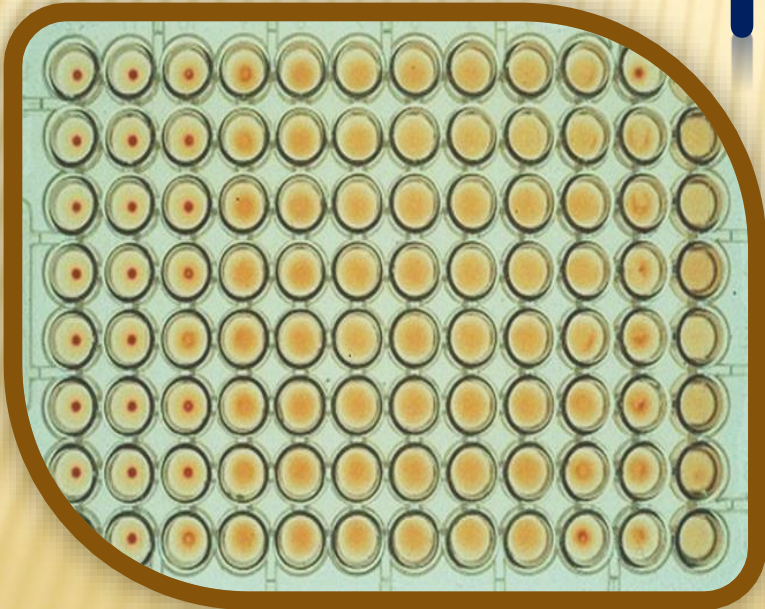


http://www.virapur.com/assay_services/assay_services.php

HEMAGLÜTİNASYON TESTİ



Dersten Sorumlu Öğretim Üyeleri

- Prof. Dr. Yılmaz AKÇA
- Prof. Dr. Feray ALKAN
- Prof. Dr. Seval Bilge DAĞALP
- Prof. Dr. Aykut ÖZKUL
- Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU
- Prof. Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU

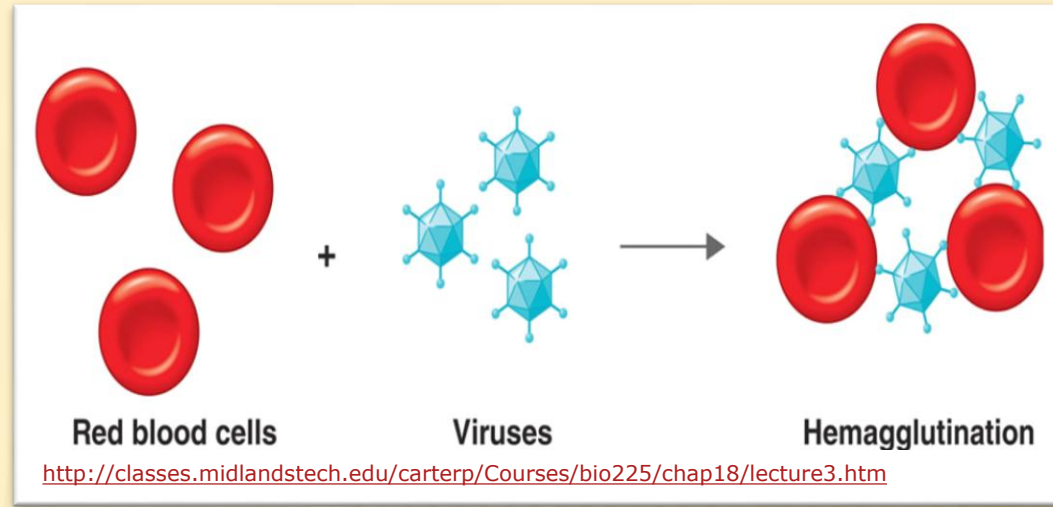
Dersi Veren Öğretim Elemanları

- Arş. Gör. Dr. A. Zeynep AKKUTAY YOLDAR
- Arş. Gör. Dr. İlke KARAYEL HACIOĞLU
- Arş. Gör. Nüvit COŞKUN
- Arş. Gör. Fırat DOĞAN
- Arş. Gör. B. Taylan KOÇ*

http://www.virapur.com/assay_services/assay_services.php

TANIM

Hem-aglutinasyon:



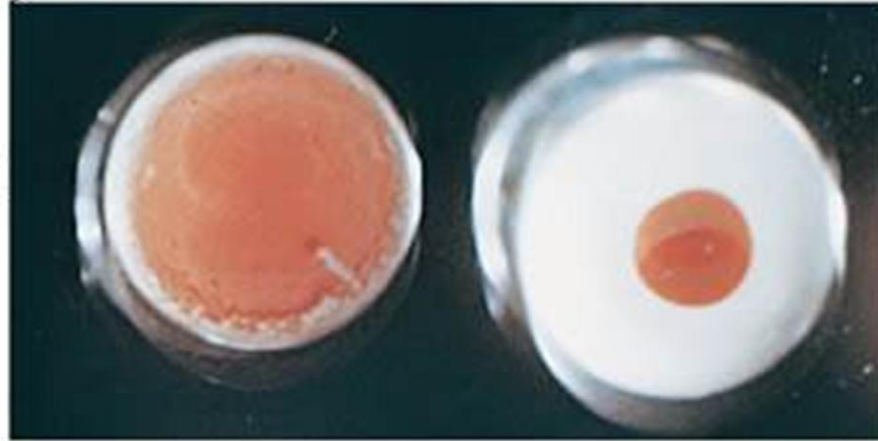
Bazı virusların süspansiyon halindeki eritrositleri birbirlerine yapıştırarak LATTİS (Dantela) şeklinde çöktürmesi olayıdır.

Bu olayın temel prensibi, bazı virusların sahip oldukları protein yapısındaki antijenlerin (**Hemaglutinin**) eritrositlere yapışma ve onları çöktürme özelliğidir.

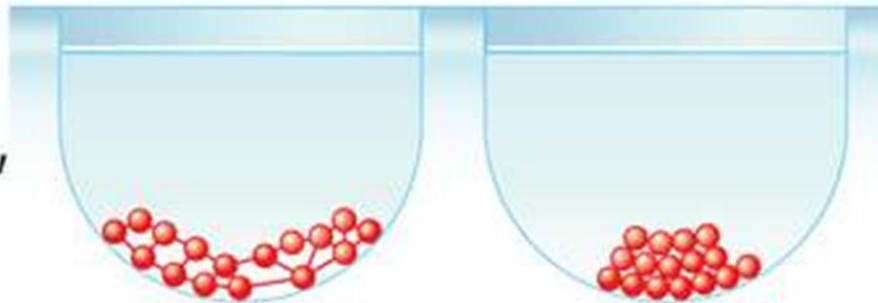


(a)

Enlarged photo of wells



Side view of wells



(b) Agglutinated (c) Nonagglutinated

- Bu özelliği çoğunlukla Zarflı Viruslar
 - Poxviruslar
 - Orthomyxoviruslar (Avian Influenza)
 - Paramyxoviruslar (Newcastle Disease) *etc...*
- Bazı Zarfsız Viruslar
 - Parvovirus
 - Adenovirus
 - Reovirus *etc...*

Duyarlı eritrositler ile yapılan TİTRASYON



HEMAGLÜTİNASYON

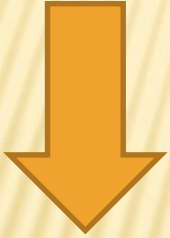
Duyarlı eritrositler ile yapılan NÖTRALİZASYON



HEMAGLÜTİNASYON İNHİBİSYON

1. Tip HA (Paramyxovirus)

Hemagglutinin +
Neuroaminidase
(Bağlanma sonrası
Eritrosit
Reseptörlerini
parçalamada rol
oynar.)



ELÜSYON



Yeni Eritrositlere AYNI
reseptörle bağlanabilme.

2. Tip HA (Poxvirus)

Hemaglütinin
virionun küçük
bir parçasıdır ve
reaksiyon
sonrası
ayrılabilir.

Dolayısıyla virus
partikülü bir
daha
hemaglütinasyon
meydana
getiremez

3. Tip HA (Influenza virus)

Oluşan
hemaglütinasyon
geri dönüşümsüzdür.

HA- ERİTROSİT İLİŞKİSİ

Virusun hemaglütinasyon yeteneği GENELDE eritrositlerin elde edildiği tür ile sınırlıdır.

Adenovirus → İnsan 0 Grubu ve Rat Eritrositi

RPV → Maymun Eritrositi

Newcastle Virus → Tavuk Eritrositi

Köpek Parvovirus → Domuz Eritrositi

Sığır Vebası Virusu → Maymun Eritrositi

Reovirus → İnsan 0 Grubu

ERİTROSİT SÜSPANSİYONUNUN HAZIRLANMASI

Antikoagulanlı tüpe alınan kan 2000 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edilir.

Santrifüj sonrasında plazma ve lökosit tabakası atılır ve tüpün dibinde kalan eritrositler % 0.85'lik FTS, PBS yada alsever solusyonu ile 3 kez yıkanır.

Son yıkamadan sonra tüpün dibindeki eritrositler %100 kabul edilerek, amaca göre %0.5-1 olarak sulandırılır.

Eritrosit süspansiyonu +4°C'de 1 aya kadar saklanabilir.



HEMAGLUTINASYON AMACA GÖRE 2 ŞEKİLDE YAPILIR.

Çabuk HA

- ❖ Kalitatif değerlendirme yapılabilir.
- ❖ Virusun HA yeteneğinin olup olmadığını ve hangi türlere ait eritrositleri HA ettiği anlaşılabilir.
- ❖ Virusun HA titresini belirlemek mümkün değildir.

Yavaş HA

- Kantitatif değerlendirme için uygundur. Virusun titresini belirlemek mümkündür.

Çabuk HA testinin uygulanması

Çabuk Hemaglutinasyon Testi



Lam üzerine birer damla Antijen ve Eritrosit konularak, baget yardımıyla karıştırılır.



Negatif



Pozitif

Değerlendirme

Eritrositte kümeleşme

(+)

(-)

HA

(+)

(-)



ÇABUK HEMAGLÜTİNASYON

YAVAŞ HA TESTİNİN UYGULANIŞI

Prensibi

Log 2 tabanına göre hazırlanan virus sulandırmalarının, uygun eritrosit süspansiyonu ile eşit hacimde tüp yada HA tabletinde birleştirilmesi ve uygun inkubasyon süresinden sonra HA oluşup oluşmadığının ya da hangi sulandırma basamağına kadar HA oluştuğunun belirlenmesidir.

YAVAŞ HA TÜP YADA HA TABLETİNDE

- ✘ Virus log 2 tabanına göre sulandırılır. Tüplerde yada tablet gözlerinde virus sulandırmaları ile eritrosit eşit hacimde birleştirilir.
- ✘ Uygun ısıda inkubasyona bırakılır (oda ısısı, 4°C, 37°C)
- ✘ Sonuç tüplerin yada tablet gözlerinin dibindeki görüntüye göre değerlendirilir.



YAVAŞ HEMAGLÜTİNASYON

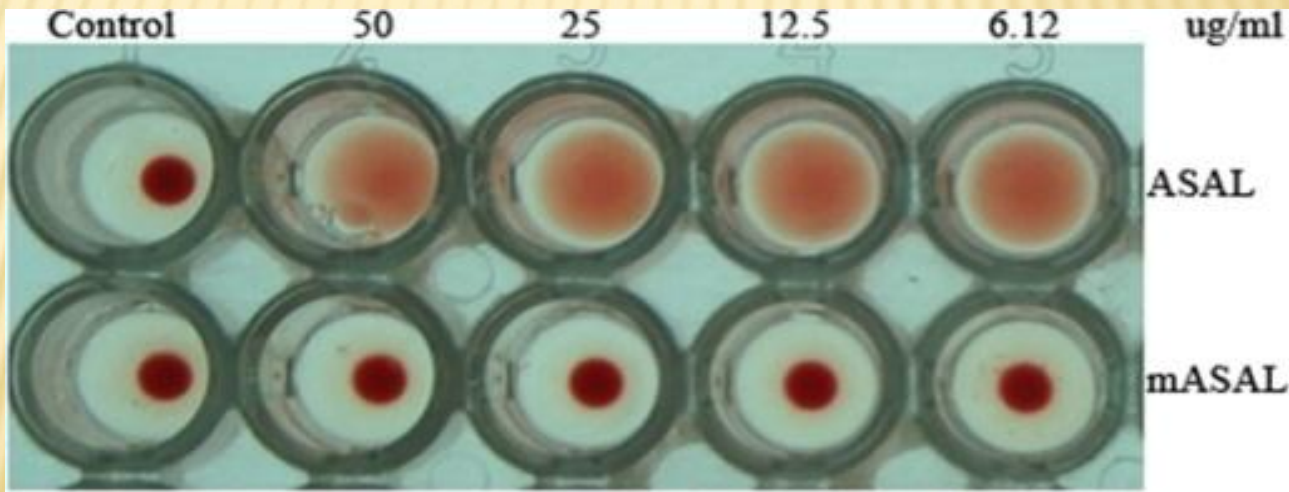
HA TESTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

DANTELA tarzı görüntü

HA (+)

DÜĞME tarzı görüntü

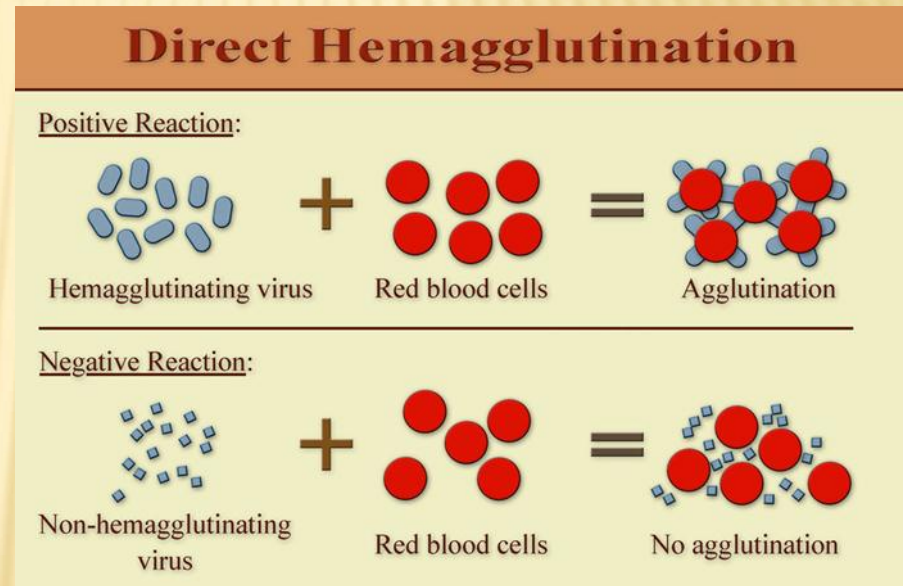
HA (-)



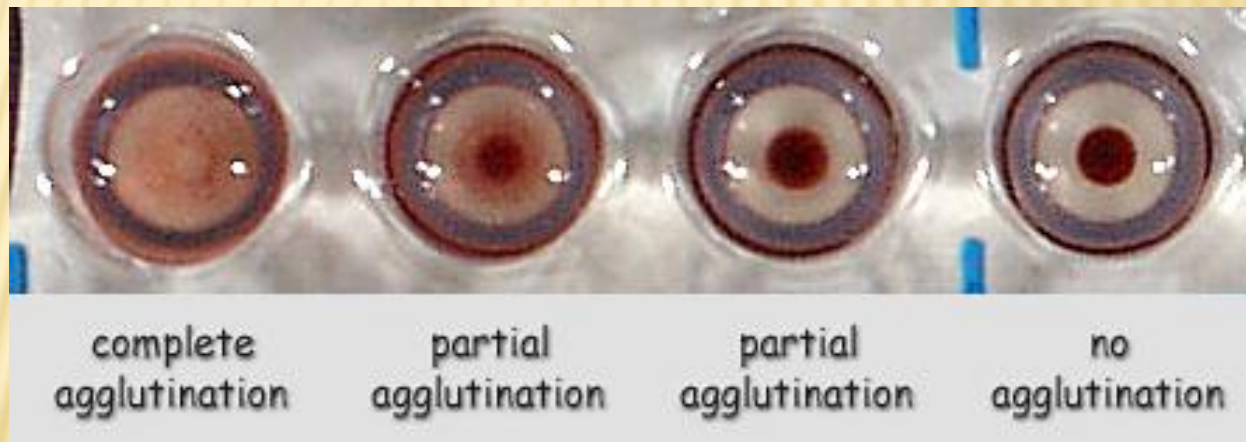
HA TITRESİNİN (HB)BELİRLENMESİ

HB: Aynı hacimde eritrositi aglutine eden en son sulandırma basamağı

<u>Sulandırma</u>	<u>HA</u>
1/2	+
1/4	+
1/8	+
1/16	-
HB: 1/8	



HEMAGGLUTININASYON TESTİNDE TITRASYON



HA TESTİNİN KULLANIM ALANLARI

1. Virus varlığının saptanması
2. İzole edilen bir virusun identifikasyonu
3. HI testi için kullanılacak virusun standardizasyonu

HA:

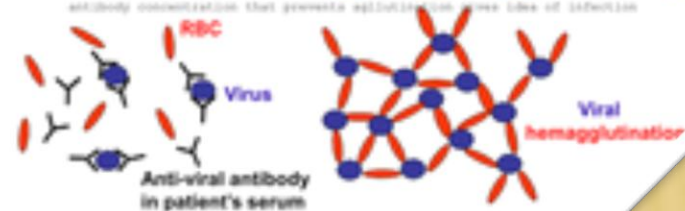
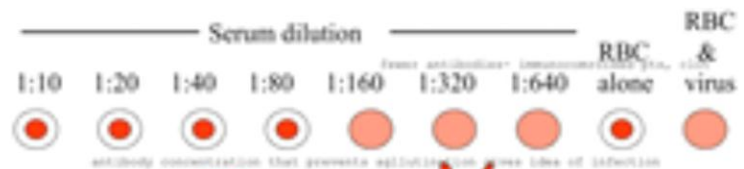
- Basit
- Ekonomik
- Hızlı sonuç verebilen
- Saha Şartlarında kullanılabilen bir testtir.

Ortamda bulunan toplam viral partikül miktarı açısından kantitatif bir sonuç verirken enfektif virus partikülü açısından bilgi sunamaz.

HEMAGLÜTİNASYON İNHİBİSYON TESTİ

Serologic Diagnosis (Hemagglutination Inhibition)

When antibodies are in serum they prevent agglutination



TANIM

HI, hemaglutinasyon yapma yeteneğindeki bir antijenin, bu yeteneğinin homoloğu olan antikolar tarafından bloke edilmesi olayıdır.

HI TESTİ 2 AMAÇLA UYGULANIR.

1. Antijenin identifikasyonu (virus sulandırma yöntemi)
2. Şüpheli serumda antikor varlığını ve titresini belirleme (serum sulandırma yöntemi)

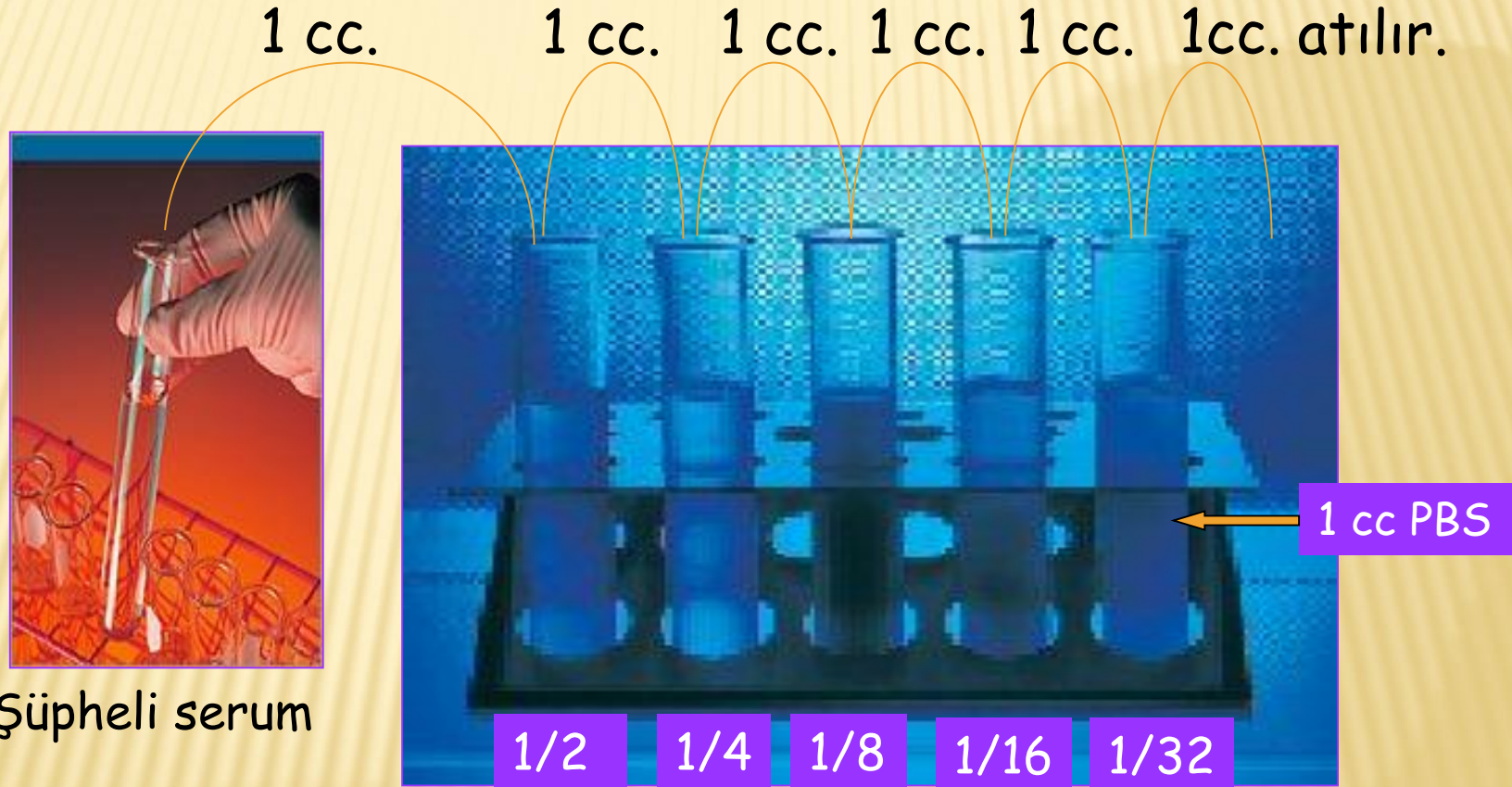
ANTİKOR TESPİTİ İÇİN (SERUM SULANDIRMA)

Testin esası

Bilinen ve 4 HB oranında sulandırılmış olan antijen ile şüpheli serumun eşit hacimde, uygun süre tüp yada tablette inkube edilmesi ve daha sonra ortama eritrosit ilave edilerek, sonucun değerlendirilmesidir.

Testin yapılışı

Serumun log2 tabanına göre sulandırmaları hazırlanır. Test tüp yada hemaglutinasyon tabletlerinde uygulanabilir.



<http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap18/lecture3.htm>

Sulandırmalar üzerine eşit hacimde bilinen ve 4 HB oranında sulandırılmış antijen konulur.

İnkubasyona bırakılır.

Eşit hacimde eritrosit ilave edilir.

İnkubasyonu takiben sonuç değerlendirilir.

Sonucun değerlendirilmesi






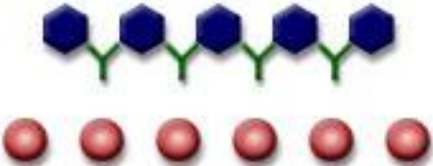

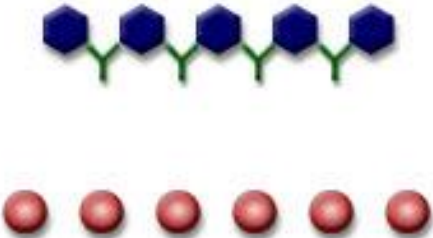
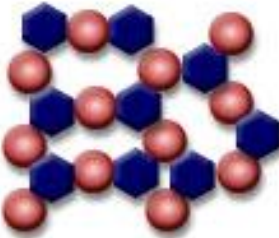
HA oluşumu esas alınarak değerlendirilir.

İlerleyen sulandırmalarda serumdaki antikor miktarı azalacağından, serumdaki antikor miktarına bağlı olarak belli bir sulandırmadan sonra , HA oluşmaya başlar.



HEMAGLÜTİNASYON İNHİBİSYON TESTİ

Hemagglutination Inhibition Tests (HI)

<p>REAGENTS: test serum (with or without Ab's)</p> <p>virus </p> <p>Ab's </p> <p>Allow time to react in solution</p>	<p>POSITIVE SAMPLE anti-virus Ab's present</p> 	<p>NEGATIVE SAMPLE anti-virus Ab's absent</p> 
<p>REAGENT: RBC's of appropriate species </p>	<p>virus surface glycoproteins binding to RBC's is inhibited</p> 	<p>virus surface glycoproteins bind to RBC's</p> 
<p>POSITIVE: Ab's inhibit hemagglutination</p> <p>NEGATIVE: virus induces hemagglutination</p>		

Serumda Ab (+)

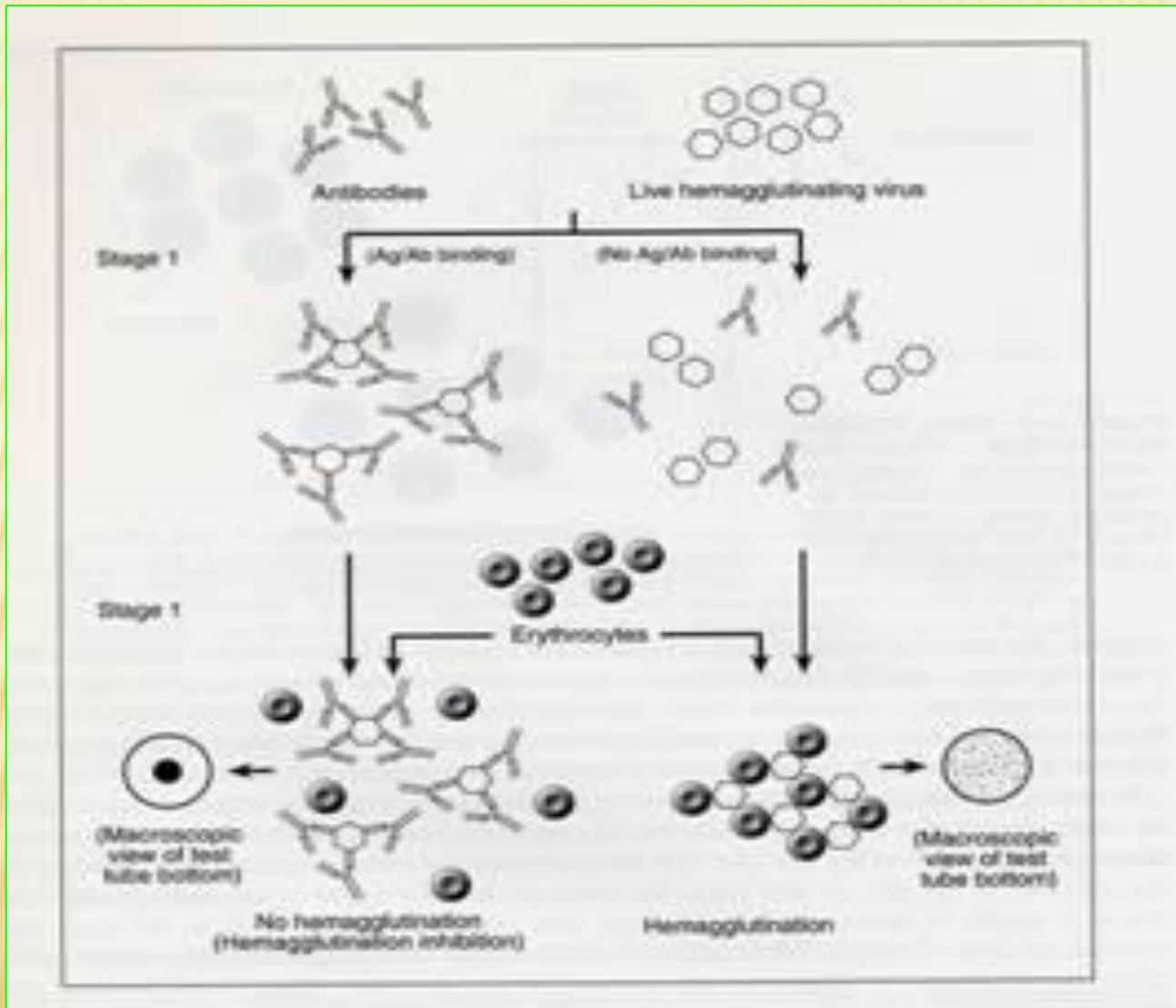
HI (+)

HA (-)

Serumda Ab (-)

HI (-)

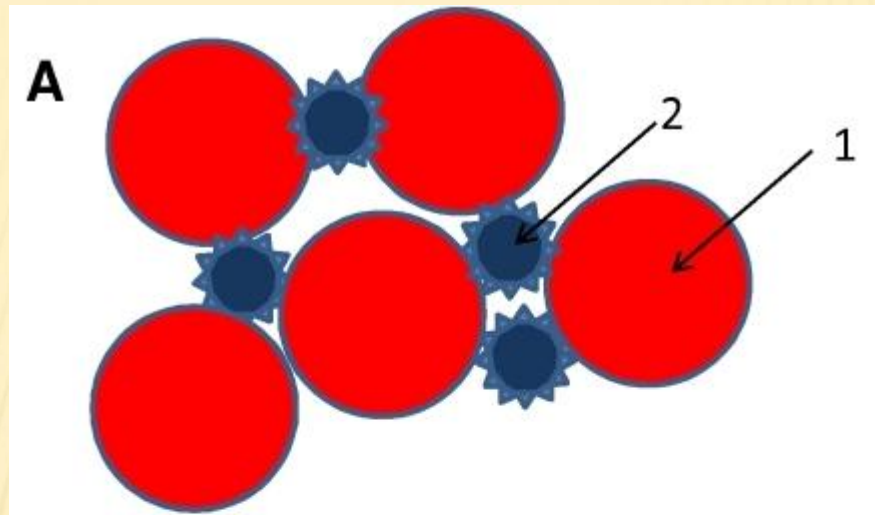
HA (+)



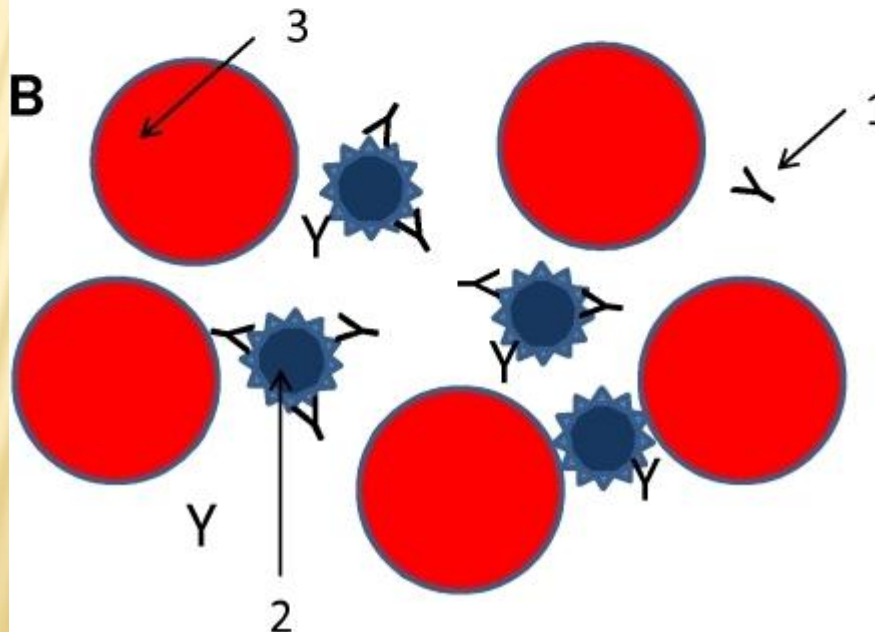
SONUCUN DEĞERLENDİRİLMESİ-ÖRNEK

<u>Sulandırma</u>	<u>HA</u>	<u>HI</u>
1/2	(-)	(+)
1/4	(-)	(+)
1/8	(-)	(+)
1/16	(-)	(+)
1/32	(+)	(-)
HI titresi: $1/16 \times 4 = 1/4$		

HA



HI



DERS KAYNAKLARI

- 1. Genel Viroloji (Burgu I., Akça Y., 1999, Ankara)**
- 2. Genel Viroloji (Yesilbag K., 2010, Bursa)**
- 3. Veterinary Virology (Murphy ve ark., 1999), Academic Press**