

IMMUN PEROKSİDAZ TESTİ (PEROXİDASE LINKED ANTİBODY ASSAY-PLA)

Prof.Dr. Yılmaz Akça
Prof.Dr. Feray Alkan
Prof.Dr. Aykut Özkul
Prof.Dr. Seval Bilge-Dağalp
Prof.Dr. M. Taner Karaoğlu
Prof.Dr. Tuba Çiğdem Oğuzoğlu

Tanım: Enzim ile işaretli antikorlar ve substrat kullanılarak , şüpheli materyalde bulunan etken (ya da Ag) ya da bunlara karşı oluşmuş antikor varlığının araştırıldığı, immunositokimyasal bir yöntemdir.

Kullanım Amaçları

- Marazi madde inokule edilen hücrelerde antijen tesbiti
- Doğal enfekte hücrelerde antijen tesbiti (nasal epitel, sperma)
- Patolojik materyalde antijen tesbiti
- Antikor tesbiti
- Diğer alanlar (virus titrasyonu, histoloji,vb)

İmmunperoksidaz testi uygulaması için,

↗Hücre kültürü

↗Konjugat

↗Substrat

↗Virus (Bilinen yada şüpheli)

↗Serum(bilinen veya şüpheli- Direkt IPhariç)

↗İnvert mikroskop

↗Test tabletleri ve test solusyonları

Konjugat: Enzim ile işaretli antikor.
(işaretleyici madde + Antikor)

➤İşaretleyici madde

➤ Peroksidaz, glucosoxidase, B-galaktosidaz, alkalen fosfataz gibi enzimlerdir. Bunlardan en sıklıkla kullanılanı PEROKSIDAZ'dır.

➤**Peroksidaz enzimi, stabil olması, kolayca purifiye edilebilmesi ve çok sayıda substrat ile reaksiyona girebilmesi nedeniyle tercih edilir.**

Konjugatın yapısındaki antikor

➤ **Tespiti amaçlanan etken için spesifiktir**

(Örneğin direkt IP testi “A” antijenin varlığını araştırmak için yapılıyor ise antikor “A”antijenine karşı oluşmuştur)

➤ **Primer antikora spesifiktir.** (Örneğin sığır serumunda bir antikor varlığı arınıyor ise, anti-sığır Ig G’ler konjugatın yapısında bulunur)

➤ Direkt PLA ve NPLA testinde konjugat antijene karşı, indirekt PLA testinde ise primer antikora karşı hazırlanmıştır.

Substrat

- Enzim ile reaksiyona girerek immun kompleksin varlığını ortaya koyan maddedir. Enzim-substrat ilişkisi sonucunda, viral antijenin bulunduğu bölgelerde boyanma oluşur.
- AEC sıklıkla kullanılan peroksidaz spesifik substrat olup, kırmızı kahverengi boyanma oluşturur.

Test Yöntemleri

➤ Direkt IP testi (Ag tesbiti için)

➤ İndirekt IP testi (Ag ya da Ab tesbiti için)

➤ Nötralizasyon IP testi (Ab tesbiti için)

Direkt PLA testi:

- 24 gözlü test tabletlerinde monolayer olarak üretilmiş hücre kültürlerine şüpheli materyalden adsorpsiyona bağlı yöntem ile ekim yapılır.
- Uygun inkubasyon süresini (24-72 saat) takiben hücre yüzeyleri YIKANIR.
- Hücre kültürleri üzerine KONJUGAT ilave edilir. Inkubasyondan sonra (genellikle 1 saat) hücre yüzeyleri yeniden YIKANIR .
- Hücreler üzerine SUBSTRAT konulur ve 10-15 dakika sonra test **invert mikroskopta** kontrol edilir.
- Not: Inkubasyon ortamı: 37°C'de %5CO₂'li etüv

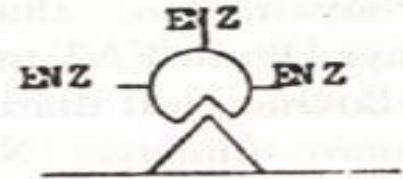
1. Antijen adsorbe edilir
(doku kültürü/doku kesiti)

YIKAMA

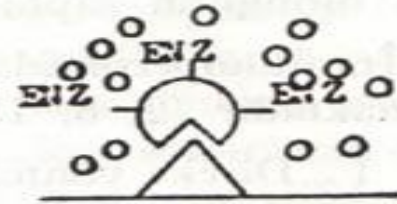


2. Enzimle işaretli spesifik antikor ilave edilir

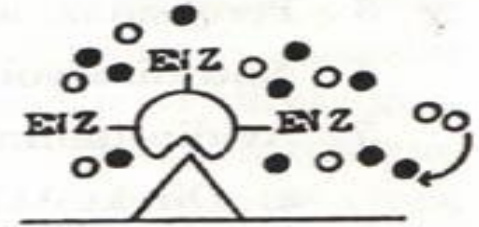
YIKAMA



3. Substrat ilave edilir



4. inkubasyon sonunda değişen substratın değerlendirilmesi(gözle, mikroskopik)

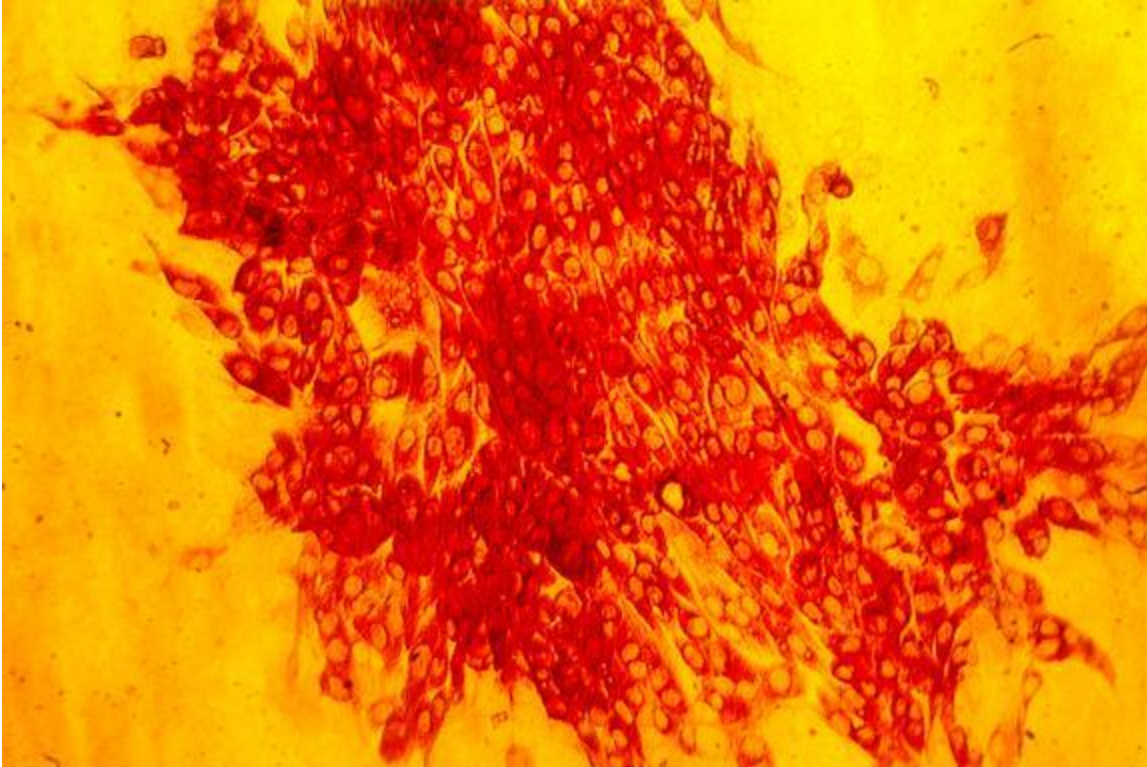


Şekil 1. Direkt Yöntem

Direkt PLA testi sonucu

↗ Hücrelerde boyanma (+) ise PLA (+)'dir.

↗ Hücrelerde boyanma (-) ise PLA (-)'dir.



Enfekte hücre kültüründe BRSV immunperoksidaz boyama

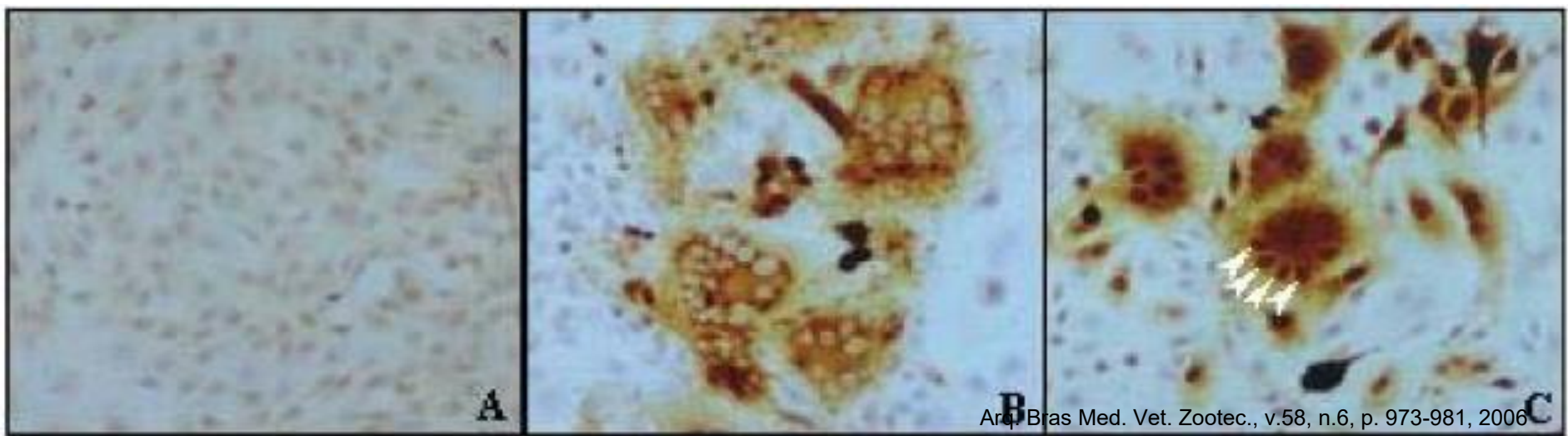
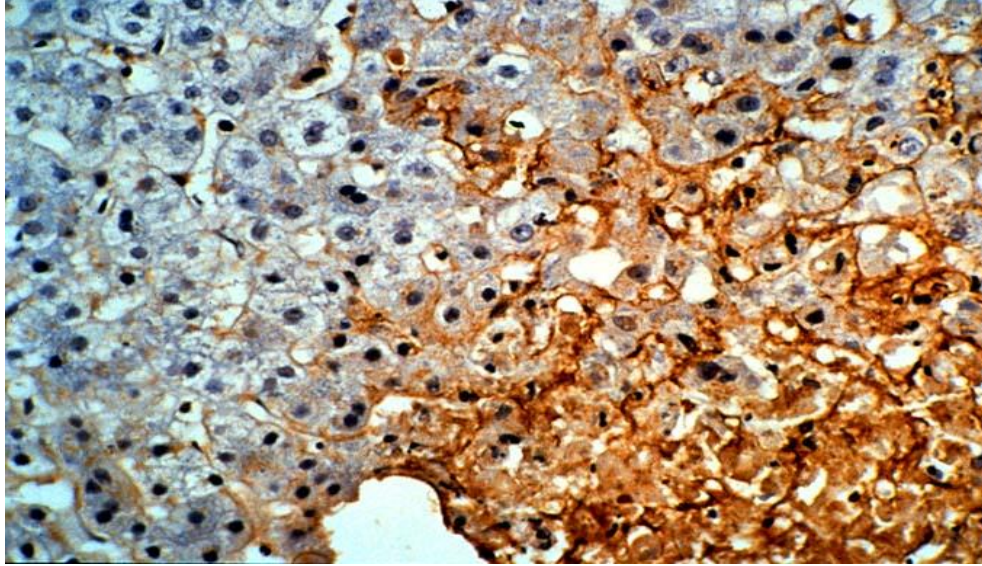


Figure 1. Detection of BRSV antigens in BRSV infected CER cells by IHC test. A: negative control, B: positive reaction with syncytial formation, and C: positive reaction with atypical nuclear staining (arrows) (100X).

Nekropsi örnekleri de IP ile deęerlendirilebilir



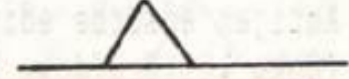
Immunoperoxidase boyama ile
herpesvirus enfekte karacięer grnm

<http://tpis.upmc.com/changeBody.cfm?url=/tpis/HB/H00034a.jsp>

İndirekt İmmunperoksidaz Testi

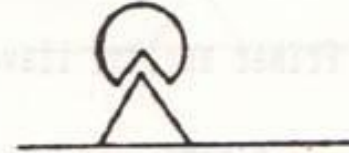
- Hatırlatma: Test Ag yada antikor varlığını saptamak için kullanılır. Sıklıkla Ab varlığını araştırmak için uygulanır.
- Testte kullanılan konjugatın yapısındaki antikorlar, primer antikora spesifiktir.

1. Antijen adsorbe edilir
(doku kültürü/doku kesiti)



YIKAMA

2. Spesifik antikor kapsayan serum
ilave edilir



YIKAMA

3. Konjugat ilave edilir



YIKAMA

4. Substrat ilave edilerek değerlendirme
yapılır(gözle, mikroskopik)



Şekil 2. İndirekt Yöntem

İndirekt PLA testinin uygulanışı

- Tablette monolayer tabakalanmış hücre kültürlerine virus inokule edilir.
- Uygun inkubasyondan süresinden sonra hücre yüzeyi YIKANIR ve ortama ŞÜPHELİ SERUMDAN konular, 1 saat 37°C'de inkube edilir.
- Inkubasyonu takiben, hücre yüzeyleri YIKANIR ve hücrelerin üzerine KONJUGAT ilave edilir.
- Inkubasyon(37°C-1 h) ve YIKAMAYI takiben hücreler üzerine SUBSTRAT ilave edilir ve 10-15 dakika sonra sonuçlar invert mikroskopta değerlendirilir.

İndirekt PLA testi sonucu

- Hücrelerde boyanma **(+)** ise, **İndirekt IPT(+)'dir.** (Şüpheli serumda bilinen virusa spesifik antikor vardır).
- Hücrelerde boyanma **(-)** ise, **İndirekt IPT (-)'dir.** (Şüpheli serumda bilinen virusa spesifik antikor yoktur)

Nötralizasyon IP testi (NPLA)

↗ **Tanım:** Bilinen virus ile şüpheli serum örneğinin nötralizasyon için bekletilmesini takiben, nötralizasyonun olup olmadığının direkt IP yöntemine göre kontrolü esasına dayanır.

↗ **Hatırlatma:**

↗ Test, antikor varlığının araştırılması için uygulanır.

↗ Konjugat, bilinen virusa spesifik Ab içerir.

Nötralizasyon immün peroksidaz testinin uygulanışı

- 100DKID50 oranında sulandırılan virus eşit hacimde şüpheli serum ile 1 saat 37°C'de inkubasyona bırakılır.(Bu amaçla çoğunlukla 96 gözlü tabletler kullanılır.)
- Süre sonunda tabletin gözlerine hücre süspansiyonu ilave edilerek, tabletler 37°C'de 2-3 gün inkubasyona bırakılır.
- İnkubasyondan sonra hücre yüzeyleri YIKANIR ve hücrelerin üzerine KONJUGAT (Konjugat virusa spesifiktir) ilave edilir. 1 saat 37°C'de inkubasyona takiben hücre yüzeyleri yeniden YIKANIR ve SUBSTRAT ilave edilir. Test 10-15 dakika sonra invert mikroskopta değerlendirilir

NIF testi sonucunun değerlendirilmesi

- ↗Hücrelerde boyanma oluşumu (+) ise,NPLA (-)dir. (Şüpheli serumda bilinen virusa spesifik antikor yoktur)
- ↗Hücrelerde boyanma oluşumu (-) ise,NPLA (+)dir. (Şüpheli serumda bilinen virusa spesifik antikor vardır.)