

# SEROLOJİK TEPKİMELELER



# Antijen

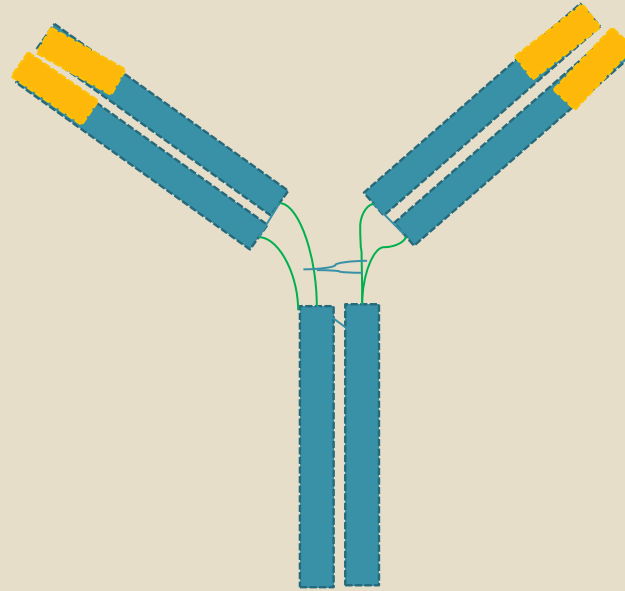


- Bağışık yanıt verebilecek düzeyde gelişmiş organizmalara verildiklerinde; kendilerine karşı bağışık yanıtın oluşmasına yol açan ve bu yanıt sonucunda ortaya çıkan antikorlarla özgül olarak birleşme yeteneğindeki maddelerdir.

# Antikor

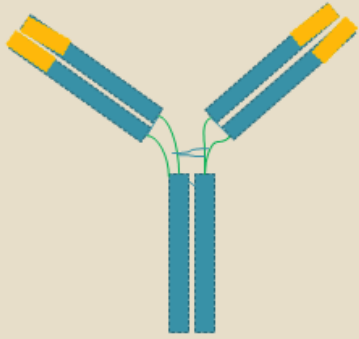


- Bağışık yanıt sonucunda kendilerinin oluşmasında etkin olan antijenlerle özgül olarak birleşip tepkimelere yol açabilen immünoglobülinlerdir.

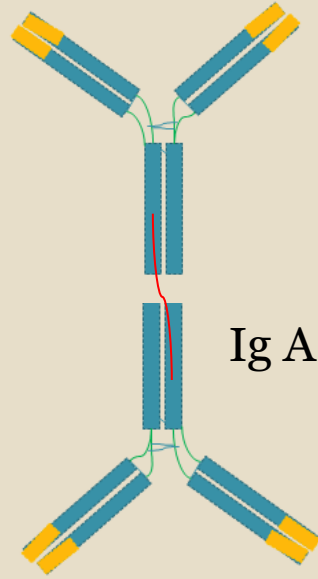


Deęişken zincir

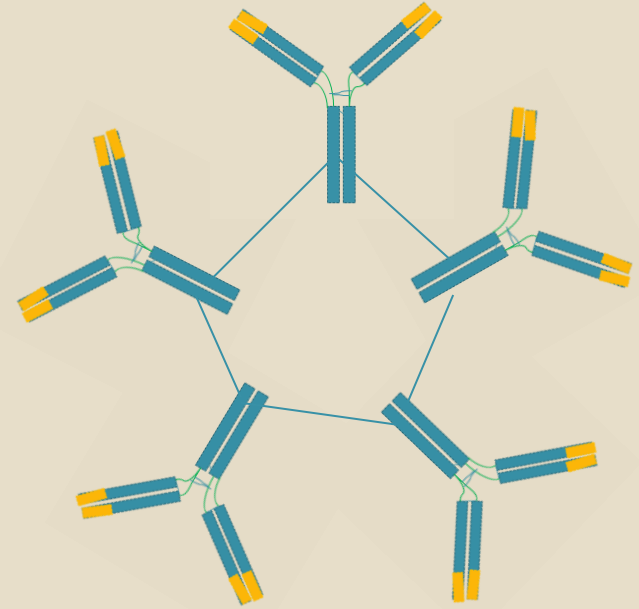
# Antikor Çeşitleri-Yapıları



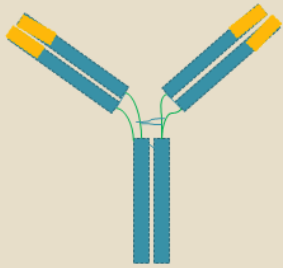
Ig G



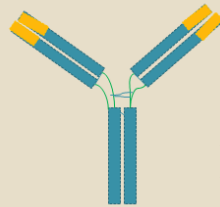
Ig A



Ig M



Ig E



Ig D



- Antikorlar, etkin bir immün yanıtın önemli yapıtaşlarıdır ve hücre dışı patojenlere ve toksinler gibi tehlikeli çözünen proteinlere karşı antijene spesifik immünite sağlar.
- Serum, mide salgıları ve süt gibi diğer vücut sıvılarında bulunur.

# Antijen-Antikor İlişkileri



1. Antijen antikor birleşmesi özgüdür.
2. Antijen antikor birleşmesi kimyasal bir olaydır (zayıf kimyasal bağlar). Antijenlerin kendi antikorlarına karşı özgüllüğünü belirleyen, özel kimyasal grupları vardır. **'Epitop'** adını alan bu kimyasal gruplar antikorların aminoterminal uçlarında yer alan ve **'Paratop'** denen birleşme bölgeleri ile özel olarak birleşirler.
3. Antijen antikor birleşmesi için elektrolitli ortam gereklidir.
4. Antijen ve antikor değişik oranlarda birleşir. Bağlar iki molekülün birbirine olan yakınlık derecesine bağlı olarak, bir ya da birkaç bölgede gerçekleşebilir.

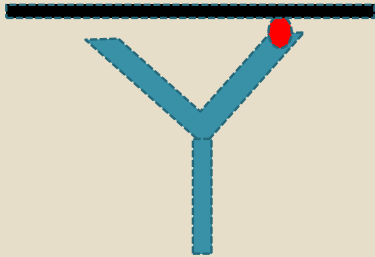


- Epitop ve paratoptaki bu iki birleşme bölgesinin şekilleri tam olarak birbirlerine uygun olmayabilirler. Buna göre de antijen-antikor birleşmesi güçlü veya zayıf oluşabilir.
- Antijen-antikor birleşme sağlamlığı ile ilgili 2 terim karşımıza çıkar.

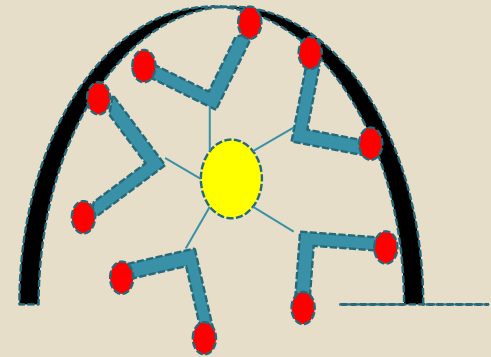
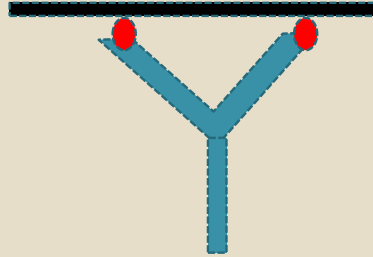


- Antijenin tek bir determinantının, antikorun tek bir birleşme yanına (bir epitop bir paratop) olan birleşme ilgisine **afinite** denir.
- Doğal antijenlerin çoğu çok valanslıdır. Antikorların da en az 2 valansı vardır. Bir bağışıklama esnasında multivalan antijenin tüm determinantlarına karşı çeşitli afinite de antikorlar oluşur. İşte bir antiserumun tüm birleşme kapasitesinin multivalan antijene bağlanma gücüne **avidite** denir.





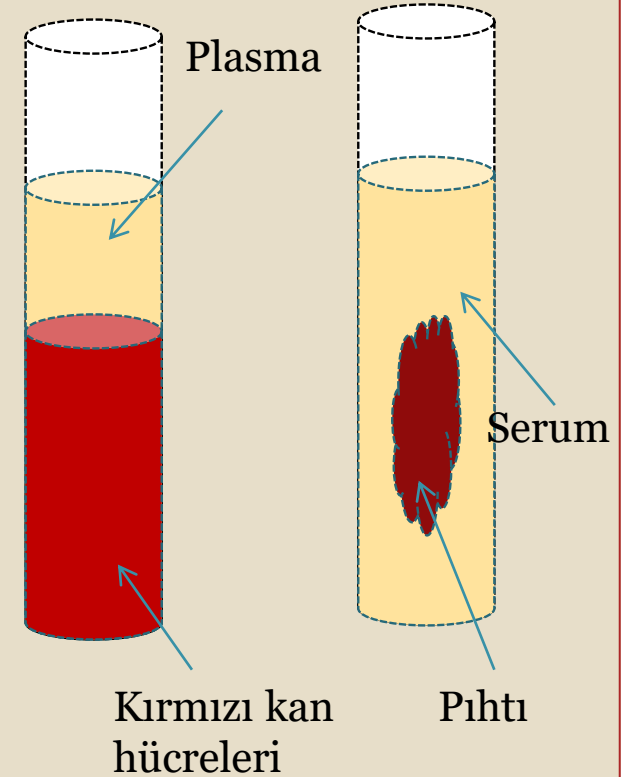
Afinite



Avidite



- Antijen ile antikor arasında reaksiyonların in-vitro koşullarda yapılmasına **serolojik tepkimeler** denir.
- Bu yöntemler antijen-antikor özgül birleşme esasına dayanan yöntemlerdir. Bilinen antikor ile şüpheli antijenin veya bilinen antijen ile şüpheli antikorun saptanması şeklindedir.



 İn vitro serolojik tepkimeler 2 amaca yönelik olarak uygulanabilmektedir.

- **İnfeksiyon hastalıklarının laboratuvar tanısında** etkenin belirlenmesi amacı ile direkt ve indirekt tanı yöntemlerinden yararlanır.
  - a) **Direkt etiyolojik tanı:** Mikroorganizmanın üretilmesi, antijeninin ya da nükleik asidinin direkt olarak muayene maddesinde gösterilmesi esasına dayanır.
  - b) **İndirekt etiyolojik tanı:** Hasta serumunda etken mikroorganizmaya karşı oluşan özgül antikorların gösterilmesi esasına dayanır.
- **Mikroorganizmaların ve antijenlerinin tanınması**

# Primer ve sekonder enfeksiyon ayırımında kullanılır.



IgG (-)

IgM (+)



Yeni

Kazanılmış

Enfeksiyon

IgG (+)

IgM (-)



Önceden

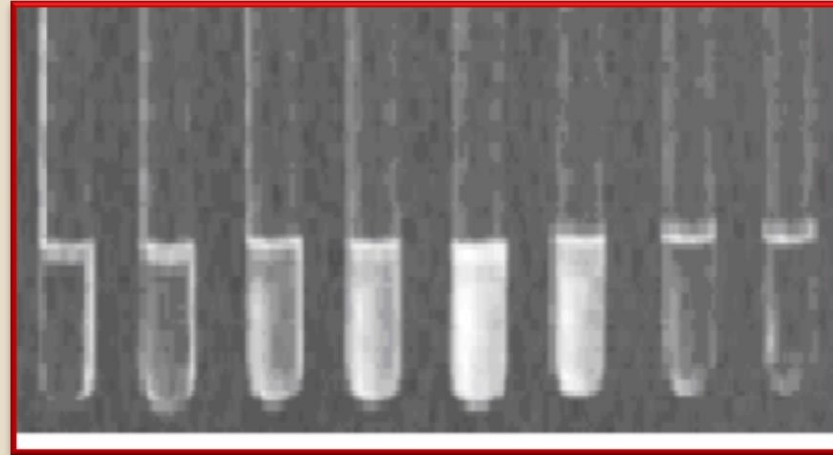
Geçirilmiş ve

Kazanılmış Bağışıklık

Antijen-antikor birleşmesine dayanan niceliksel testler ile serum örneklerindeki antijen veya antikor miktarındaki artışlar da kolayca saptanabilmektedir.



- Bir seri tüp alıp her birisine belli miktar antikor (örn. 1 ml bağışık serum) koyalım, bunlara sıra ile gittikçe artan miktarlarda suda erimiş antijen ekleyelim. Üzerlerine fizyolojik tuzlu su ekleyerek hacimlerini eşitleyelim tüpleri bir süre uygun ortamda bekletelim.
- Süre sonunda ilk tüplerin berrak, sonrakilerde gittikçe artan bir bulanıklığın var olduğu, daha sonrakilerde ise bulanıklığın gittikçe azaldığı ve son tüplerin yine berraklaştığı saptanır.



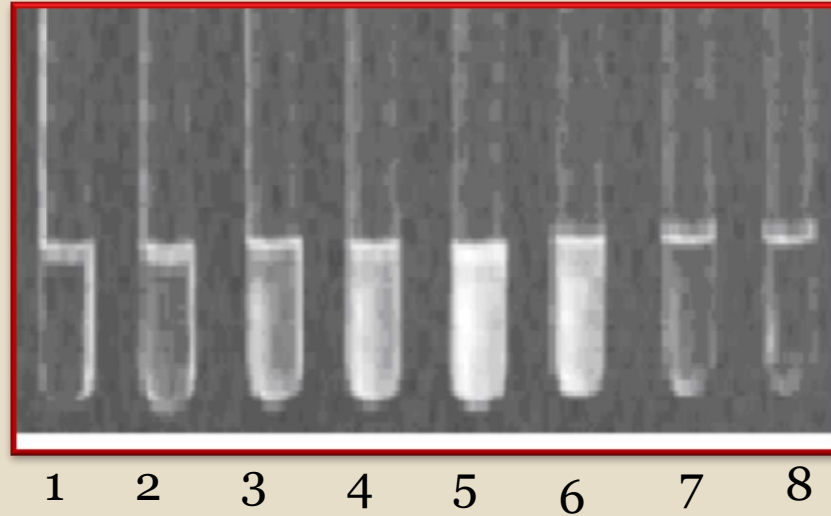
1 2 3 4 5 6 7 8



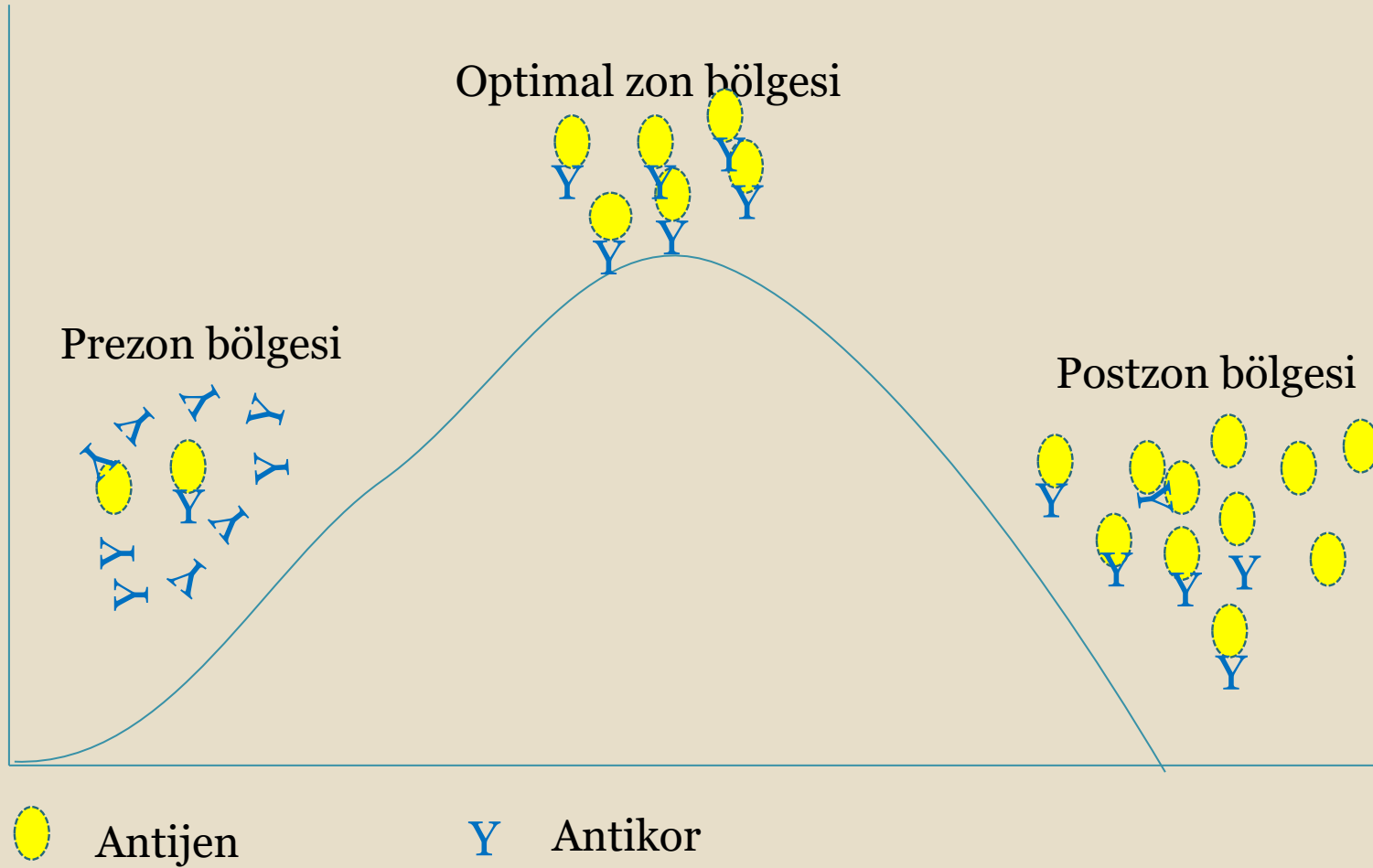
- ✓ Tüpler bir süre sonra santrifüj edildiğinde üstteki sıvı kısmı incelenecek olursa, bulanıklığın en fazla olduğu tüpteki üst sıvıda antijen ve antikora rastlanmaz.
- ✓ Antijen ile antikorun birbiri ile tam olarak birleştikleri bu bölgeye **optimal zon (optimal bölge)** denir.



- ✓ Optimal birleşme tüpünden önceki tüplerin bulunduğu antikor fazlalığı bölgesinde reaksiyon vermeyen yani bulanıklık göstermeyen tüplerin olduğu bölgeye **prezon (zon öncesi)** denir.
- ✓ Aynı şekilde optimal tüpten sonraki, antijenin fazla olduğu bölgede bazı tüplerde antijenin fazlalığına dayalı olarak değişikliğin görülmediği bölgeye **postzon (zon sonrası)** denir.



# Antijen-Antikor Birleşmesi





# SEROLOJİK TEPKİMELELER



- Presipitasyon
- Aglütinasyon
- Eritrositlerin Yer Aldığı Aglütinasyon Deneyleri
- Toksin-Antitoksin Tepkimeleri
- Nötralizasyon Deneyleri
- Floresanlı Antikor Deneyleri
- Enzimli İmmün Deney
- Radyoaktifli İmmün Deney
- Opsonositofajik Deney
- Kompleman ve Kompleman Birleşmesi Deneyi

# PRESİPİTASYON



- Suda erimiş durumda bulunan antijenlerin elektrolitli ortamda kendi immünoglobülinleri (antikorları) ile birleşmesi ile önce bulanıklık sonra bir çökme olayı şeklinde gerçekleşen olaya denir.
- Antijen → Presipitinojen
- Antikor → Presipitin



- Presipitasyonun çeşitli uygulama yöntemleri vardır:
  1. Halka deneyi
  2. Tüpte sulandırım deneyi
  3. Jel içinde presipitasyon
    - a. Jel içinde tek yönlü yayılma ile presipitasyon
    - b. Plak şeklindeki jel içinde yayılma ile presipitasyon
    - c. Karşıt immünelektroforez
    - d. Serum immünelektroforez

# Tüpte Halka Deneyi



- Test için ince bir tüp içerisine az bir miktar antiserum konur, üzerine iki sıvı karışmayacak ve tabaka oluşturacak şekilde yavaşça antijen eklenir.
- Kısa süreli bir inkübasyondan sonra, antikor ile antijenin temas ettiği yerde halka şeklinde bir çökelti mevcut ise sonuç olumlu olarak değerlendirilmektedir.

# Jel İçinde Presipitasyon



- Jel içinde tek yönlü yayılma ile pres.: Oudin tekniğinde, ince bir tp içerisine jelatine karıştırılmış antiserum eklenir. Jelatin donduktan sonra üzerine kuşkulanılan antijen eriyiği bir tabaka halinde yayılır. Bir iki gün içinde antijen ile antikorun uygun olması durumunda optimal yoğunluğun bulunduğ bölgede ve yüzeyden belli uzaklıkta presipitasyon tabakası oluşur.
- % 0,6'lık saf agar kullanılmalıdır.
- Çok duyarlı bir yöntem olup çok küçük miktardaki antijen ya da antikorun bu yoldan saptanması mümkündür.

# Plak şeklindeki jel içinde yayılma ile presipitasyon

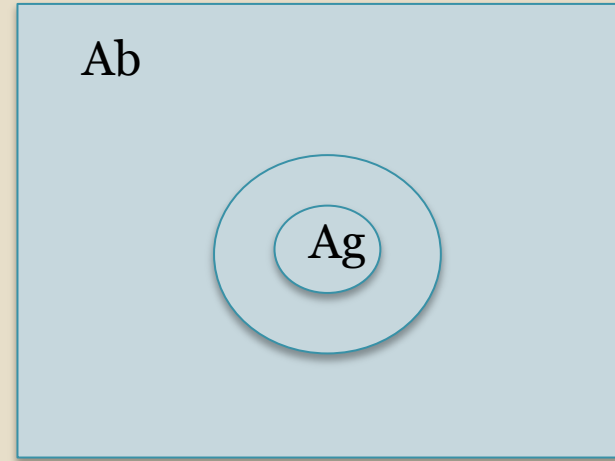
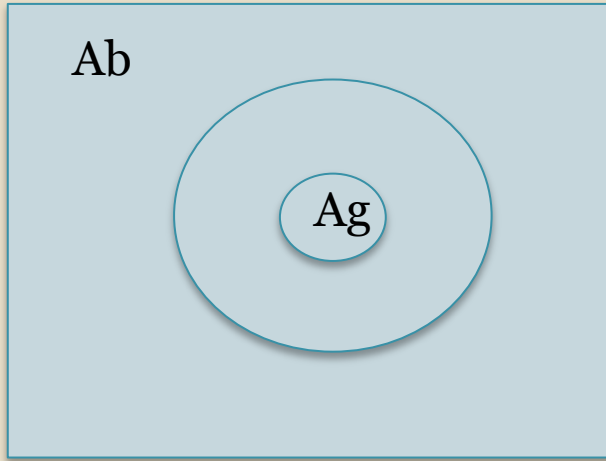


- **Mancini tekniğinde (Radyal immünodifüzyon);** elektrolitli ortam ve pH'sı (7.2) ayarlanmış saf agar kullanılarak hazırlanmış agarın içerisine agar soğumakta iken antiserum karıştırılır ve plaklara dökülür. Donduktan sonra plakta çukurlar açılır ve ileri boşaltılır. Bu çukurlara, içinde antijen bulunduğundan kuşkuilanılan sıvı konur. Soğukta (+4 °C) bir gece bekletilir.
- Agar içerisindeki antikora özgül antijeni içeren çukurun etrafında halka şeklinde presipitasyon bandı oluşur.

# Mancini Tekniđi



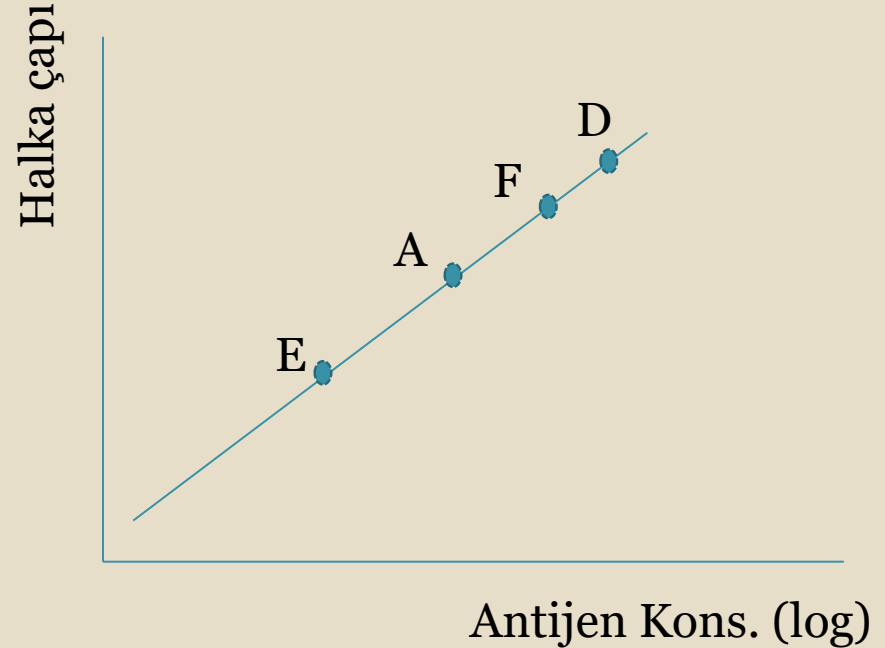
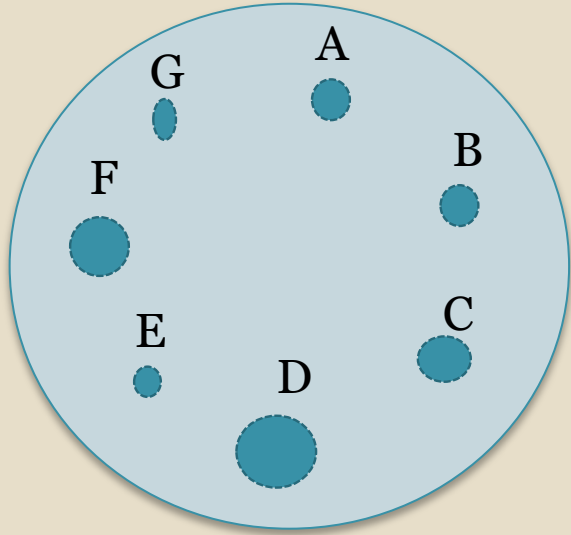
Oluşan halkanın çap büyüklüğü antijenin yoğunluğu ile doğru orantılıdır.



# Mancini Tekniđi



Bu teknik önce miktarı bilinen antijen örneği ile standardize edilir ve standart eğri oluşturulur ise içeriği bilinmeyen örneklerdeki antijen miktarları da saptanabilir.

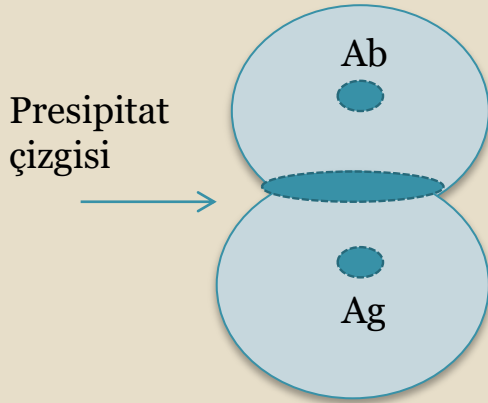




# Agar içinde çift yönlü yayılma ile presipitasyon



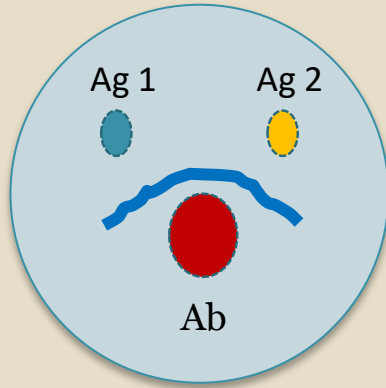
- **Ouchterlony tekniğinde;** petri kabında hazırlanan agar matrikste birbirinden 1 cm aralıkta açılan 5 mm çaplı iki çukurdan birine antijen, diğerine ise özgül antikor eklenir. Çukurlara eklenen reaktanlar etrafa radial tarzda yayılır. Bir gece soğukta bekletildikten sonra her bir reaktanın oluşturduğu dairesel konsantrasyon gradienti birbiri ile örtüşür.
- Presipitasyon reaksiyonu için gerekli optimal oranın sağlandığı örtüşüm alanında opak beyaz presipitat çizgisi gözlenir.



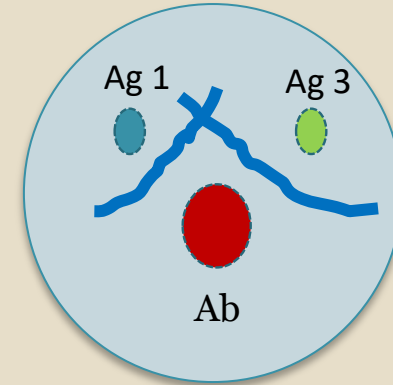
# Ouchterlony Tekniđi



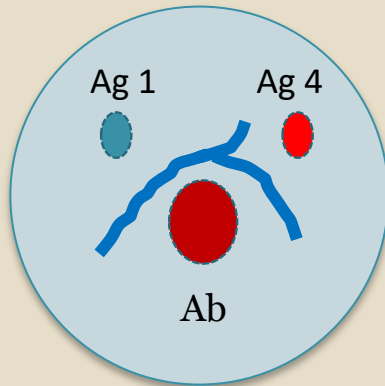
Benzer



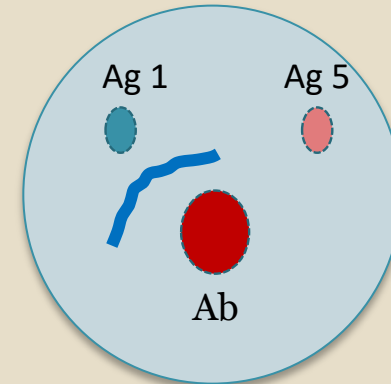
Antijenler farklı



Çapraz reaks.



Antijenler farklı



# İmmünelektroforez



- Protein karakterindeki maddelerin elektrik yükleri birbirinden farklıdır. Bu nedenle elektriksel bir alanda hareketleri farklılık gösterir. Elektriksel alanda antijenlerin elektroforetik olarak ayrıştırılma işlemine **elektroforez** denir.



- Vücut sıvılarında antijenlerin varlığını ya da yokluğunu saptamada hızlı ve kalitatif bir teknik olarak kullanılır.
- Bu yöntem ile serumda viral antijenler, BOS bakteriyel antijenleri saptanır.
- Elektroforezli jel içinde 2 yönlü yayılan presipitasyon temeline dayanır.

# Karşıt İmmunelektroforez



- ✓ Jel plakları hazırlanır. Üzerine 2 mm çapında 3 mm uzaklıkta delikler açılır.
- ✓ Birine antijen araştırılacak sıvı, diğerine ise antikor içeren bağışık serum konulur.
- ✓ Elektroforez aygıtına materyal (antijen) tarafından (-), antiserum tarafından (+) elektrot bağlanır.
- ✓ Antijen (-) yüklü olduğundan **katot** tarafına göç ederken, bağışık serumdaki antikorlar **anoda** doğru göç eder ve antijen-antikor kompleksinin max miktarda oluştuğu ara yerde pres. çizgileri oluşur.
- ✓ Bu çizgi istenirse özel yöntemlerle boyanabilir.

# AGLÜTİNASYON



- Süspansiyon halindeki bakterilerin, eritrosit, lökosit gibi hücrelerin yüzeylerinde doğal olarak bulunan ya da eritrosit, lateks, bentonit gibi sentetik parçacıkların yüzeylerine yapay olarak yapıştırılmış antijenler, elektrolitli ortamda kendi antikörleri ile birleşerek gözle görülebilir büyüklükteki parçacıklar halinde çökmeleri olayına **aglutinasyon** denir.

Antijen → Aglutinojen

Antikor → Aglutinin

# Aglütinasyon deneyi 2 amaca yönelik kullanılabilir.



1. Bakteri tanınması (identifikasyon)-elde bilinen antikor bulunur
2. Hastalık tanısında aglütinasyon-bilinen antijene karşı antikor bulunup bulunmaması



# İnfeksiyon hastalıkların tanısında kullanılan aglütinasyon reaksiyonları



- Salmonelloz Tanısında → Gruber-Widal deneyi
- Bruselloz Tanısında → Wright deneyi
- Riketsiyoz Tanısında → Weil-Felix deneyi
- Leptospiroz Tanısında → Mikro Aglütinasyon
- Treponema pallidum immobilizasyon deneyi



# Bruselloz Tanısı



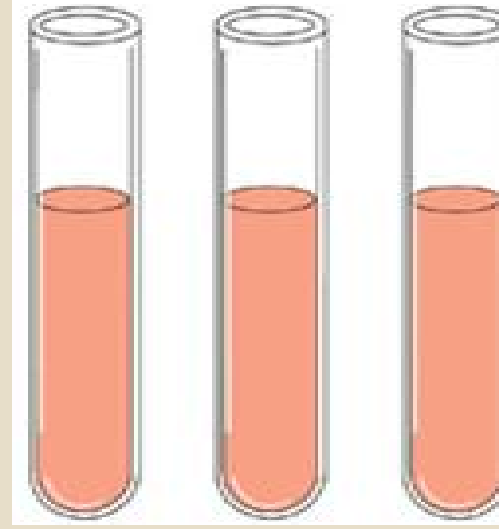
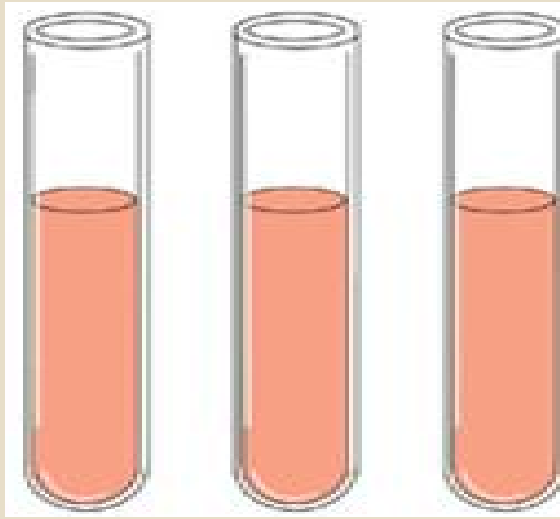
- Malta ateşi, dalgalı ateş
- Hastalıkta antikorlar 2. haftadan başlayarak oluşur ve uzun süre kanda bulunur.
- Deneyde antijen olarak iyi aglütinasyon veren kökenlerin kolonilerinden üretilmiş, standart, ısı ile öldürülmüş, fenollü bakteri süspansiyonları kullanılır.
- Normal kimselerde ve öz. veteriner, kasap, çoban vb meslekle uğraşanların serumunda 1/80-1/100 titresinde aglütinin bulunabilir. (1/100'den yukarı aglütinasyon sonuçları önem taşır.)

# Wright Aglutinasyon Deneyi



- Serum (+) içeren tüp
- Serum (-) içeren tüp
- Serum fizyolojik (elektrolitli ortam)
- Antijen (*Brucella abortus*) içeren tüp
- 6 tane küçük tüp (serum (+) için)
- 6 tane küçük tüp (serum (-) için)

# Wright Deneyi



0,9  
ml sf

0,5  
ml sf

0,5  
ml sf

0,5  
ml sf

0,5  
ml sf

0,5  
ml sf

+  
0,1 ml  
serum(+)

0,5

+



dışarı

-

+  
0,5 ml  
antijen

+  
0,5 ml  
antijen

+  
0,5 ml  
antijen

+  
0,5 ml  
antijen

+  
0,5 ml  
antijen

1/10

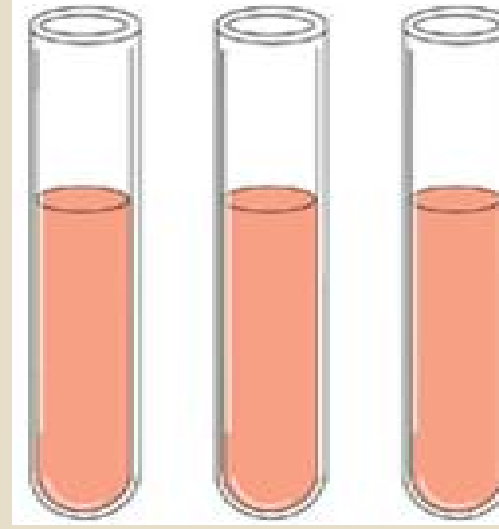
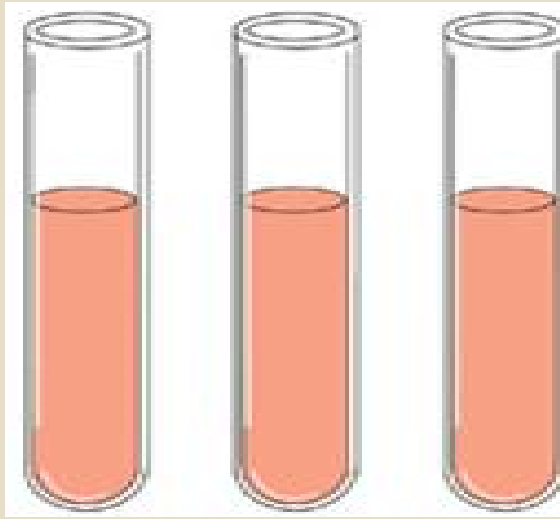
1/40

1/80

1/160

1/320

# Wright Deneyi



0,9  
ml sf  
+  
0,1 ml  
serum(-)

0,5<sup>+</sup>

0,5  
ml sf  
+



0,5  
ml sf  
+



0,5  
ml sf  
+



0,5  
ml sf  
+



0,5  
ml sf

dışarı

-

+  
0,5 ml  
antijen

+  
0,5 ml  
antijen

+  
0,5 ml  
antijen

+  
0,5 ml  
antijen

+  
0,5 ml  
antijen

1/10

1/40

1/80

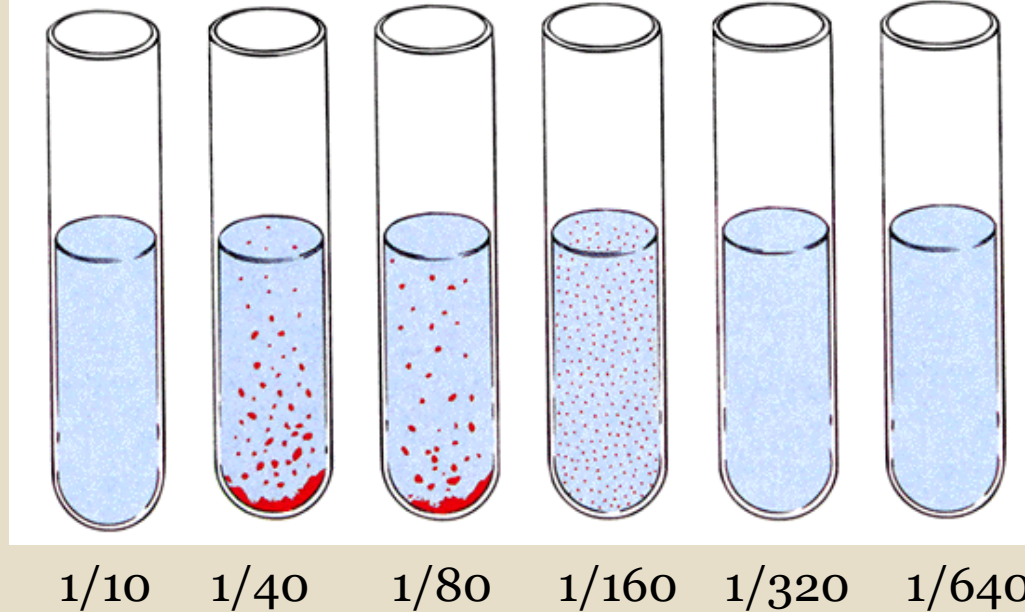
1/160

1/320

# Bruselloz tanısı



- 1. tüp Antikor kontrol tüpü
- 6. tüp Antijen kontrol tüpü
- Tanı: Deney sonunda 1/100 üstü aglütinasyon görülmesi (+) sonuç



# Eritrositlerin Yer Aldığı Aglütinasyon Deneyleeri- Hemaglütinasyon Deneyleeri



- Partiküler antijen olarak eritrositin kullanıldığı aglütinasyon deneyleerine ‘hemaglütinasyon deneyleeri’ denir.
- Eritrosit yüzey yapısındaki antijen ile buna özgül antikorun birleşmesi sonucu oluşan reaksiyona ‘aktif hemaglütinasyon’
- Başka antijenlerle kaplanmış eritrosit süspansiyonları bu antijenlere karşı oluşmuş antikorlarla karşılaştıklarında aglütine olurlar bu çeşit aglütinasyona ‘pasif hemaglütinasyon’ denir. Eritrositler burada yalnızca antijen taşıyıcı olarak görev alır.

# Heterofil Antikor Deneyleri



- Kalıtsal yapı bakımından birbirlerinden farklı olan bazı canlılarda (fare, köpek, kedi, tavuk, kobay vs) ortak olarak bulunan, aynı yapıdaki antijenlere **heterofil antijenler**, bunlara karşı oluşan antikorlara da **heterofil antikorlar** denir.

# Heterofil Antikor Deneyleri



- Enfeksiyöz mononükleaz tanısı Paul-Bunnet Deneyi
- Atipik pnömoni tanısı-Soğuk Agglütinasyon Deneyi
- Pasif Hemagglütinasyon ve Parçacık Hemagglütinasyonu
- Virüs Hemagglütinasyonu ve Hemagglütinasyon İnhibisyon Deneyi