalanan hayvan sayısına göre;

➤ **LD50:** Hayvanların % 50 ' sini öldüren doz (letal doz)

➤ **PD50:** Hayvanların % 50 ' sini felç eden doz (paralitik doz)

➤ **ID50:** Hayvanların % 50 ' sini infekte eden doz (infektif doz) saptanır.

- Bu dozlar ölçü olarak kullanılarak;
 - Bir grup hayvana normal serum + virüs
 - Bir gruba da hasta serumu + virüs enjeksiyonları yapılır
- Sonuçlar karşılaştırılarak hasta serumundaki antikor titresi saptanır. Bu antikor düzeyinin yeterli düzeyde olması ve biri hastalığın başlangıcında, diğeri iyileşmeye yakın alınan iki serum örneğinde bu titrenin 4 kat artması hastalık tanısı için anlamlıdır.

X4

Fluoresanlı Antikor Deneyi (İmmunofluoresans)

- Fluoresan içeren boylarla işaretlenmiş antikorlar; lamalar üzerindeki antijenleri ile birleştikten sonra, UV ışınlarıyla ışınlandırılan fluoresans mikroskop altında incelendiklerinde fluoresans verir ve görünür hale gelirler.
- Bu amaçla en çok floresein izotiosiyanat (FITC) kullanılır.
- A grup hemolitik streptokoklar, Treponema pallidum, menengokoklar, barsak patojenleri ve diğer bazı patojen bakteriler ve birçok virüslerin antijenlerinin ya da antikorlarının araştırılmasında fluoresans antikor deneyleri kullanılmaktadır.

2 temel yöntem kullanılabilir:

Direkt Fluoresans Antikor Testi

- Doku kesitlerinde viral **antijenin saptanması** (ör. Enfekte beyin dokusunda kuduz virüsüne ait antijenlerin gösterilmesi) gibi değişik amaçlar için kullanılmaktadır.
- Doku kesiti veya sürüntü (smear) örneği üzerine eklenen işaretli antikor bir süre bekletildikten sonra yıkanır. Uv ışıklı mikroskop altında incelendiğinde bağlanma olan bölgelerde yeşil renkli ışımaya görülür.

İndirekt Floresans Antikor Testi

- Daha çok insan serumlarında belirli antijenlere karşı **antikor bulunup bulunmadığının** aranmasında kullanılır. Ör. Sifilizin serolojik tanısında.
- Antijene özgül **birincil antikor** ve birincil antikora bağlanabilen FITC ile işaretli **ikincil antikor** (FITC ile işaretli antiglobulin-fluoresanlanmış insan globulini antiserumu) kullanılmaktadır.

İndirekt Floresans Antikor Testi

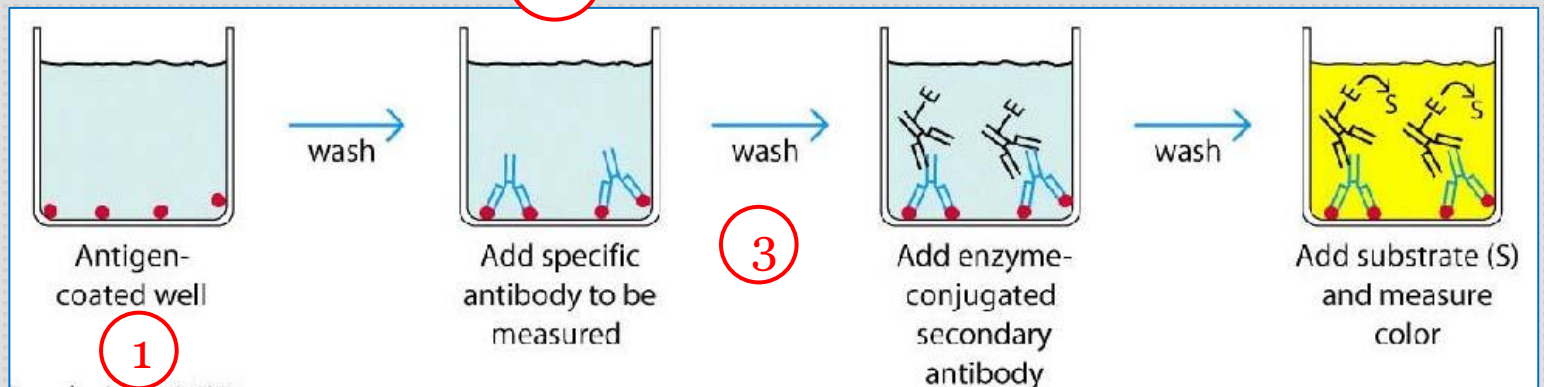
- Doku örneğinde uygun antijen var ise eklenen birincil antikor yıkamakla uzaklaştırılmaz.
- Doku örneğinde özgül antijen aracılığı ile bağlanmış 1. antikor, işaretli 2. antikor ile saptanır. Bağlanmanın olduğu yerler yıkama sonrasında floresans mikroskopta **yeşil** renkli ışımaya alanları olarak gözlenir.

ELİSA (Enzimli İmmun Deney)

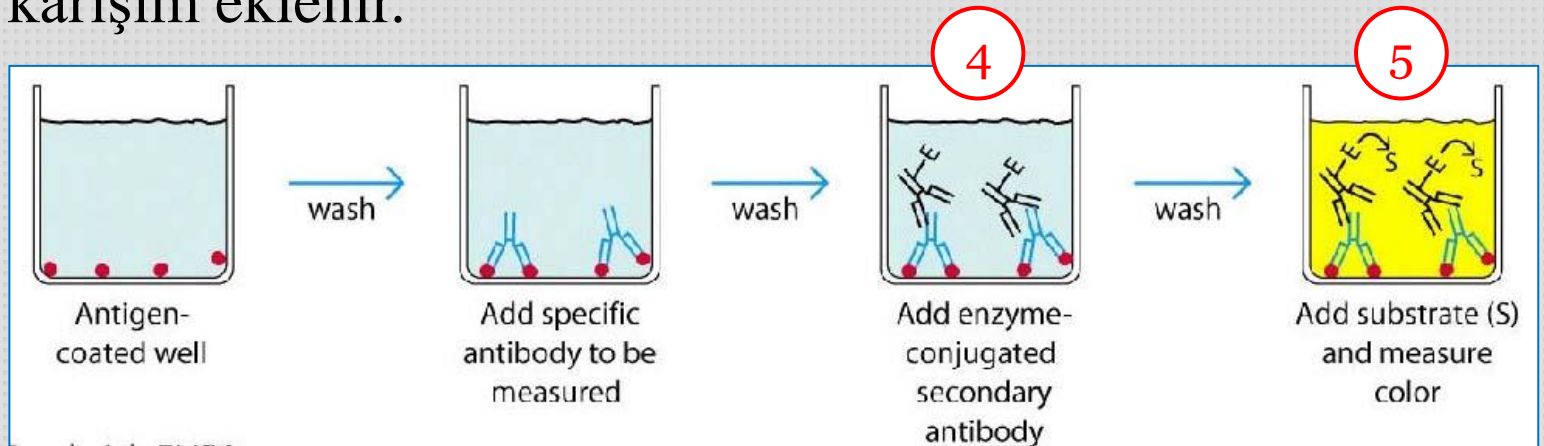
- Özgül antijen-antikor bağlanmasını göstermek amacıyla; enzimle işaretli konjugat ve enzimin substratı kullanılarak renklendirilmesi esasına dayanır. (Ör. Hepatit, AIDS)
- Bilinen bir antijen/antikor var ise bununla örnekteki antikor/antijenin varlığını, tipini ve miktarını saptayabiliriz.

Antikor aramak isteniyorsa (İndirekt ELİSA)

1. Katı faz olarak 96 çukurlu, düz tabanlı polistren plaklar kullanılabilir. Katı faza bilinen antijen bağlanır.
 2. Antijen bağlı çukurlara serum örnekleri eklenerek oda ısısında veya 37 °C'de belirli bir süre bekletilir.
 3. İnkübasyon sonunda çukurlara eklenmiş serum örnekleri dökülerek çukurlar tamponlanmış sıvı ile yıkanır.
- (Çukura eklenen serum içerisinde özgül antikor var ise katı fazdaki antijene bağlandığı için yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırılmaz.)



4. Katı fazdaki antijene bağlanmış Ig yapısındaki antikoru saptamak için çukurlara Fc kısmı enzim ile işaretli anti-Ig antikoru eklenir. Konjugat yapısına eklenen enzim genellikle **peroksidazdır**. Ayrıca **alkalen fosfataz, glukoz oksidaz, beta D-galaktozidaz** gibi başka enzimlerde işaretleme için kullanılır. İnkübasyon sonunda çukurlara eklenen konjugat dökülür ve tamponlanmış su ile birkaç kez ikinci yıkama işlemi yapılır.
5. Ortamda bağlı kalan konjugatın gösterilmesi amacıyla çukurlara konjugattaki enzime uygun substrat ve reaksiyonun görünür hale gelmesi için kromojen içeren karışım eklenir.



ELİSA ile antikor aranması

1. Antijen kaplı çukurlar
2. Aranan antikor
3. Antikor varsa antijene yapışır
4. Enzim işaretli (insan) antiglobulin
5. O da komplekse yapışır
6. Enzime uygun kromojen substrat
7. Oluşan renk kolorimetrik olarak ölçülür.



Antijen aramak için işlemde prensip aynı ancak yukarıdakinin tersidir.

- ELİSA yöntemleri; Kompetitif ve nonkompetitif ELİSA, indirekt ELİSA, sandwich ELİSA, makro ve mikro-ELİSA, avidin-biyotin ekli ELİSA yöntemi

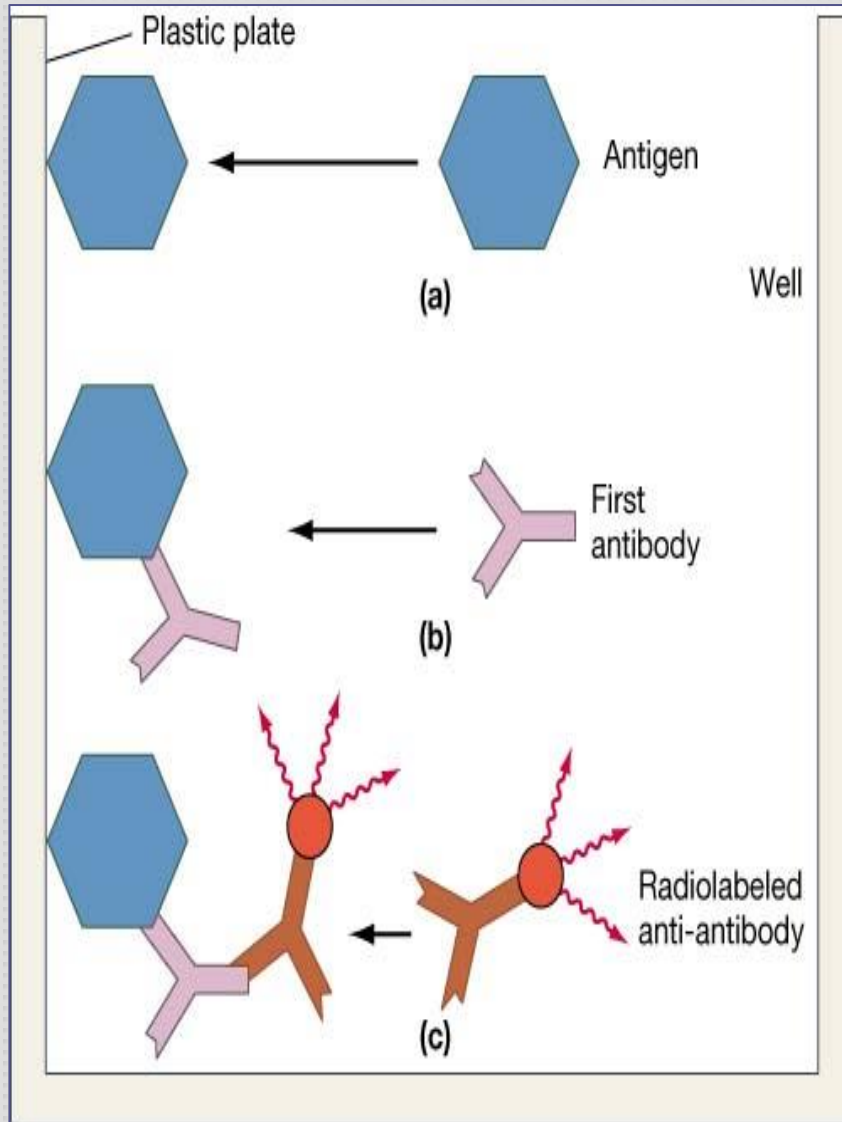
RIA (Radyoaktifli İmmun Dene)

- Radioimmunoassay yöntemi özellikle düşük miktarlardaki antijen tayininde spesifitesi çok yüksek bir testtir.
- **Esası**; Radioizotop bir madde ile işaretli antijen veya antikor aracılığı ile özgül olan antikor veya antijenin varlığını ve miktarını saptamaktır.
- RIA tekniklerinde genellikle tritium, carbon 14, iyot 125 gibi radyoizotoplar kullanılır.
- Daha çok vücut sıvılarında hormonların, enzimlerin, ilaçların ve diğer biyolojik moleküllerin aranması amacıyla kullanılır.

- **Sandwich yönteminde** antijene özgül ve işaretsiz **antikor katı faza** (tüp) bağlanmıştır. Tüp içerisine eklenen antijen örneği belli bir süre bekletilir. Örnekte aranan **antijen** var ise katı fazdaki antikora bağlanacaktır.
- Yıkama işlemi sonrası tüpe aynı antijene özgül ve **radioizotop ile işaretli antikor** eklenerek bekletilir. İşaretli antikor katı fazdaki antikör aracılığı ile tutulmuş antijene bağlanacaktır ve yıkama işlemi ile uzaklaştırılamayacaktır.
- İşlem sonrası gama sayacında (dedektör) tüpün verdiği değer serum örneğindeki antijen miktarı ile ilişkilidir.

- **Kompetisyon mekanizmasında** ise varlığı araştırılan antijene özgül antikor katı faza (tüp) bağlanır. Tüp içerisine antijen örneği ve radioizotop ile işaretli antijen eklenir.
- Örnek içerisinde aranan antijen yok ise katı fazdaki antikora tamamen bizim eklediğimiz işaretli antijen bağlanacaktır ve test sonrası gama sayacında yüksek düzeyde okuma elde edilecektir.

- Örnek içerisinde aranan antijen var ise miktarı ile orantılı olarak işaretli antijen yerine katı fazdaki antikora serumdaki işaretsiz antijen bağlanacaktır. İşlem sonrası gama sayacından bir önceki duruma göre çok daha düşük düzeylerde okuma elde edilir.
- Miktarı bilinen antijenler ile elde edilen standart inhibisyon eğrisi kullanılarak içeriği bilinmeyen örneklerde antijenin varlığı ve miktarı saptanabilir.



- Antikor aramak için elde uygun antijen ile kaplı plastik tüp ya da tablalar kullanılarak proses izlenir.

Opsono Sitofajik Test (Opsonik indeks)

- Hücre zarındaki çok sayıda reseptörün sıra ile hedef parçacığın yüzeyine yapışarak onu çevrelemeleri, hücrenin içine çekmeleri ve adeta bir fermuar gibi kapatılarak hücre içerisinde oluşan bir boşluğa alınmasına **Fagositoz** denir.
- Fagositoz yapan hücrelere **fagosit** denir.

- Denejde normal kimselerden alınan sitratlı kan, santrifüje edilerek ayrılan lökositler fagosit olarak kullanılır.

✓ 1 damla lökositli süspansiyon+ 1 damla bakteri süsp. + 1 damla fizyolojik tuzlu su

✓ 1 damla lökositli süspansiyon+ 1 damla bakteri süsp. + 1 damla normal serum

✓ 1 damla lökositli süspansiyon+ 1 damla bakteri süsp. + 1 damla bağışık serum

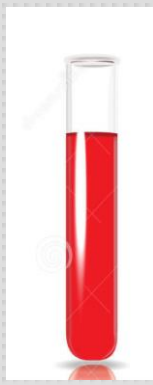
➤ 37°C'de bir süre bekletildikten sonra preparat yapılarak boyanır.

Lökositlerin içerisinde tek tük bakteri

Lökositler içerisinde birkaç bakteri

Lökositler içinde **bol sayıda ve kümeler halinde bakteri fagosite edilir.**

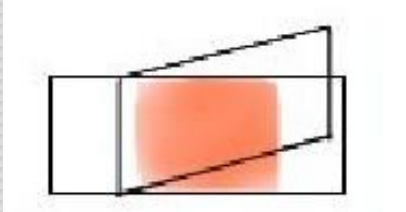
- Fagositozu arttıran etkenin bağışık serumda bulunan antikorlar olduğu saptanmıştır.
- Fagositozu arttıran antikorlara **opsonin** denir. Bağışık serumlardaki opsoninler için **immun opsonin (bakteriotropin)** tanımını kullanılır.
- Opsoninlerin, fagositte edilecek parçacıkları çevreleyerek fagositoza hazırlamaları olayına **opsonizasyon** (yemeğe hazırlama) denir.
- Bağışık serumlarda bulunan opsoninlerin niceliksel olarak ortaya konmasında kullanılan deneye **Opsonik İndeks** adı verilir. Bu amaçla;



Normal serum+
Normal lökosit+
Etken Bakteri



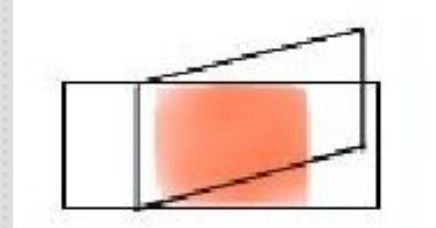
37°C'de 20 dk bekletilir ve temiz
lamlara yayılarak kurutulup kan
boyası ile boyanır.



Bağışık serum+
Normal lökosit+
Etken Bakteri



37°C'de 20 dk bekletilir ve temiz
lamlara yayılarak kurutulup bir kan
boyası ile boyanır.



*Her preparatta 50 – 100 lökosit ve içlerindeki bakteriler sayılır. Bakteri sayısı lökosit sayısına bölünür. Fagositoz endeksi bulunur.

- Her preparatta ayrı ayrı sayılan bakterilerin toplamı ve sayılan lökositlerin toplamı hesaplanır.
- **Fagositoz endeksi** = Bakteri sayısı / Lökosit sayısı
(Bağışık serum ve normal serum için ayrı ayrı hesaplanır.)
- **Opsonik Endeks** = Bağışık serum fagositoz endeksi / Normal serum fagositoz endeksi
- Opsonik indeksin büyüklüğü, bağışık serumun antikor titresini ile doğru orantılıdır.

- Bağışık serumda fagositozun hız ve niceliğini artıran;
 - ✓ bakteri vb. parçacıkların antijenlerine karşı oluşmuş Ig G türü antikorlar ve
 - ✓ komplemanın C₃ parçalarıdır.

CERAHAT- WRIGHT BOYAMA

- Preparat ilk olarak 2-3 dak. **alkol tankında tespit** edilir. Havada kurutulur.
- Üzerine 8 damla Wright boyası dökülür. 3-5 dk. beklenir.
- Sonra bunun üzerine 8 damla tampon çözeltisi dökülür ve 10 dakikaya tamamlanır.
- Su ile yıkanır, kurutulur ve immersiyon objektifi ile incelenir.

CERAHAT- GRAM BOYA

- Preparat ilk olarak 2-3 dk. metanol tankında tespit edilir ve sonra gram boyama yapılır.

Lökositler çekirdeklerindeki granüllere göre;

Granülositler (Parçalı çekirdekli lökositler)

- Nötrofil % 40 - 75
- Eozinofil % 5
- Bazofil % 0.5

Granülsüz lökositler (Tek çekirdekli lökositler)

- Lenfosit % 20 - 50
- Monosit % 1 - 5