

HUMORAL VE HÜCRESEL BAĞIŞIKLIĞIN ÖLÇÜLMESİNDE KULLANILAN TESTLER VE ÖZELLİKLERİ

Hatice AYHAN (*)

İnsan ve veteriner hekimlikte klinik immunoloji son yıllarda hızla gelişmiş ve çeşitli laboratuvar teknikleri geliştirilerek gerek immunolojik hastalıkların (örnek : İmmun yetmezlik ve Otoimmun hastalıklar) gerekse immün cevabı uyaran (humoral ve selular) diğer patolojik olayların teşhisinde araştırmacı ve klinisyenlere kolaylık sağlanmıştır.

Klinik hastalarda immunolojik bozukluklar 5 grup altında toplanmıştır.

- 1 — Humoral immün cevap ve faktörlerin defekti
- 2 — Selular immün cevap ve çeşitli selular elementlerin defekti
- 3 — İmmün yetmezlikler
- 4 — Otoimmünite
- 5 — Allerji

Hekimlik alanında immunolojide yaygın olarak kullanılan laboratuvar testleri 3 kategoride toplanır.

- I — Humoral immün cevabın ölçülmesinde kullanılan testler,
- II — Selular immün cevabın ölçülmesindeki teşhis yöntemleri,
- III — Otoimmün bozuklukların teşhis yöntemleridir.

(*) A.Ü. Vet. Fak. Bakteriyoloji Bilim Dalı.

HUMORAL İMMUN CEVABIN ÖLÇÜLMESİNDE KULLANILAN TEŞHİS YÖNTEMLERİ VE ÖZELLİKLERİ

Humoral bağışıklığın ölçülmesinde kullanılan testler, antijen - antikor reaksiyonları esasına dayanmaktadır. Bakteri, virus, mantar, protozoon ve helmint gibi etkenlerle bunlara karşı serumda, diğer vücut sıvılarında ve sekretlerde (çeşitli biyolojik ve lab. materyali) bulunan özgül antikorların in vitro veya in vivo olarak karşı karşıya getirilip birleştirildiğinde tekniğin özelliğine göre çeşitli reaksiyonlar oluşur. Bu reaksiyonlar deneme ortamına bağlı olarak 2 ana bölüm altında incelenebilir.

A — İN VİTRO olarak uygulanan fiziksel veya serolojik reaksiyonlar. Örn.: Aglutinasyon, presipitasyon, komplement fiksasyon, flouescence antikor test, hemaglutinasyon v.s.

B — İN VİTRO olarak uygulanan biyolojik reaksiyonlar. Örn.: Nötrolizasyon, koruma testleri.

Ayrıca, humoral immün cevabın ölçülmesinde kullanılan testler bağlanma özellikleri esas alınarak 3 grup altında incelenir. (Tizard, 1981). Buna göre :

TABLO I : immunolojik testler ve duyarlılık dereceleri

TESTLER	μ g PROTEİN/ml
PRİMER BAĞLANMA TESTLERİ	
ELISA	0.0005
Radioimmunoassay (RIA)	0.00005
SEKONDER BAĞLANMA TESTLERİ	
Ring test	18
Jel presipitasyon	30
Bakteriyel aglutinasyon	0.05
Pasif hemaglutinasyon	0.01
Hemaglutinasyon inhibisyon	0.005
Komplement fiksasyon test	0.05
Virus nötralizasyon	0.00005
Bakterisidal aktivite	0.00005
Antitoksin nötralizasyon	0.06
ÜÇÜNCÜL (İN VİVO) TESTLER	
Pasif deri anafilaksi	0.02

Bu testlerin en duyarlıları antijen ve antikor arasındaki ilişkiyi direk olarak ölçen primer bağlanma testleridir. *In vitro* da immun kompleks formasyonu sekonder bağlanma testleri ile ölçülür. Teorik olarak, bu testler primer bağlanma testlerine göre daha az duyarlıdır. Üçüncül testlerle *in vivo* olarak immun cevap teşhis edilir. Örn.: Bir hayvanda antiserumun koruyucu etkisini saptamada üçüncül testler kullanılır. Bu nedenle üçüncül testler sadece antijen ve antikor arasındaki kombinasyonu değil, fagositoz gibi (mononükleer fagositik sistem hücrelerinin zarar verme kapasitesi) bu komplekslerin opsonizasyon kapasitelerini de ölçer. Birincil bağlanma testlerine göre duyarlılıkları azdır.

Humoral immun cevabın ölçülmesinde yer alan reaktifler :

1 — Antiglobulinler (antikor)

2 — Antijen

3 — Non-spesifik serum proteinleri (komplement sistem proteinleri, konglutininler)

PRİMER BAĞLANMA TESTLERİ

Primer bağlanma testleri, antijen ve antikor birleşmesi şeklindeki immunolojik reaksiyonlara dayanır ve bu testlerde immun kompleks miktarları *in vitro* olarak ölçülür. Bunun için flouescence boyama, radioisotop, enzim bağlama yöntemleri kullanılır.

ANTİKOR İÇİN RADIOİMMUNOASSAY

Bir serumun antikor düzeyi, erimez hale getirilmiş antijene bağlanma yetenekleri ile ölçülür. Antijen ya bir immunosorbanla birleştirilerek veya plastik bir fiziksel absorpsiyon yoluyla bağlanarak erimez hale getirilir. Bu esasa dayanan ve en çok kullanılan birincil bağlanma testlerinden biri Radio Allego-Sorbent (RAST) testtir. Bu yöntemde, antijenle doyurulmuş selüloz diskler şüpheli serumla daldırılır. Diskler yıkanır ve radioaktif madde ile işaretlenmiş antiglobulin solusyonuna batırılır. Eğer antijen özgül olarak antikor ile bağlanmışsa antiglobulinlerde diske bağlanır. Disklerin radioaktivitelerinin belirlenmesi ile serumdaki antikor düzeyi ölçülür.

Allerjik hastalarda IgE antikorlarının tayini için yaygın olarak kullanılan test de RAST'dır.

ANTİJEN İÇİN RADİOİMMUNOASSAY

Karşılaştırılmalı RIA, antijenlerin belirlenmesi için en çok kullanılan immunolojik bir testtir. Bu yöntem radioaktif olarak işaretlenmiş deney antijeninin bir dizi sulandırımının antikorun sabit sayıdaki antijen bağlama bölgeleri ile kademeli olarak birleşmesi esasına dayanır. Bu metodun kullanılan antijenin işaretlenmesi ve ölçülmesine bağlı olarak modifikasyonları vardır. En çok kullanılan yöntem karşılaştırmalı RIA'dır ve araştırılacak antijen $^3\text{H}_1$ (Radyoaktif hidrojen, trityum), ^{14}C (Karbon), ^{125}I (İyot) gibi izotoplarla işaretlenir.

Eldeki bağışık serum şüpheli antijen eriyiği ile karıştırılır. Eğer eriyikte antijen varsa bulunduğu oranda bağışık serumdaki antikorları bağlar. Belli bir kısım antikor da artar. (Bu antikorun antijeni bağlama gücüne bağlıdır.) Bu karışıma radioaktif hale getirilmiş bilinen antijen eklenir. Eğer karışımda ilk basamaktan sonra antikor artmış ise bu artan antikorlar radioaktif antijen ile birleşir. İnkubasyondan sonra antijen - antikor kompleksi antikora karşı hazırlanmış çöktürücü antiglobulin ilavesi ile çöktürülür. (Antiglobulin kopresipitasyon yöntemi ve % 50 NH_4SO_4 ile çöktürme Farr yöntemi). Yıkama işleminden sonra karışımın radioaktifliği gama dedektör sayacı ile ölçülür. Alınan sonuç bilinen bağışık serumun radioaktif antijeni bağlama gücü ile karşılaştırılır. Bu radioaktiflik derecesi ikinci aşamada ne kadar azalmış ise incelemekte eriyikte o oranda antijen var demektir.

Test aşırı derecede duyarlıdır. Diğer serolojik yöntemlerle araştırılması çok zor olan hormon ve ilaçlarının miktarlarının tayininde (Örn.: Morfinin idrardaki 10^{-8} - 10^{-10} μg konsantrasyonları tespit edilebilir), serumda bazı viral antijenlerin araştırılmasında önem taşır.

ELISA (Enzym linked immunosorbent assay)

Birincil bağlanma testleri gibi ya antijeni veya antikoru teşhis etmekte kullanılan ve enzim bağlamayı gerektiren testler içinde en önemlisidir.

Deneyde katı faz olarak selüloz, dekstron, poliakrilamit, politi-
ren veya polivinil'den yapılan tüpler, küreler, diskler veya mikro-
aglutinasyon plakları kullanılır. Kullanılan antijen çözünebilir bir
antijendir ve katı bir faz üzerine adsorbe edilerek çözünmez hale
dönüştürülür.

Kaplama ve yıkama sırasında kullanılan çözelti ve tamponlara
eklenen Tween-20 özgül olmayan maddelerin reaksiyonlara katıl-
masını önler.

Tüplerin kaplanmasında kullanılacak antijen çözeltisinin kon-
santrasyonu mikroorganizmaya göre farklılık gösterir. Yüksek kon-
santrasyon prozon olayına yol açarken, düşük konsantrasyon anti-
kor düzeyinin aslından daha az olarak saptanmasına neden olur.

Substrat olarak renksiz, ancak reaksiyona girip parçalanınca
renklenen maddeler seçilir. Alkalen fosfataz enzimi için P-nitro
fenil fosfat, *peroksidaz enzimi* için H₂O₂'li diaminobenzidin, *5-ami-
nosalisalik asit* veya *ortofenil endiamin* gibi duyarlı ancak, kulla-
nan kişiler için mutajenik etkileri olan substratlardan yararlanılır.

İndirekt Yöntem

— Antij plaklara (katı faz) adsorbe edilir. Bunun için plakla-
ra konan antijen + 4°C'de bir gece veya 37°C'de 2-2.5 saat (plağın
üzeri kapatılarak nemli bir ortamda) inkube edilir.

— Plaktaki çukurların herbiri 3 defa PBS-Tween 20 (% 0.05
Tween 20 içeren PBS) ile yıkanır, kurutulur. (Bağlanmayan antijen-
ler uzaklaştırılır.)

— Plağın ilk sırasına test edilecek serumlar konur ve aşağıya
doğru dilue edilir.

— Plak aynı koşullarda 30 dak. inkube edilir. Bu aşamada an-
tikor özgül olarak antijere bağlanır.

— İnkubasyondan sonra çukurların herbiri 3'er kez PBS-
Tween 20 ile yıkanır ve kurutulur.

— Oluşan antijen-antikor komplekslerinin tesbiti için enzim
ile bağlanmış antiglöbulin (konjugate) ilave edilir.

- 30 dak. 37°C'de 3. kez inkubasyona bırakılır.
- 3 defa PBS-Tween 20 ile yıkanıp kurutulur.
- Enzime uygun enzim substratı ilave edilir.

— Oda sıcaklığında 45 dak. bekletilir ve antijen-antikor-anti-globulin kompleksi tesbit edilebilir ve ölçülebilir. Sisteme yapışmış enzim substratı parçalayacağından substrat tüpte renklenmenin gelişmesine neden olur. Renk değişiminin şiddeti substratın antiglobulin ile bağlanma oranına yani serumda bulunan antikör miktarlarının oranına bağlıdır. Oluşan renk gözle görülebildiği gibi spektrofotometre ile de saptanabilir. Renk oluşumunu durdurmak için her çukura 5 M H₂SO₄'den 100ul ilave etmek yeterlidir.

Direkt Yöntem

İndirekt yöntemin bir modifikasyonu olup antikör katı faza adsorbe edilir ve antijen aranır.

- Antikör katı faza adsorbe edilir.
- Plak yıkanır, kurutulur.
- Antijen ilave edilir ve 30 dak. 37°C'de inkube edilir.
- Antijene özgül enzimle işaretlenmiş antikör ilave edilir, inkubasyona bırakılır.
- İlave edilen substrat işaretli antikörün enzimi ile reaksiyona girer ve işaretli enzimi ile özgül olarak reaksiyon verir.

Bu testte renk reaksiyonunun şiddeti bağlanan antijenin miktarı ile direkt ilişkilidir.

ELFA (Enzym linked fluorescence assay)

1979 yılında Rotovirus'lar ile çalışan bir grup araştırmacı ELISA yönteminden yaklaşık 100 kez daha duyarlı olan ELFA yöntemini geliştirmişlerdir. Yöntemin esası, ELISA yöntemine benzer. Ancak substrat olarak enzimi ile reaksiyona girince flouresans veren 4-metil umbelli fenil fosfat (MUB), 3-0-metil flourescein fosfat, flavan-difosfat tiamonyum gibi maddelerin kullanıldığı bu yöntemde sonuçlar fluoraklorimetre ile değerlendirilir.

FA (Fluorescence Antikor, IMMUNOFLOURESANS)

Primer bağlanmada işaretleme amacıyla kullanılan flouresan boyalar içinde en önemlisi *fluorescein isothiocyane* (FITC)'dir. Bu sarı renkli bir boya olup Ig'lerin aktivitelerini etkilemeden birleşebilir. Boya maddesi görülmeyen UV veya 290 μm ve 145 μm 'de mavi ışıkla uyarıldığında yaklaşık 525 μm 'de görülebilir yeşil ışık oluşturur.

Bu teknik ile doku ve hücrelerin yüzeyinde ve içinde bulunan antijenler tanımlanabilir, bakteri ve viruslar identifiye edilebilir, serumda bulunan antikorların varlığı ortaya konabilir. Testin uygulanmasında genelde 2 yol vardır.

1 — Direkt Yöntem

Fluorescen boya ile işaretlenmiş bakteri veya virus antijenleri gibi özgül bir antijene karşı oluşmuş antikorların varlığını belirlemek amacıyla kullanılır. Antijen temiz bir lam üzerine fikse edilir. Üzerine işaretlenmiş antiserum ilave edilir. Yıkılarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılır. Kurutulur ve UV ışık kaynaklı bir mikroskopta koyu bir zemin üzerinde incelenir. Antijen ve antikor homolog olduğunda, antikor antijene yapışır ve bu bölgelerde floresan görülür.

Bu yöntemle daha çok bilinen bir bağışık seruma uygun antijenler aranır.

METOT :

— Doku parçaları (antijenik yapılar) soğuk etalende veya asetonda 5-10 dak. fikse edilir.

— pH 7.2 olan fosfat buffer ile 5-10 dak. yıkanır. Preparat kurutulur.

— Preparat üzerine 1-2 damla konjugat konur. (Bu şekilde -70°C 'de uzun bir süre saklanabilir.)

— 37°C 'de 30 dak. veya oda sıcaklığında 1 saat inkube edilir. Bu süre içinde konjugate kurumamalıdır.

— Birleşmeyen konjugatı uzaklaştırmak için preparat PBS ile yıkanır.

— Sonra da gliserol buffer ile yıkanır. (9 kısım fluorecens olmayan gliserol + 1 kısım PBS)

— Preparat fluorecence mikroskopla UV ışığında incelenir. Lam 1-2 gün + 4°C'de saklanabilir.

2 — İndirekt Yöntem :

İki safhada gerçekleşir.

I. Basamak : Mikroskobik preparatlar önce işaretlenmemiş antiserum ile örtülür. Antikor Fab ucu ile homolog antijenik determinanta bağlanır ve görülmeyen bir antijen-antikor kompleksi oluşturur.

II. Basamak : FITC ile işaretlenmiş antiglobulin serum kullanılır. Bu özgül olarak Ig'nin Fc parçasına bağlanır. Böylece fluorecens antijen-antikor, antiglobulin kompleksi oluşur. Kompleksfluorescens mikroskopta görülebilir.

METOT :

— Bilinen bir antijen lama fikse edilir.

— Bir damla şüpheli serum ilave edilir.

— Eğer antikorlar antijene homolog ise lamdaki antijeni bağlar. Fazla serum yıkanarak uzaklaştırılır.

— FITC ile işaretlenmiş antiglobulin lama konur ve antijen-antikor kompleksi ile birleşir.

— Böylece şüpheli serumda antikor varsa antijen fluoresans verir. Antikor yoksa IF test negatiftir.

İndirekt floresan antikor testinin direkt teknikten avantajlı yanı, antijene bağlanan her antikor molekülünün birkaç antiglobulin molekülünü kendine bağlamasıdır. Bu nedenle floresan direkt yöntem göre daha güçlü olur.

Benzer olarak, her antikor sınıfı için özgül antiglobulin serumunun kullanılmasıyla, serumda bulunan özgül antikor grubu da tespit edilebilir.

BİRİNCİL BAĞLANMADA KULLANILAN DİĞER TESTLER

Birincil bağlanma testlerinde radioizotoplar, enzimler ve floresan boyamanın alternatifi olan diğer birkaç işaretleme yöntemi daha kullanılır. Örn.: İyon içeren bir protein olan *ferritine* bağlanmış ayıraçlar dokuda lokalize olmuş antijenlerin elektron mikroskopuyla identifikasyonu için kullanılır.

Ferritin molekülü 700.000 D molekül ağırlığında bir protein olup ferrik hidroksid veya fosfat gibi % 23 iyon içerir. İyon molekülde yoğunlaşır ve elektron mikroskopunda karakteristik elektrodens noktalar şeklinde tesbit edilebilir. Bu nedenle, eğer ferritin Ig'e bağlanırsa antijen grubu elektromikrograflar üzerinde okunabilir. Kullanılan Ig'lerin peroksidaz ile işaretlenmesi de benzer bir tekniktir.

SEKONDER BAĞLANMA TESTLERİ

İn vitro olarak uygulanan bu testler iki safhada meydana gelir.

I. Aşama : Antijen ve antikor arasındaki etkileşimdir. Bu etkileşimi sıcaklık pozitif yönde etkilerken düşük pH veya yüksek iyon gücü reaksiyonu tersine çevirebilir.

II. Aşama : Antijenin fiziksel durumu ile ilgilidir. Antikorlar uygun koşullar altında eriyebilir antijenler ile birleşirse kompleksler presipite olur. Ancak, antijenler partikular (Örn.: Bakteri, virus, eritrosit) halde ise kompleksler aglutine olurlar. Bu tip serolojik reaksiyonlara **ÇÖKELTİ VEREN REAKSİYON**'lar adı verilir. Diğer bazı reaksiyonlar da **ANTİJEN-ANTİKOR-KOMPLEMENT** birleşmesi esasına dayanır. Yani antijen ve antikor birleşmesi komplamenti aktive eder.

Tablo II : Sekonder bağlanma reaksiyonları ve rol oynayan Ig'ler.
(Benjamin Lee Gordon, D.K. Ford, 1971)

Reaksiyon tipi	Antijen	Antikor	Reaksiyonda görev alan Ig sınıfı
AGLUTİNASYON	Aglutinojen	Aglutinin	IgM, IgG, IgA, (IgE?)
PRESİPİTASYON	Presipitinojen	Presipitin	IgG, IgM, IgA, (IgE?)
KOMP. FİKSASYON	—	Komp. Fik. eden A.	IgM, IgG (Y hariç)
VİRUS NÖTRALİ.	Virus h.resep.	Nöt. eden Anti.	IgM, IgG, IgA?
ATOPIK REAK.	Allergenler	Aeagin	IgE (IgG?, IgM?)
ENZİM NÖTRALİ.	Enzimler	Anti-enzim	IgM, IgG, (IgA?)
SİTOTOKSİSİTE	Memb.antijen	Sitotok. Antik.	IgG (Y hariç), IgM
LİZİS	Memb.antijen	Lizinler	IgG (Y hariç), IgM

Çökelti veren reaksiyonlarda antijen ve antikorun birleşerek çökmesinin *Marrck-Heilderberger* tarafından ortaya konan «*lattice mekanizması*» ile olduğu bugün herkes tarafından kabul edilmiştir. *Lattice mekanizması*, antijen ve antikor düzeyi dengeli olduğunda bivalent antikorlar ile multivalent antijenlerin kafes formasyonu oluşturarak çökmesi esasına dayanır. Antikorun fazla olduğu *PRE-ZON* ve antijenin fazla olduğu *POSTZON* bölgesinde birleşme tam olmaz.

AGLUTİNASYON

Bir antijen-antikor reaksiyonu olup antikorların saptanması ve titrelere ölçülmesi amacıyla kullanılır. Partikular karakterdeki antijenler, elektrolitli ortamda uygun antijenleri ile birleşerek gözle görülebilecek büyüklükte kümeler halinde çökerler. Bu olaya *AGLUTİNASYON* denir.

Farklı immunglobulin gruplarının aglutinasyon yetenekleri de farklıdır. (Tablo-III). Bu farklılık antikorların antijen ile bağlanma güçlerinden dolayıdır. IgM'lerin aglutinasyon gücü IgG'lerden daha fazladır. Diğer bir deyimle düşük konsantrasyondaki IgM'ler ile yüksek konsantrasyondaki IgG'lerin meydana getirdiği aglutinasyon reaksiyonunun şiddeti aynıdır.

Tablo III : Sekonder bağlanma testlerinde özgül Ig'lerin rolü (Tizard, 1981)

TESTLER	IgG	IgM	IgA	IgG (T)
Aglutinasyon	+	+++	—	—
Komp. Fiksasyon (Heterolog kobay komplementi)	+	+++	—	—
Presipitasyon	+++	+	±	±
Nötralizasyon	+	++	+	+
Antijene bağlandıktan sonra görülme süresi	3-7 gün	2-5 gün	3-7 gün	3-7 gün
Reaksiyonun en yüksek noktaya ulaşma süresi	7-21 gün	5-14 gün	7-21 gün	7-21 gün

Aglutinasyon testleri genelde uygulaması basit olan testlerdir. Oldukça duyarlı olan bu testler ile 1 ml serumdaki 0.1 µgm miktardaki antikorlar saptanabilir.

Aglutinasyonun Mekanizması :

Aglutinasyon 0.15 M NaCl solusyonunda meydana gelir. Bu reaksiyonda iyon gücü önemlidir. Antijen ve antikorlar arasında yeterli oranda spesifik bağların oluşması için hücrelerin yüzeyindeki negatif yükün karşıt yükler tarafından nötralize edilmesi gerekmektedir. Bu da nötral pH'da olur. Bu nedenle antikorlar antijenler ile özgül olarak bağlanmış olsalar bile 10^{-3} M ve daha düşük tuz konsantrasyonunda aglutinasyon meydana gelmez. Ortama fazla miktarda tuz ilave edilmesi halinde ise antikorların bulunmadığı durumlarda dahi aglutinasyon olabilir. Elektrolit varlığında aglutinasyon reaksiyonunun lattice mekanizmasına göre olduğu bugün pek çok araştırmacı tarafından kabul edilen bir teoridir.

Laboratuvarlarda aglutinasyon iki şekilde yapılır.

- 1) — Yavaş tüp aglutinasyonu
- 2) — Çabuk lam aglutinasyonu

1) — Çabuk Lam Aglutinasyonu :

Bu yöntem, *PLATE test* veya *CARD test* olarak da isimlendirilir. Daha çok bir tarama testi olarak kullanılır. Serum veya kan ile uygulanan testte kullanılan antijen tüp aglutinasyonuna göre 10-50 kat daha konsantre ve boyanmıştır. Örnek: Pullorum lam aglutinasyon antijeni kristal violet, Brucella antijeni rose bengal, Mycoplasma antijeni ise metilen mavisi veya alcion mavisi, kanla yapılan çabuk lam aglutinasyon antijeni hemotoksilen eozin ile boyalıdır.

Bu test için bir lam üzerinde bir damla (0,05 ml) kan veya kan serumu eşit miktarda lam aglutinasyon antijeni ile karıştırılır. Birkaç dakika içinde kum tanesi şeklinde görülen reaksiyon pozitif olarak değerlendirilir. Negatif durumlarda ise homojen bir dağılım vardır.

2) — Yavaş Tüp Aglutinasyonu :

Metot :

— Bir seri aglutinasyon tüpü alınır ve şüpheli serum \log_2 tabanına göre 1/5, 1/10 ... şeklinde FTS ile sulandırılır.

— Her tüpe eşit miktarda belli konsantrasyonda hazırlanmış antijen ilave edilir.

— Tüpler çalkalanır. Genellikle 37°C'de 24-48 saat inkube edilir ve sonuçlar değerlendirilir.

— Pozitif tüplerde şüpheli serumdaki antikor homolog antijeni ile birleşerek yer çekimi etkisiyle tüpün dibine çöker, üst taraf pozitiflik durumuna göre kısmen veya tamamen berraklaşır. Deney tüpleri çalkalandığında ise aglutinasyon nedeniyle iri granüller halinde ortama yayılır.

Negatif durumlarda, serumda özgül antikor bulunmadığından aglutinasyon olmaz. Dolayısıyla tüpün dibinde düğme tarzında bir çöküntü görülür. Üst sıvı bulanıktır. Çalkalanma sonucu dipteki tortu ortama homojen olarak dağılır.

Ancak bazı durumlarda serumda antikor olmasına rağmen tüp aglutinasyonu olmayabilir. Bunun nedenleri :

A) — Serumda bulunan ve izotonik tuzlu su içersinde antijen ile birleşmeyen *İNKOMPLE ANTİKORLAR* ile izotonik tuzlu su içersinde homolog antijeni ile birleşebilen *KOMPLE ANTİKORLAR*'dır.

İnkomple antikorlar 3'e ayrılır.

1) — *Aglutinoidler* : (Albumin antikorları) Protein (albumin) veya büyük bir molekül (dekstran gibi) test ortamına ilave edildiğinde görülebilen bir olay meydana gelir.

2) — *Crypt antikorlar* : IgG ve IgA grubu antikorlar olup ancak, indirekt Coombs testi ile ortaya çıkarılır.

3) — *Blocking antikorlar* : Antijenik yapıları örtterek aglutinasyonu inhibe eden antikorlardır.

B) — Diğer bir neden ise *PROZON FENOMEN* olarak tanımlanır. Tüp aglutinasyonunda ilk dilusyonda reaksiyon oluşmayıp dü-

şük konsantrasyonda antikor içeren diğer tüplerde aglutinasyonun görülmesi olayıdır. Bu durum, serumda aglutininlerin bulunması yanında daha düşük konsantrasyonda blocking antikorların bulunması ve sulandırma ile bu antikorların reaksiyonu engelleyici etkilerinin ortadan kalkması şeklinde açıklanabilir.

Serumun uzun süre saklanması, serumun kontamine olması, ayrıca antijenin fenol yerine formalinle hazırlanması prozon fenomenini arttırır. Bunu önlemek için serumun 1/80 - 1/160 sulandırmaları kullanılmalı, taze serum 56°C'de 30 dak. bekletilmelidir.

Bazen de infekte olmayan sürülerden alınan serumların bazılarında düşük düzeyde non spesifik aglutininler ile koaglutininlerden ileri gelen aglutinasyon reaksiyonu görülür. Serumun bu özelliği 65°C'de 10-15 dak. inaktive edilerek veya asitlendirilmiş plate test antijeni (pH = 4) kullanılarak önlenir.

Hemolizli serumla yapılan tüp aglutinasyon testlerinde antijen ve sulandırma sıvısında bulunan fenol, serum içinde serbest haldeki hemoglobinin ile presipite olup çöker. Yalancı bir aglutinasyon reaksiyonu ile sonucu yanıltabilir. Bu durumda ring test uygulanır.

Aglütinojen Brucella aşısı ile aşılama sonucu ilk oluşan IgM grubu antikorlar ile infeksiyon sonucu meydana gelen IgG grubu antikorlar aglutinasyon testinde pozitif reaksiyon görülmesine neden olur. Bu nedenle hayvanın aşı olup olmadığını belirlemek IgM grubu antikorları ekarte etmek ve gerçek infeksiyonu ortaya çıkarmak gerekir. Bunun için çeşitli mekanik (santrifüj, blocking test, inaktivasyon, coobs test) ve kimyasal (merkaptotanol, rivanol, tripsin) olarak modifiye aglutinasyon testleri uygulanır.

1) — Merkaptotanol aglutinasyon testi :

Normal tüp aglutinasyonu uygulanır ve test tüplerinin hepsine eşit miktarda merkaptotanol solusyonundan damlatılır. Tüpler çalkalanarak 37°C'de 24 saat inkube edilir. Sonuç aynen tüp aglutinasyonunda olduğu gibi değerlendirilir.

2) — Rivanol aglutinasyon testi :

% 0.4'lük rivanol, 1 kısım serum + 3 kısım rivanol olarak karıştırılır ve 15 dak. oda sıcaklığında bekletilir. 2000 rpm de 10-15 dak. santrifüj edilir. Üstteki berrak kısım alınarak normal aglutinasyon testi uygulanır.

3) — Tripsinle aglutinasyon testi :

Aglutinasyon yapıldıktan sonra tüplere % 2'lik tripsinden 1'er damla konarak karıştırılır. 37°C'de inkube edilir ve sonuçlar okunur.

4) — Blocking test :

Aglutinasyon testi yapıp inkube edildikten sonra negatif olan test tüplerine 1'er damla yüksek titreli pozitif serum konur ve tekrar inkube edilir. Eğer serumda inkomple antikorlar varsa daha önce antijen inkomple antikorlar ile birleştiğinden pozitif serum katılması halinde dahi aglutinasyon oluşmaz. Serum negatif ise aglutinasyon meydana gelir.

5) — Coombs (Antiglobulin) test :

1940 yılında Coombs ve arkadaşları tarafından çeşitli eritrosit antijenlerine karşı nonaglutine antikorların varlığını tesbit etmek amacıyla geliştirilmiş bir testtir. Test, tek reseptöre sahip inkomple antikorların antiglobulin serum aracılığıyla antijenle birleşerek çökmesi esasına dayanır. Testte şüpheli serum ve globulinden başka her hayvan türü için özel bir antiglobulin serum gerekir.

Serum aglutinasyonu yapıp inkube edildikten sonra aglutinasyon tüpleri 3 defa 2000 rpm'de 10'ar dak. santrifüj edilerek yıkanır. Sonra da bütün tüpler FTS ile 1 ml'ye tamamlanır, çalkalanır ve her tüpe bilinen antigammaglobulin ilave edilerek tekrar inkube edilir.

Coombs testinin iki ayrı modifikasyonu olup kliniklerde çok anti Rh antikorlarının ortaya konulmasında kullanılmaktadır.

Direkt COOMBS Testi :

Antikoagülanlı kandan elde edilen eritrositler antikorlar ile test edilmiş özgül C₃ veya IgG antikorlarına karşı keçi veya tavşanda hazırlanmış antiserum ile reaksiyona sokulur. Yüzeylerinde C₃ veya IgG içeren hücreler 2 dak. içinde aglutine olurlar. Genellikle % 2 (4 x 10⁸ hücre/ml) eritrosit süspansiyonu kullanılır. Antiserum (coombs serum) 1/2 veya 1/4 sulandırılır. Aglutinasyon derecesi mikroskopta veya büyütec ile belirlenir.

İndirekt COOMBS Testi :

Bu testte hasta serumunda eritrositlere karşı oluşmuş antikorların vericinin eritrositleri ile birleşmiş kan gruplarının bulunduğu saptanabilir. Örnek: Rh (+) bir çocuğu gebe Rh (—) bir annenin serumunda oluşan bloke edici anti Rh antikorları ortaya çıkarılabilir.

% 2'lik O Rh (+) eritrositler şüpheli (annenin) anti Rh içeren serumla karıştırılır. 30 dak. 37°C'de bekletilir. Aglutinasyonun olması halinde sonuç pozitif olarak değerlendirilir. Ancak aglutinasyonun olmaması halinde sonucu negatif olarak değerlendirmek hatalıdır. Bu durumda eritrositler 3 defa FTS ile yıkanarak üzerlerine 1'er damla coombs serumu damlatılır. 1-2 dak. içinde aglutinasyonun olması serumda bloke edici antikorların varlığını kanıtlar.

Süt Serumu ile Aglutinasyon :

Taze sütün kazeini çöktürülerek elde edilen serum hem yavaş tüp aglutinasyonunda ve hem de çabuk lam aglutinasyonunda kullanılabilir. Kolostrum ve ekşi sütler test için kullanılmalıdır.

Vaginal Mucus ile Aglutinasyon :

Vaginal mucus ile aynen kan serumundaki gibi tüp aglutinasyonu yapılabilir.

Seminal Plazma ile Aglutinasyon :

Sperma santrifüj edildikten sonra elde edilen seminal plazma ile tüp aglutinasyon testi uygulanabilir.

Klinik İmmunolojide hastalık tanısı amacıyla aglutinasyona dayalı : Gruber Widal (Salmonellozis için)

Wright deneyi (Brusellosis için)

Weil-Felix (Ricketziya)

Aglutinasyon lizis (Leptosirozis)

Soğuk aglutinasyon (Bazı infeksiyöz hastalıklarda
Örn.: Primer atipik pnömoni)

Ring Test :

Brucellosis'in tanısı amacıyla sütle yapılan bir test olup hemotoksilen eozin ve triphenyl tetrazolium ile boyanmış ring test antijeni kullanılır. Yağı alınmamış ve bozulmamış süt örneğinden bir tüpe alınır ve her ml süte 1 damla test antijeninden konarak karıştırılır. 37°C'de 1.5-2 saat veya oda sıcaklığında 3 saat inkube edilir. Pozitif olaylarda, tüpün üzerinde yağ zerrecelerinde bulunan aglutininler ile birleşen antijenler (aglutinojen) test tüpünün yüzeyinde kırmızı renkli bir halka oluşturur.

İmmunolojide humoral bağışıklığın ölçülmesinde ve sekonder bağlanma reaksiyonlarında aglutinasyon esasına dayanan eritrositlerin yer aldığı bazı testler de kullanılmaktadır.

HEMAGLUTINASYON :

Bazı mikroorganizmaların (Newcastle,Çiçek, Reo virus, Togo virusların çoğu, enterobakterilerin bazıları) eritrositleri aglutine etme özelliği vardır. İşte mikroorganizmaların bu özelliğine dayanılarak teşhis amacıyla HA testleri kullanılmaktadır.

HA testlerinin mekanizması tam olarak açıklanamamış olmasına rağmen HA özelliği olan mikroorganizmaların duyarlı eritrositlerin yüzeyine yapışma eğilimleri olduğu bilinir. Elektron mikroskopik çalışmalar ile HA yeteneği olan virusların yüzeylerinde bir emzim fonksiyonuna sahip kısa, çivi benzeri onganellerin olduğu görülmüş ve yüksek derecede özgül olan bölgelere etkili oldukları saptanmıştır. Eritrositlerin yüzeyindeki bu bölgeler mukopolisakkarid içerirler. HA sırasında çok sayıda virus partikülleri duyarlı eritrositlerin yüzeylerine etki eder ve virus iki eritrosit arasında olacak şekilde bağlanır, aglutine olarak dibe çöker. HA testi pH 5 — 9 arasında çalışır.

HA testinde fazla miktarda virus kullanılmış veya virusların kan hücreleri üzerindeki etki süreleri uzatılmışsa aglutine olan eritrositler virus partikülleri tarafından serbest bırakılır ve eritrositler tekrar hemaglutine olmazlar. Çünkü hücre yüzeyindeki reseptör grupları enzim aktivitesi ile parçalanırlar.

HA iki şekilde uygulanır.

1) — Çabuk lam HA :

Lam üzerine 1 damla % 2'lik eritrosit ve 1 damla antijen (örn.: virus) konur. Nokta şeklindeki kümeleşmeler pozitif olarak değerlendirilir.

2) — Yavaş tüp HA Testi :

Bakteriyel ve viral HA için aynı metod uygulanır. Buna göre :

— İncelenecek antijen 1/2, 1/4 ... olarak sulandırılır.

— Üzerlerine eşit miktarda % 2'lik eritrosit konur.

— Oda sıcaklığında 30-45 dak. inkube edilir.

— Pozitif reaksiyonlarda dipte dantela şeklinde bir tortu görülür. Pozitif olan en son sulandırma HA birimi olarak kabul edilir.

Bu test virusların HA birimini saptamak, bakteri virus izolasyon ve identifikasyonu için kullanılır.

PASİF (indirekt) HEMAGLUTİNASYON

Memeli veya kanatlı hayvanların eritrositleri ya da sentetik (polistiren, lateks) parçacıklar çeşitli yöntemlerle (basitçe antijen ile karıştırılarak veya tannik asit ile muamele edilerek) antijenler tarafından kaplanabilirler. Antijenle kaplanarak duyarlılaşan eritrosit veya parçacıklar özgül antikor ile karıştırıldığında aglutine olurlar.

Bugün pasif (indirekt) HA yöntemi birçok bakteri ve virus antijenleri ile duyarlı hale getirilen eritrositler kullanılarak hastalık teşhisi amacıyla hasta kanında antikor aranması için kullanılır.

TERS PASİF HEMAGLUTİNASYON :

Eritrositler antikorlarla kaplanırlar. Antikorlar Fc kısımları ile bağlanırlar. Bu duyarlı eritrositler taşıdıkları antikora uygun antijenlerle karşılaştıklarında antikorların Fab uçlarına bağlanarak aglutine olurlar.

HEMAGLUTİNASYON İNHİBSİYON (HI) :

Hemaglutinasyon, HA yapan organizmaya karşı meydana gelen antikorlar tarafından özgül olarak inhibe edilebilirler. Bu reaksiyona HI denir. HI testi, bu özelliğe sahip mikroorganizmaların identifikasyonu ve serumda bulunan antikorun titresinin ölçülmesi amacıyla kullanılır.

Hemaglutinasyon inhibisyon için iki yöntem vardır.

-METODU :

- Serum F.T.S. ile iki katlı olarak sulandırılır.
- Her tüpe eşit miktarda HA ünitesi bilinen ve 8 HA veya 4 HA olarak sulandırılmış virustan ilave edilir.
- 30 dak. oda sıcaklığında inkube edilir.
- Her tüpe eşit miktarda % 2 sulandırılmış eritrosit konur. 30-45 dak. oda sıcaklığında bekletilir.
- Düşme tarzındaki çöküntü pozitif olarak değerlendirilir ve en son pozitif olan sulandırma HI titresini olarak kabul edilir. (Sonuç virusun sulandırma oranına göre hesaplanır.)

β-METOTU :

HI antikor düzeyinin belirlenmesinde kullanılan değişik bir metottur. HA aktivitesi bilinen virus süspansiyonu iki katlı olarak sulandırılır ve bilinen miktarda antiserum ilave edilir. Bu teknik laboratuvarında fazla sayıda serum örneğinin test edilme zorunluluğu olduğu durumlarda başarı ile kullanılır. Bu testte sadece virusun bir dilüsyonu kullanılır ve her serum için seri dilüsyonların yapılmasına gerek yoktur. Normal ve şüpheli serumda bulunan virusun HA titrelerinin karşılaştırılmasıyla test edilen serumun inhibisyon gücü hakkında sonuca varılır.

Reaksiyon şu şekilde meydana gelir :

Şüpheli serumda antikor bulunması halinde I. inkübasyondan sonra virus (antijen) ve antikor birleşir. Daha sonra ilave edilen eritrositlerin antijenle birleşmesi önlenir ve eritrositler yerçekimi etkisiyle düşme tarzında çökerler. Antikorun bulunmadığı hallerde

ise reaksiyon tersine işler. Eritrosit ilk dilusyonundan itibaren antijen ile birleşir ve aglutine olur. Bu sonuç negatif olarak değerlendirilir.

HI testi doku kültürlerinde de yapılabilir. Virusların üretildiği doku kültürlerine özgül antikor içeren bağışık serum ilave edilir. Daha sonra ortama eritrosit eklendiğinde viruslara bağlanamaz. Eritrositlerin viruslar ile bağlanması özgül antikorlar tarafından önlenir.

Bu test, serolojik bir reaksiyon olarak viral hastalıkların (HA özelliği olan) tanısında kullanılır.

HEMADSORBSİYON :

SPE ouşturmayan virusları saptamak amacıyla kullanılan direk bir testtir. Viruslar ile eritrositler direk olarak karşı karşıya getirilir.

Virus doku kültüründe üretilir. İnkubasyondan sonra kültüre virusun üretildiği canlıya ait % 0.5'lik eritrosit solusyonundan konur. Eğer doku kültüründe SPE oluşturmayan virus varsa eritrositlerin kümeler oluşturduğu makroskopik olarak saptanabilir.

PRESİPİTASYON :

Eriyebilir durumdaki antijenlerin elektrolitli ortamda özgül olarak antikorlarla birleşerek çökmesi şeklindeki immunolojik reaksiyonlara PRESİPİTASYON denir. Presipitasyonun mekanizması ile ilgili pekçok teori ortaya atılmıştır. Ancak, bugün geçerli olan teoriye göre elektriksel yüklere bağlı olarak etkileşen bivalan antikorlar ile multivalan antijenlerin birleşerek çökmesi şeklinde olmaktadır. Buna LATTİCE TEORİSİ denir.

Lattice Teorisi :

Çöktürme reaksiyonlarında antijen veya antikorum fazla olması halinde az çöküntü oluşur. Bu şu şekilde açıklanabilir:

Genellikle bivalan olan antikorlar fazla olduğunda multivalan olan antijen molekülünü kaplar, diğer antijen-antikor kompleksleri ile bağlanmasını önler. Dolayısıyla az bir presipitasyon oluşur. Antijenin fazla olması halinde antikor molekülü antijen ile bağlanır.

Ancak bağlanma az olduğundan yine presipitasyon azdır. Oysa, antijen ve antikorun optimal oranlarda karışması ile oluşacak reaksiyonda bağlanma fazla olur ve lattice formasyonu meydana gelir, presipitasyon oluşur.

Bu mekanizma ile oluşabilecek presipitasyon reaksiyon özelliğini IgG ve IgM'lerin çok az olarak da IgA'ların gösterdiği sanılmaktadır.

Bu esasa dayanan reaksiyonlar sıvı, katı ve yarı katı ortamlarda uygulanır. Bu amaçla günümüze kadar çeşitli teknikler geliştirilmiştir.

1 — Sıvı Ortamda Presipitasyon :

Anthrax teşhisinde kullanılan *As Coli* (halka deneyi) testi örnek olarak verilebilir. Bu test kantitatif bir testtir. Kapıllar bir tüp içine eşit miktarda bağışık serum ve antijen solusyonu iki tabaka karışmayacak şekilde konur. Kısa bir inkubasyondan (30-45 dak.) sonra antijen ve antikor arasında oluşan mat-beyaz presipitasyon halkası pozitif olarak değerlendirilir.

2 — Tüpte Sulandırma :

Bir seri tüp alınır. Tüplere belli miktarda antikor (presipitin) ve üzerine de değişen miktarlarda presipitinojen ilave edilir. Test tüpleri önce 37°C'de sonra da soğukta inkube edilir. Antijen ve antikorun homolog olduğu durumlarda ilk tüpten başlayarak kademeli olarak artan ve bir tüpte en yüksek dereceye ulaştıktan sonra azalarak kaybolan bir bulanıklık oluşur. Bulanıklığın en fazla olduğu tüpte antijen ve antikor miktarı optimaldir. Bu noktada antijen ve antikorun tümü birleşerek presipitasyon meydana getirir.

3 — Jel Presipitasyon Yöntemi :

Katı veya yarı katı ortamda uygulanan presipitasyon reaksiyonuna JEL PRESİPİTASYON denir. Bu yöntemde homolog antijen ve antikorların agar içinde difüz olmaları ve karşılaştıkları yerde presipitasyon bandı oluşturmaları esastır. Agarda presipitasyon testinin çeşitli modifikasyonları olmasına rağmen genel olarak 3 temel yöntem vardır.

I) — BASİT DİFÜZYON Yöntemi :

Tek Yönlü Basit Difüzyon :

Fransız *Ouidin* tarafından geliştirilmiş olan bu yöntem *OUIDİN TÛP* yöntemi denir. Antiserum veya antijen içeren agar tüpe konur. Donduktan sonra üzerine antijen tabaka halinde ilave edilir. Oda derecesinde bir süre inkübe edilir. Agar içine difüz olan antijen, homolog antikoru ile karşılaştığı yerde bir çökelti oluşur ve mat-beyaz bir bant meydana gelir.

Bazen de agar içine antijen katılır ve antikorun difüz olması sağlanır.

Çift Yönlü Basit Difüzyon :

Bağışık serum karıştırılmış agar petri kutusuna 3-4 mm kalınlığında dökülür. Agar üzerine çukurlar açılır. Bu çukurlara antijen konur ve difüz olması için bir süre inkübe edilir. Pozitif reaksiyonda antijen ve antikorun karşılaştığı yerde presipitasyon çizgisi meydana gelir.

II) — ÇİFT DİFÜZYON Yöntemi :

Oakleyl ve *Fulthrop* tarafından *Ouidin*'in çift yönlü basit difüzyon yöntemi geliştirilerek elde edilmiş bu test, tüp, petri ve lam üzerinde uygulanabilir. Antiserum içeren agar (% 0.3'lük agar) tüplere alınır. Üzerine agaroz ve daha sonra da belli miktarlarda antijen konur. Karşılıklı difüzyon ile agar içinde antijen ve antikorun karşılaştığı noktada çökerek oluşturduğu beyaz bandın gözlenmesi pozitif olarak değerlendirilir.

İki Yönde Çift Difüzyon Yöntemi :

İsveçli araştırmacı *Ouchterlony* tarafından geliştirilmiş bu tekniğe petrilere konan agar üzerinde açılan deliklere (ortaya antijen çevreye antikor veya tersi olacak şekilde) antijen veya antikor konur. Karşılıklı difüzyon ile birleştikleri optimal noktada presipitasyon çizgisi oluşur.

Metot :

— % 1-1.5'lük agar veya agaroz 120°C'de 20 dak. steril edilir.

— Ağardan 9 cm'lik petrilere 15 ml, 5 cm'lik petrilere 5 ml konur.

— Jelöz üzerinde 5-6 mm çaplarında 8-10 mm aralıkla delikler açılır. Delikler, ortada bir diğeri çevrede olacak şekilde yerleştirilir.

— Delikler açıldıktan sonra alta bir damla agar konur. Deliklerin yüksekliği 1 cm'den daha az olmamalıdır.

— Amaca uygun olarak ya ortaya antijen çevreye sulandırılmış serumlar veya ortaya antikor çevreye antijen konur.

— Petriler 1-5 gün süreyle nemli ortamda +4°C, -25°C, -35°C de inkube edilir.

— İnkubasyondan sonra oluşacak presipitasyon çizgileri değerlendirilir.

Nonspesifik presipitasyon çizgilerini ayırabilmek için kontrollü çalışmanın önemi büyüktür.

Bitişik çukurlarda presipitasyon reaksiyonunun başlaması iki antijen arasındaki immunolojik ilişkiye bağlanabilir. İlişkili olmayan antijenler arasında kros reaksiyon sonucu çizgiler oluşabilir. Birleşmiş çizgiler, kullanılan antiserumun benzerliği ile ilgilidir. Örn.: Dinitrobenzen haptene karşı elde edilen saf antikorlar, dinitrobenzen-ovalbumin ve dinitrobenzen serum albumin birleşiminin yanyana çukurlarda bulunması halinde birleşik çizgiler meydana gelir.

SINGLE RADIAL İMMUNDİFÜZYON :

Mancini, Carbonova ve Heremans tarafından geliştirilen bu teknikte uygun miktarlarda dilue edilmiş antiserum içeren agar üzerindeki bir delikte bulunan yüksek konsantrasyondaki antijen difüz olduğunda eriyebilir kompleksler oluşturur. Bu şekilde özgül olarak antiserum ile antijenin agar içinde etkileşimi ile çukurun çevresinde optimal oranda halka şeklinde presipitasyon zonu meydana gelir. Bu halka çukura konan antijen (veya antikor) miktarı ile direk ilişkilidir. Yani antijenin (veya antikorun) konsantrasyonu arttıkça presipitasyon halkasının çapı da büyür. Ters çevrilmiş, yani antijenli agarın kullanıldığı radial immun difüzyon testi de kullanılır.

Konsantrasyonları bilinen standart antijen veya antikorlar kullanılarak bilinmeyen reaktifin miktarı meydana gelen presipitasyon halkasının çapına bağlı olarak saptanır. Sonuçlardan emin olmak için yüksek özgüllükte antiserum kullanılmasının önemi vardır. Ancak serum örneklerindeki Ig yüksek konsantrasyonda ise sonucu değerlendirmek için inkubasyon süresini uzatmak gerekir. Örn.: IgG ve IgA için 48 saat; IgM için 72 saat.

İMMUN ELEKTROFOREZİS :

Çift yönlü immün difüzyon tekniklerinde her antijen-antikor reaksiyonu için ayrı bir presipitasyon çizgisi meydana gelir. Ancak, çok kompleks olan materyaldaki bütün komponentleri ayırmak zor olabilir. Bu nedenle immundifüzyon üzerine elektroforezisin uygulanması ile antijen karışımının ayrılması yoluna gidilerek 1926 yılında *Laurell* tarafından İMMUNELEKTROFOREZİS olarak bilinen bir teknik geliştirilmiştir. Bu teknik, antijen ve antikorların elektroforezisi ile yarı şeffaf Jelözde presipitasyon verme esasına dayanır. Genellikle vücut sıvılarındaki proteinleri tanımlama için kullanılır.

Serum jelde elektroforeze edildiğinde bazı antikorlar agar içindeki bufferin hareketi ile katoda doğru giderler (*Elektroendosmosis*). Ancak antijen kuvvetli olarak negatif yüklüyse anoda hareket eder. Bununla birlikte antijen ve antikorun agaradaki hareketleri çukurların uygun düzenlenmesi ile mümkündür. Birkaç dakika içinde hareket yönünde presipitasyon çizgilerinin oluşması ile sonuçlanan teknik *COUNTER-İMMUNOELEKTROFOREZİS* olarak bilinir ve bazı viral hastalık etkenleri ile Mycoplasma türlerinin tanımlanmasında kullanılır.

Metod :

- Cam plakları pH = 8.2 olan % 2'lik jelöz dökülür.
- Jelözle açılan çukura incelenen çözelti konur.
- Jelözden elektrik akımı geçirilir. Akım nedeniyle çözelti belli bir yere kadar hareket eder. Eğer incelenen çözelti antijen ise özgün bağışık serum (tersi de olabilir) elektroforez dağılımının ek-

senine dikey doğrultuda agar jeline difuz olması sağlanır. Bunun için agar jelinde elektroforez dağılımının yoluna paralel bir oluk açılıp oluğa bağışık serum konur. Agarda difuz olan antikorlar elektroforez ile önceden ayrılan antijenlerle birleşir ve presipitasyon zonları oluştururlar.

ROKET İMMUNELEKTROFOREZİS :

Test edilecek serumun 1/10 veya 1/20 dilüsyonları yapılır. Özgül antiserum % 1'lik agar ile 1/2 oranında karıştırılır. 2µl veya 2.5 mm kalınlığında bir tabaka halinde lama yayılır. Lam antijen ve antikorun oranına bağlı olarak presipitasyon çizgisi oluşana kadar elektroforezise tabi tutulur. (7-8 cm ile 3-5 saat). Elektroforezisten sonra lam yıkanır ve diğer elektroforetik yayımlara benzer bir şekilde lekeler meydana gelir. Presipite olmayan proteinler yıkandıktan sonra presipitat lekeler kalır. Bu teknikte Ig'ler her iki kutba da göç ederler. Ancak, çoğu agarın merkezinde lokalize olur ve sonuçta puro veya roket benzeri presipitasyon çizgileri meydana gelir. Bu nedenle teknik ROKET ELEKTROFOREZİS olarak isimlendirilir. Puro ve roketin genişliği, serumda bulunan Ig konsantrasyonu ve zaman ile direkt orantılıdır.

Başarı ile kullanılan bu test doğruluğu açısından redial immun-difuzyondan daha güvenilirdir.

KARŞIT GİDİŞLİ İMMUNELEKTROFOREZİS :

Jel içinde iki yönlü difüzyon temeline dayalı bir yöntemdir. Özellikle bulaşıcı viral sarılıkta hepatit B yüzeyel antijenini saptamak için kullanılır.

Cam plaklar üzerine pH 8.2 dietilbarbiturat-asetat eriyiğiyle hazırlanmış % 1'lik agaroz konur. Yanyana 2 mm çapında ve 3 mm uzunlukta iki çukur açılır. Birine şüpheli serum, diğerine antiserum konur. Şüpheli serum tarafına (—), antiserum tarafına (+) elektrod bağlanır. Elektrik akımı verildiğinde (—) yüklü serum anoda, antiserum katoda göç ederken arada karşılaşır özgül olarak birleşir ve presipite olurlar.

KOMPLEMENT FIKZASYON

Komplement omurgalıların normal serumunda bulunan ısıya dirençsiz, antikor ile ilişkisi olmayan, uygun antijen-antikor kompleksine bağlanabilen bu yolla hücrelerin erimesine neden olan bir serum komponentidir. Ayrıca değişik yollardan aktive olarak (klasik yol, alternatif yol) bir yandan organizmanın savunmasında bazen de doku incinmeleri ve bir kısım hastalıkların oluşmasında yer alan proteinlerden oluşmuştur. Normal serum globulinlerinin %10'unu oluşturur. Bu sistem C₁'den C₉'a kadar adlandırılan yaklaşık 20 farklı protein biriminden oluşur.

İşte bu özelliklere sahip olan komplementin immun komplekslere bağlanması ile bilinmeyen antijen veya antikorun saptanması KOMPLEMENT FIKZASYON TESTİ ile olmaktadır. Komplement yalnız antijen veya yalnız antikor ile birleşmez. Komplementin eritrositleri lize edilebilme yeteneği olduğundan indikatör hücreler olarak test sistemine ilave edilir.

Serumda antikor seviyesinin ölçülmesinde kullanılan en önemli test, hemolitik komplement fikzasyon testidir (KFT) ve testlerin en fazla kullanılması olup, duyarlılığı oldukça yüksektir.

Hemolitik komplement fikzasyon test prozondan az etkilenir. Gerekli ayıraçların hazırlanması ve standardizasyonu ile ilgili güçlükler ise testin en önemli dezavantajlarıdır. Ayrıca çeşitli viral hastalıkların teşhisinde yaygın olarak kullanılan bu testte saf antijen süspansiyonlarının hazırlanması da ayrı bir problemdir.

Hemolitik komplement fikzasyon testinde kullanılan bütün reaktiflerin (antijen, komplement, ambo, eritrosit) dikkatle standardize edilmiş olması gerekir. Örn.: İlave edilen komplement miktarının yeterli olması önemlidir. Aksi takdirde inkomple lizis meydana gelir. Komplement miktarı fazla olursa immun kompleks tarafından bağlanamaz ve yanlış negatif sonuç ortaya çıkar. Fazla antijen ise komplementin bağlanmasını önler.

Komplement fikzasyonunda, serumda bulunan inkomplementer aktivitenin bulunması önemli bir sorundur. Antijen olmadığı durumlarda bile komplementin fikse edilmesi şeklinde ortaya çıkar.

İnfekte edilmiş hayvanların serumunda komplementi bağlama etkisi olan immunkomplekslerin olması serumda bakteriyel kontaminantın olması ve alternatif olarak komplementin aktivasyonu nedenlerini oluşturmaktadır.

Mekanizma :

Antijen şüpheli serum ile (56°C'de inaktive edilmiş) muamele edildiğinde eğer serumda özgül antikor bulunmuyorsa antijen-antikor kompleksi oluşur. Test sistemine komplement ilave edildiğinde komplement komplekse, antikor üzerindeki spesifik bölgeden bağlanır. Bu sistem 37°C'de 30 dak. veya +4°C'de 18 saat inkübe edilir. Daha sonra % 2'lik koyun eritrositleri ve buna karşı hazırlanmış ve amboseptör olarak adlandırılan anti-tavşan serumu ilave edilir. Amboseptör bir antikor olup homolog koyun eritrositi ile antijen-antikor kompleksini oluşturur. Ortamdaki komplement testin ilk bölümünde antijen-antikor kompleksi ile bağlanmış olduğundan yani serbest halde komplement bulunmadığından testin ikinci bölümünde sisteme ilave edilen eritrositleri lize edemediğinden hemoliz meydana gelmez. Bu nedenle test ortamında bir bulanıklık ve dipte çökmüş eritrositler görülür. Bu sonuç (+) pozitif olarak değerlendirilir. Serumun en yüksek dilüsyonu titre olarak kabul edilir. Bu titrede % 50'den fazla eritrosit olmalıdır. 412 nm de spektrofotometre kullanılarak daha doğru sonuçlar elde edilir.

Eğer şüpheli serum homolog antikor içermiyorsa antijen antikor ile birleşemez, dolayısıyla da komplementi bağlayamaz. Serbest kalan komplement ise eritrosit-amboseptör ile birleşerek eritrositleri eritir ve test ortamında hemoliz görülür. Hemoliz ile açığa çıkan hemoglobinin kırmızı, berrak olarak görülür. Bu (—) negatif bir reaksiyondur.

Evcil hayvanların çeşitli türlerinde hemolitik komplement fikzasyon testi için bazı önemli faktörler ve optimal koşullar vardır. Bunlar : (Tablo-III)

- 1 — Test edilecek serum örneklerinin saklanması.
- 2 — Kullanılan duyarlı eritrositlerin konsantrasyonu.
(10⁸ h/ml)
- 3 — Amboseptörün optimal konsantrasyonu tesbit edilerek en yüksek titredeki komplement kullanılmalıdır.

- 4 — Kullanılan bufferin iletkenlik durumu ve pH'sı önemlidir.
5 — Standart sıcaklık ve süre.

Domuz serumu bazen prekomplementer aktivite gösterir ki bu komplementin ilavesiyle hemolitik aktivite oluşur.

Tablo III : Evcil hayvanların serumunda hemolitik komplemanı test için gerekli optimal koşullar (Barta, 1981)

Komp. kaynağı	Duyarlı hedef eritrositler	pH	Optimal ısı (°C)
Sığır	Kobay	7.0	37
Köpek	Koyun	7.3	37
Keçi	Kobay	8.0	37
At	Domuz	8.0	37
Kedi	Kobay	7.3	37
Koyun	Tavşan	6.5	37
Domuz	Koyun	7.3	37
Kuş	Domuz	8.0	30

Komplement fiksasyon testinde gerekli olan reaktiflerden antijen ve antiseptör ticari olarak piyasadan elde edilebildiği halde rutin çalışmalarda kullanılacak komplement genellikle kobaylardan veya diğer deneme hayvanlarından sağlanmaktadır. Bu nedenle rutin test laboratuvarlarında titrelerin belirlenmesi gerekir. İşte bu sebeple KFT yöntemini anlatmadan bu bölümde komplementin titresinin belirlenmesinde izlenecek yolu açıklama gereği duyuyorum.

Komplementin Titresinin Belirlenmesi :

Dondurularak saklanan kobay serumu çözülür ve tüpte buffer ile 1/10'dan ... 1/20'ye kadar dilüsyonları hazırlanır. Her bir dilüsyondan mikropletin ilk sırasındaki çukurlara 50 µl, B'ye 40 µl, C'ye 30 µl, D'ye 20 µl ve E'ye 10 µl konur. Komplement dilüsyonları buffer ile 50 µl'ye tamamlanır. Üzerlerine 50 µl hemolitik sistem ilave edilir. Mikroplate üzerindeki altta son iki sıra hemolitik sistem ve eritrosit kontrol için kullanılır.

	C'	C'	C'	C'	C'	C'
	1:10	1:20	1:30	1:40	1:50	1:60...
µl C'	50	50	50	50	50	50
µl NaCl	—	—	—	—	—	—
µl C'	40	40	40	40	40	40
µl NaCl	10	10	10	10	10	10
µl C'	30	30	30	30	30	30
µl NaCl	20	20	20	20	20	20
µl C'	20	20	20	20	20	20
µl NaCl	30	30	30	30	30	30
µl C'	10	10	10	10	10	10
µl NaCl	40	40	40	40	40	40
µl C'	—	—	—	—	—	—
µl NaCl	50	50	50	50	50	50
Her çukura 50 µl Hemolitik sistem						
µl C'	50	50	50	50	50	50
µl NaCl	—	—	—	—	KONTROL	—
Her çukura 50 µl koyun eritrositi (Ambo'suz)						

30 dak. 37°C ve 1-2 saat 20°'de inkübe edilir.

Bu şekilde hazırlanan mikroplate otomatik çalkalayıcıda karıştırılır ve 37°C'lik etüvde 30 dak. inkübe edildikten sonra 1-2 saat oda sıcaklığında bekletilir. Eritrosit kontrollerinde % 90 sediment bulunan çukurların % 90 hemoliz yapan sırasındaki komplement dilusyonu 1 komplement ünitesi olarak kabul edilir ve testin uygulanması sırasında bu ünitelerin 2.5 katı komplement kullanılır.

Mikro Sistemde KOMPLEMENT FİKSASYON TEST :

KFT makro ve mikro olarak uygulanır. Mikro test çok daha pratik olduğundan bu test yöntemi anlatılacaktır.

Test, mikroplateler üzerinde yapılır ve aşağıdaki gibi işaretlenir.

MİKROPLATE

	1	2	3	4	5	6	7	8	(+) Ag	(-) Ag	C	C'
A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	○										○	○
C	○										○	○
D	○										○	○
E	○										○	○
F	○										○	○
G	○										○	○
H	○										○	○

9. (+)serum kontrol ● : Hemoliz
 10. (-)serum kontrol ○ : Sedimentasyon
 11. Antijen kontrol
 12. Komplement kontrol

Testte ilk 3 çukurda hemoliz, 4. çukurda ve diğerlerinde hemoliz yoktur.

Antijen kontrol çukurlarında ise ilk ikisinde hemoliz diğer ikisinde hemoliz olmaması ve pozitif serum kontrollerinin bilinen titreyi verip vermediklerine dikkat edilir.

MODİFİYE KOMPLEMENT FİKSASYON TESTLERİ :

KFT'nin çeşitli modifikasyonları geliştirilmiştir. Örnek: Avian ankitorlar mammalian komplemanı fikse edemez. Bu olumsuzluk ya avian komplemant kullanılarak veya genel bir KFT sistemine antijene karşı komplemanı fikse eden indikatör antikor ilave edilerek yok edilir.

Eğer incelenen serum infekte kuşlardan alınmışsa antijen ile muamele edildiğinde antijen-antikor kompleksi oluşur ve sonradan ilave edilen komplemant bağlanamaz. Antikorlarla kaplanmış olan koyun eritrositleri (2. bir indikatör sistem) ilave edilirse *lisis* olur. Serum negatif ise antijen indikatör antikor ve komplemantle bağlanmaz, indikatör sistem *lize* olmaz.

Atlarda bazı komplementler, hemolitik değildir. Bu komplementin fiksasyonu immunokonglutininlerin varlığında eritrositlerin kümeleşme durumlarının derecesiyle ölçülür. İmmunokonglutininin C₃ üzerindeki antijenik determinantlara karşı direkt etkili doğal bir antikordur. Test, hemolitik komplement fiksasyon testi gibidir. Ancak, indikatör sistem antikorlarla kaplı eritrositlerden başka immunokonglutinin kaynağını da içerir. Bu test RUAM'ın tanısında kullanılır.

KFT, homolog komplement ile kobay komplementinin eklenmesi ile de modifiye edilebilir. Kobay komplementinin modifikasyonu için gerekli homolog komplement komponenti C₁₉'dur.

Komplement sadece eritrositlere değil, protozoonlara ve çekirdekli hücrelerin membranlarına da zarar verir. Hücre yüzey intijenlerine karşı oluşan antikorlar, komplement varlığında antikorlarla hedef hücrelerde meydana gelen reaksiyonlar ölçülebilir. Reaksiyon sonucu hücreler ölür. Bu yöntemde ölen hücreler, eozin veya trizan mavisi gibi bir boyanın ilavesiyle saptanır. Ölen hücreler boyanır. Canlı hücreler ise boyanamazlar. Bunun bir modifikasyonu olan *Sabin-Feldman* boya testi Tokzoplazmozisin teşhisinde kullanılır. Toxoplasma gondii, metilen mavisi ile boyanır. Antikor ve komplement varlığında protozoonların boyanma özelliği yok olur. Bu teknikle antikor titreleri de ölçülebilir.

NÖTRALİZASYON TESTLERİ :

Nötralizasyon testleri, korunma testlerinin bir modifikasyonu olup, antijenlerin biyolojik aktivitelerini in vitro olarak nötralize eden antikorların saptanması amacıyla kullanılır.

1 — TOKSİN Nötralizasyon Testi :

Bu test, bakteri toksinlerinin identifikasyonunda kullanılır. Örn.: Cl. perfringens -toksini (bir fosfolipazdır) yumurta sarısı veya serum içeren agar üzerinde üretilirse koloniler çevresinde donuk beyaz bir alan gelişir. -toksin antiserumu bu zonun oluşumunu önler. Bu reaksiyona *NAGLER REAKSİYONU* denir. Ayrıca bu toksini üreten organizmalarda bu yolla identifiye edilebilir. Benzer bir testle Stafilokokal -toksinin identifikasyonunda kullanılır ve özgül antiserum ile hemolitik aktivitenin inhibisyonu esasına dayanır.

2 — PLAK OLUŞUMUNUN İnhibisyonu :

Bu teknikler, plak oluşturan virusların doku kültürlerinde homolog antiserum ile muamele edildiğinde plak oluşumunun engellenmesi esasına dayanır. Yani antiserum virusu nötralize ederek plak oluşturmamasını engeller. Örn.: *Coli-faj T4*'e karşı hazırlanan antiserum *E.coli*'nin bu fajlar tarafından lize edilmesini önler. Çünkü antikorlar fajın kuyruğu üzerindeki reseptöre bloke olur ve bakterinin lize olmasını inhibe ederler.

a) Bu aktivite birkaç metotla saptanabilir. Plak nötralizasyon testinde monolayer tabakalanma gösteren hücre kültürü, virus ile infekte edilmeden önce virus antiserumu ile inkube edilir. Plak oluşum testinde virus ekiminden sonra $2 \times E$ arla vasatı + % 1.8 - 2 Noble agar virus üretme vasatı kullanılır. İnkübasyondan sonra plaklar sayılır. Bu yöntemde kontrol kullanılmasının önemi büyüktür. Sonuç, kontrol ile karşılaştırılarak değerlendirilir.

Diğer bir metot da monolayer tabakalı hücre kültürü antiserum içeren agar ile örtülür ve virus ikinci tabaka agar üzerine ekilir. Virusun antiserumlu agar tabakası içinde difüz olmasıyla plak oluşturan virus nötralize olur.

c) Petri kutularında doku kültürü hazırlanır. Monolayer tabaka oluştuktan sonra 4 cm çapındaki petri kutularına 100-200 PCB (plak oluşturan birim) miktarında virus ekilir. Agarlı virus üretme vasatı üzerine ($2 \times E$ arle + % 1.8 noble agar) incelenecek immun serum veya emdirilmiş filtre kâğıtlarından hazırlanmış diskler konur. Disklerin altında hücreler harap olmazsa, incelenen serumda o virusa karşı özgül antikorların varlığı ortaya çıkar. Bu diskler yerine agar üzerine delikler açılarak bu deliklere immun serum konulabilir. Deliklerin çevresinde hücrelerin üremesi immun-serumda homolog antikor olduğunu gösterir.

Bu test ile 0.00005 µg gibi çok küçük miktarlardaki antikorlar saptanabilir.

3 — VİRUS Nötralizasyon Testi :

Virus nötralizasyon testlerinin esası patojen virusların antiserum ile karşılaştıklarında nötralize olmaları ve infeksiyon oluşturma-

mamalarıdır. Virolojide bilinmeyen virusların identifikasyonu veya özgül antikorların saptanmasında yaygın olarak kullanılır. Yüksek derecede özgül veya duyarlı olduğundan güvenilir bir testtir.

Bütün nötralizasyon testlerinde titresi yani infektif gücü bilinen virusa gerek duyulur. Bu hayvanlarda LD₅₀/ml, embriyolu yurmurtada YID₅₀/ml, doku kültürlerinde DKID₅₀/ml'nin ölçülmesiyle elde edilir.

İnfektif gücü bilinen bir virus süspansiyonu kullanılarak iki metotla serumun nötralizasyon aktivitesi ölçülür.

- 1 — Virus konsantrasyonu sabit tutulup antiserum dilue edilir.
- 2 — Antiserum konsantrasyonu sabit tutulup virus sulandırılır.

Metot :

Lab.da mikro ve makronötralizasyon yöntemleri olarak uygulanır. Mikronötralizasyon testi daha az reaktif kullanılması ve aynı anda çok sayıda serumun bir mikrotitrasyon tablasında görme imkânı sağlanması bakımından daha pratiktir.

Makronötralizasyon :

Serum sulandırma ve virusu sabit tutma yöntemi :

- Şüpheli serum 1/2 1/512 şeklinde iki katlı sulandırılır.
- Her çukura 1000 DKID₅₀'i bilinen virustan eşit miktarda konur.
- 37°C'de 1 saat inkube edilir.
- Her bir sulandırmadan en az 4 adet doku kültürüne ekim yapılır.
- Doku kültürleri 37°C'de 6 gün süreyle hergün SPE yönünden kontrol edilir.
- Bu arada virus ve hücre kontrolleri kullanılır. Bunun için doku kültürlerine sadece virus veya hücre ekilir.

İlk sulandırmalarda antikor virusu çok iyi bağlandığından SPE oluşmaz. Ancak antikorun azaldığı ileri sulandırmalarda vi-

rusu tutacak antikor olmadığından SPE oluşacaktır. İnkubasyon sonunda kültürlerin % 50'sinde SPE görülen serum dilusyonu SN_{50} titresi (serum nötralizasyon) olarak kabul edilir. Negatif testlerde ilk dilusyondan itibaren SPE gözlenir.

Mikronötralizasyon :

Serum sulandırma virusu sabit tutma yöntemi :

Bu test mikrotitrasyon plaklarında yapılır. Her serum örneği için en az 2 çukur ayrılır. Bu nedenle yanyana 6 serum alt alta 8 serum olmak üzere bir plak üzerinde 48 serum test edilebilmektedir.

— Serum örnekleri 1/5 Eagle (PBS) ile sulandırılır ve plak üzerindeki çukurlara 0.05'er ml konur.

— Üzerine 1000 DKID₅₀ virustan 0.05 ml ilave edilir ve üzeri iyice kapatılarak etüvde 1 saat, oda sıcaklığında 2 saat veya + 4°C de 1 gece inkübe edilir.

İnkübasyondan sonra her çukura 300.000 h/ml olacak şekilde 0.05 ml hücre konur.

Üzeri kapatılır ve virusun üreme hızına bağlı olarak bir süre inkübe edilir. Hergün SPE yönünden plaklar incelenir. SPE'nin görülmesi heterolog bir durum olduğunu gösterir.

Bu arada hücre, virus ve serum kontrollerinin de kullanılması şarttır.

SN₅₀ için ise :

— Plaklar üzerine yanyana en az ikişer göz ayrılır.

— Birinci sıraya 1/5 sulandırılmış serum örneği konur.

— Aşağıdaki çukurlara 0.05 ml sulandırma sıvısı olarak Eagle konur ve serum birinci sıradan aşağıya doğru 0.05 ml aktarılarak 1/10, 1/20, 1/40 olarak sulandırılır.

— Üzerine önce virus eklenir. İnkübasyondan sonra da hücre ilave edilir ve etüvde bekletilir.

— En az yarısında SPE görülen serum sulandırılması SN_{50} olarak kabul edilir.

Virus nötralizasyon testi diğer in vivo ortamlarda da uygulanabilir ve in vivo olarak virus nötralizasyonu yoluyla antikorlar test edilebilir. Örn.: *Pox virus antiserumunun* embriyolu yumurtaların korioallantoik membranlarında *çiçek hastalığı* kabarcığının oluşumunu inhibe etme yetenekleri test edilebilir.

Equine encephalitis virusları da antiserum ile nötralize olma yetenekleri ile titreleri saptanabilir ve virus-antikor karışmanın intraserebral olarak farelere injeksiyonu ölümü engeller.

KORUMA TESTLERİ :

Korunma testleri yalnız in vivo olarak uygulanan nötralizasyon testleridir. Bu testler ile özgül bir antiserumun infeksiyon etkenlerine karşı organizmada oluşturduğu bağışıklık durumu ölçülebilir. Bu reaksiyon, aktif veya pasif olarak bağışık kılınmış deneme hayvanlarına patojenik mikroorganizmaların öldürücü dozda verilmesiyle uygulanır. Sonuçta bağışık olmayan hayvanlar ölür, bağışık olanlar ise canlı kalırlar.

Başka bir uygulamada farklı etkenlerle farklı infeksiyonlara tutulmuş deneme hayvanlarına şüpheli serumun belli oranlarda injekte edilmesi ile uygulanır. Deneme sonunda şüpheli serumda infeksiyon etkenlerine karşı antikor varsa injekte edilen hayvan ölmez. Bir özgüllük yoksa injekte edilen patojen etkenin aktivitesi sonucu hayvan ölür.

OPSONOSİTOFAJİK DENEY :

Fagositik hücreler bakteri, virus gibi çeşitli mikroorganizmalar ile karbon ve plastik yapıdaki parçacıkları fagosite ederler. Bazı patojenik bakterilerde bulunan kapsül formasyonu fagositozu önler. Böyle bakterilerin kapsüllerine karşı oluşmuş ve OPSONİN (Bakteriotropin) denen antikorlar, bakterilerin fagositozunu hızlandırır. Bunlar özellikle IgM grubu antikorlardır.

İşte bağışık serumlarda bulunan opsoninlerin ortaya konulmasında OPSONOSİTOFAJİK DENEY (Opsonik indeks)'den yararlanır.

Metot :

Bir tüpe normal serum, normal lökositler (sitratlı kanın sant-rifüjü ile elde edilir) ve hastalık etkeni olabilecek bakteriler, diğer tüpe ise bağışık serum (hasta serumu), normal lökositler konur. 37°C'de 20 dak. bekletilir. Tüplerden alınan örneklerle preparatlar hazırlanır, kurutulur, boyanır (May Granwald, Giemsa). Mikroskop-ta incelendiğinde lökositler tarafından fagosite olmuş bakteriler görülebilir. Her iki preparatta sayılan lökosit ve bu lökositler ta-rafından fagosite olan bakteriler arasındaki oran, *fagositoz indek-sini* verir. Bağışık serumun fagositoz indeksinin normal serumun fagositoz indeksine oranı ile *Opsonik indeks* elde edilir. Opsonik indeksin yüksek oluşu hastalığın prognozunun iyiye gittiğini gös-terir. Bu deney ile, infeksiyöz bir hastalığın geleceği kontrol edile-bilir.

ÜÇÜNCÜL TESTLER (In vivo)**PASİF DERİ ANAFLAKSİSİ :**

Normal hayvanlara antijenler intradermal injekte edildiğinde bir reaksiyon oluşmaz. Eğer injekte edilen antijene karşı IgE grubu antikorlar üretilmişse bu antikorlar derideki mast hücrelerine bağ-lanurlar ve ancak o zaman antijenin çok dilue solusyonları kullanıl-mış olsa bile antijenin intradermal injeksiyonuyla lokal bir aşırı duyarlılık reaksiyonu şekillenir. Mast hücrelerinin aktivitesi nede-niyle birkaç dakika içinde salınan vazoaktif ajanlar etkisiyle olu-şan kapillar dilatasyon sonucu eritema oluşur. Reaksiyon maks-i-mum 30 dak. içinde meydana gelir ve birkaç saat içinde sonuçlanır.

İkinci bir teknik ise özgül antijenlere karşı oluşan reagenik antikorların (IgE) teşhisi için kullanılır. Bu tekniklerden biri PRAUSNITZ-KUSTNER (P-K) testidir. Bir deri testi olup normal bir hayvana intradermal olarak test hayvanından alınan serum in-jekte edilirse 24-48 saatlik periyod sonunda antikorlar derideki mast hücrelerine bağlanır. Aynı bölgeye özgül antijen injekte edil-diğinde pozitif reaksiyon birkaç dakika içinde görülür veya farklı dilusyonlarda serum ayrı bölgelere injekte edilir (intravenöz). İn-jeksiyon bölgesinde çabuk tipte yangısal bir reaksiyonun görülmesi pozitif olarak değerlendirilir. Bu teste PASİF DERİ ANAFLAKSİ TEST (PCA) denir. PCA ile hafif deri reaksiyonlarını tesbit etmek

Bazen zor olabilir. Bunun için Evans mavisi gibi bir boya ile boyanmış antijen intravenöz olarak injekte edilerek reaksiyon görülebilir hale getirilir. Bu, normal olarak serum albuminine bağlanabilir veya bağlanamaz. Kan dolaşımından ayrılır. Vaskular permeabilitenin olduğu deri bölgesinde akut bir yangısal reaksiyon meydana gelir. Albumine bağlanmış boya o bölgedeki dokuya girebilir ve mavi bir alan oluşur. Bu bölgenin büyüklüğü yangı reaksiyonunun şiddetinin ölçümü için kullanılır.

SELULAR İMMUN CEVABIN ÖLÇÜLMESİNDE KULLANILAN TESTLER VE ÖZELLİKLERİ

Hücre sel bağışıklık, timusta gelişen ve farklılaşan T-lenfositlerinin organizmaya kazandırdığı ve belirli canlı antijenlere karşı oluşmuş bir savunmadır.

Antijenlerle temas sonucu lenfoblastik transformasyona uğrayan duyarlı T-lenfositleri aynı canlı antijenlerle tekrar temas ettiklerinde salgıladıkları lenfotoksinlerle canlı hücre ve mikropları öldürürken diğer taraftan lenfokinlerle makrofaj ve lökositlerin olay yerine gelmelerini stimüle eder. Makrofajları uyarır ve aktive olan makrofajlar fagositoz etkinliği kazanırlar.

Bu esaslar çerçevesinde son yıllarda beşeri ve veteriner hekimlikte bazı hastalıkların teşhisi amacıyla selular immün cevabı ölçülebilen bazı testler geliştirilmiştir. Gerçi bugün için veteriner hekimlikte araştırmaların ötesinde kullanılmaya alanı bulamayan tekniklerden insan hekimliğinde geniş ölçüde yararlanılmaktadır.

Bu testler 2 grup hücrenin fonksiyonları üzerine kurulmuştur.

- 1) — Fagositik hücreler
- 2) — Lenfositler

FAGOSİTLERİN FONKSİYONLARI

- 1) — **Epinefrin Stimulasyonu :**

Nötrofillerin vücuttaki hareketleri 1/1000 oranında epinefrinin subkutan injeksiyonuyla test edilir. İnjesiyondan önce ve injeksi-

yondan en geç 60 dak. sonra kapillar kan alınarak 1 saat içinde % 45'in üzerinde periferal polinükleer hücrelerin arttığı görülür.

2) — Nitroblue Tetrazolium'un Oral Yolla Alma ve Sindirme Testleri :

Aktif polimorfonüklear hücrelerin fagositozdan sonra safra purple formazana superoksid anyonuyla Nitroblue tetrazoliumun etkisi direk olarak azalır. Bu nedenle nitroblue tetrazoliumun etkisinin azalma oranı polimorfnüklear hücrelerle superoksid anyonunun meydana gelişinin bir ölçümüdür. İnsan hekimliğinde kullanılan iki modifikasyonu vardır.

1 — Spektrofotometrik ölçümlerle in vitro olarak polimorfonüklear oksidatif fonksiyonların test edilmesi.

2 — Kan dolaşımında formazan içeren hücrelerin sayımı.

3) — Anyonların Tesbiti :

Bu test, yakın zamana kadar polimorfonüklear hücre fonksiyonlarının belirlenmesi çalışmalarında başarıyla kullanılmıştır. Bu test ile polimortonüklear hücrelerin proteinlere bağlanarak anorganik anyonların çökebilien trichloracetic aside dönüşme yeteneği ölçülür.

Bu sistemde, toksik aktiviteleri işaretlenmiş bakteri, mantar ve viruslar tesbit edilebilir. Bu metot hücrelerin opsonize edilmiş zymoson, NaI ve I ile inkube edilmesinden sonra polimorfnüklear hücrelere bağlanan radio işaretlenmiş anyonların teşhisi esasına dayanır.

LENFOSİT FONKSİYON TESTLERİ

1) — Lenfosit Transformasyon Testi :

Normal immun cevap oluşturan canlılarda lenfositler spesifik ve nonspesifik mitojenlerle blastogeneze uğrayarak çoğalırlar. Oysa immun yetmezliği olan canlılarda lenfositler aynı uyarıma daha az cevap verirler. Serumdaki immunosupressif faktörler veya lenfositlerdeki bozukluklar, lenfositlerin fonksiyonlarını yapamalarına neden olurlar.

In vitro lenfosit transformasyon testi 1960 yılında geliştirilmiş, o zamandan bu yana çeşitli modifikasyonları yapılmış ve test immun yetmezliğin teşhisi ile lenfosit transformasyonu çalışmalarında kullanılmıştır.

Kimyasal allerjenler, nonspesifik ajanlar, çeşitli protein yapısındaki antijenik maddelerle duyarlılaştırılmış şahıslarda sentezlenen ve salınan aktif biyolojik komponentlerle lenfositlerin aktive olarak blast formasyonuna (daha soluk boyanan çekirdek bazofil stoplazma) dönüşümü, DNA, RNA, protein sentezindeki artış in vitro olarak gösterilebilir. Lenfositlerin in vitro transformasyonu bir lenfosit popülasyonunun duyarlılaştırma derecesi değerlendirilerek yapılır.

Lenfoblastik transformasyona neden olan ve yaygın olarak kullanılan nonspesifik mitojenler arasında *Concavalin A* (ConA: T-lenfositlerine özgüllüğü fazla olan mitojenlerden biri), *Fitohegglutin* (PHA: T-effektör hücre mitojeni), *Rokweed* (PWM: B-hücre mitojeni olan bir boya) yer alır. Bunların timidine bağlanarak optimal veya suboptimal dozlarda kullanılması tavsiye edilir.

Laboratuvarda lenfosit transformasyonunun ölçülmesinde şu parametreler kullanılır :

- a) Büyüklük artışı gibi morfolojik değişime uğrayan hücrelerin oranlarının saptanması.
- b) Hücrelerin bölünme sayıları (Mitotik indeks)
- c) İşaretlenmiş timidin (^3H timidin) kullanılarak DNA sentezinin ölçülmesi.

Yaygın olarak kullanılanı ise işaretlenmiş timidin ile DNA sentezinin ölçülmesidir ve genellikle periferik kan lenfositleri ile çalışılır.

Metot :

— Heparinle veya cam boncuklu şişede defibrine kan alınır.

— Ficoll-hypaque ile karıştırılıp santrifüj edilerek lenfositler ayrılır, sayılır ve belli sayıda lenfosit tüplere konur. Özel sıvı besi yerlerinde (% 1020 homolog veya heterolog serumlu) kültürleri hazırlanır.

— Lenfosit kültürlerine çeşitli yoğunlukta mitojenik maddeler ilave edilerek 5-7 gün % 5-10 CO₂'li ortamda inkübe edilir. Mitojen konmayan tüpler kontrol olarak bırakılır.

— Kültürlere inkübasyondan sonra ³H timidin katılır. 18 saat sonra kültür santrifüj edilerek hücre parçalanarak DNA açığa çıkarılır.

Genetik materyal, işaretlenmiş timidin içerip içermemesi yönünden incelenir. Sonuçlar, kontrollere göre değerlendirilir.

2) — Makrofaj Göçünü Önlenim Testi :

Lenfokinlerden ilk tanımlananı olan MIF, uyarılmış canlılardan elde edilen lenfositlerin in vitro kültürlerinde 6 saat içinde oluşmaya başlar, 4-5 gün sentezlenmeye devam eder. 80.000 molekül ağırlığında olan faktör 30 dak. 56°C'ye dayanıklı ancak, tripsinle inaktive olur.

MIF'nin esas etkisi, makrofajların hareketini önleyerek mikropların bulunduğu bölgeden uzaklaşmasını önlemektir. Böylece makrofajların yangısal bölgede mikroplarla daha uzun süre yakın temasta bulunarak fagositozun artması sağlanır.

Metod :

MIF'nin intradermal injeksiyonu tipik gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunun gelişmesine neden olur. Lezyonlar hızla gelişir. Böylece MIF mononükleer fagositlerin bir aktivitesi olarak lenfositler çevrede birikir ve in vivo olarak antijenik stimülasyon ile bölgede bu hücreler lokalize olur.

Önceden antijenle duyarlılaştırılmış kobayların periton eksudatı kapillar bir tüpe alınıp besi ortamı içine konursa bir süre sonra makrofajların tüpün dışına doğru hareket ederek yayıldıkları görülür. Bu negatif bir sonuçtur. Ancak, bu sıvıya homolog antijen ilave edilirse makrofajların kapillardan dışarı çıkmadığı, hareketin önlendiği görülür. Bu reaksiyon pozitif olup testte kullanılan periton eksudatında bulunan lenfositlerin sentezlediği MIF nedeniyle olmaktadır.

3) — T-Lenfositlerinin Sayım Testleri :

Periferik kan dolaşımında bulunan B- ve T- lenfositlerinin ayırımı, sayımı ve oranı hücresel bağışıklığın değerlendirilmesinde önemli bir yer tutar.

T- ve B- lenfositlerinin ayırımı için birkaç yöntem vardır. T- lenfositlerinin sayımında E-ROZET TESTİ en çok kullanılanıdır.

T- lenfositleri, heterolog olarak eritrositler için membranlarında reseptörler bulundurur. Bu reseptörler eritrositler için spesifiktir. T- lenfositleri kobay, koyun ve insan eritrositleri ile rozet formu yaparlar. Eritrositler ile kompleks oluşturarak serbest eritrositler gibi çökerler.

Pratikte uygulanan E-rozet testi koyun eritrositlerinin insan T- lenfositleri duvarına yapışması esasına dayanır.

Metot :

— 5 ml'lik tüplere 10^6 lenfosit konur.

— 10^8 koyun eritrositlerine (koyun kanı alsavar solusyonu ile alınır. PBS ile 3 kez yıkanır. Sediment koyun eritrositleridir) adsorbe edilmiş fetal dana serumunun 0.1 ml'si ilave edilir ve dikkatle karıştırılır.

— Hücre süspansiyonu 3 dak, 5000 devirde santrifüj edilerek hücreler çöktürülür. Sonra da 37°C 'de 15 dak. inkube edilir.

— Sanrifüj sırasında diğer bir 5 ml'lik test tüpüne 3 ml Ficoll, Ronpacon konur ve ficoll solusyonu santrifüj edilen tüpün üzerine karıştırmadan dikkatlice konur.

— 1700 devirde 30 dak. tekrar santrifüj edilir.

— İnterfazdaki ve en alttaki hücreler iki ayrı tüpe alınır.

— Yıkama işleminden sonra hücreler identifiye edilir. T- lenfositleri test tüpünün dibinde yer alır ve koyun eritrositlerine yapışarak oluşturdukları rozet formasyonu mikroskopta incelenir.

T lenfositleri, E- rozet testinden başka anti-T lenfositik serumlarla saptanabilir.

4) — Lenfositotoksik Test :

Bağışık lenfositlerin uygun hedef hücreler üzerine sitotoksik etkisi vardır. Bu iki şekilde olur.

a) Lenfosit doğrudan hedef hücre üzerine yapışır ve bilinmeyen bir mekanizma ile sitoliz meydana gelir.

b) Lenfositler tarafından oluşturulan ve lenfotoksin denen faktörler aracılığı ile (lenfosit yoğunluğunda dahi) hedef hücreyi eritir.

Canlı hücreler üzerine nonspesifik sitotoksik etki, aktive olmuş lenfosit kültürlerinin bulunduğu ortamda hücrelerin inkube edilmesiyle meydana gelir.

Sitotoksik hücrelerin oluşturduğu sitolizin derecesi, daha önce işaretlenmiş hedef hücrelerden ortama salınan radyoaktif kromu ölçerek veya canlı kalan hücrelerin sayılması ¹⁴C ile işaretlenmiş amino asidin hücre proteinine katılması ile saptanır.

Bu testte, etkin hedef hücreler değişik oranlarda anti-T serum ile karıştırılır. Komplement ilavesi ile spesifik hücrelerin lizisi sağlanılır. Daha sonra tripan mavisi ile yapılan boyamada canlı hücrelerin koyu mavi boyandıkları görülür.

IN VIVO TESTLER

Gecikmiş Tip Aşırı Duyarlılık Deri Testi :

Gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonlarına birçok infeksiyonlarda raslanır. Gecikmiş tip deri reaksiyonundan birçok infeksiyöz hastalığın teşhisinde yararlanılır.

Bu test için uygun antijenden deri içine 0.1 ml injekte edilir. İnjesiyondan 24-48 saat içinde injeksiyon yerinde kızarıklık, kabarıklık, sertlik şeklinde ortaya çıkar ve semptomun derecesine göre negatif, şüpheli ve pozitif olarak değerlendirilir.

Örnek: Tüberkülozda allerjik test bu şekilde uygulanır. Duyarlılığı belirlemek için sığırlarda boyun derisi içine, tavuklarda sakalın birine, insanlarda ise kola belli oranlarda deri içi olarak PPD injekte edilir. 48-72 saat sonra sığırlar için deri kalınlaşması, tavuklar için sakalda büyüme, insanlar için ise deride injeksiyon bölgesinde meydana gelen kızarıklık, sertlik ve şişliğin derecesine bağlı olarak yönetmelikler gereğince değerlendirilir.

Atlarda ruam içinde benzer bir allerjik test uygulanır. Atlarda boyun derisi içine sıvı malleinden 0.2 ml injekte edilir ve 72 saat sonra sonuç değerlendirilir. Derideki ödem, şişme, duyarlılık ve kalınlaşma yönetmeliklere göre değerlendirilir.

Deri testlerinde pozitif sonuç, canlının daha önce herhangi bir özgül antijen ile temas ettiğini, duyarlılaştığını, eğer bir infeksiyon söz konusu ise o hastalığı geçirmiş veya geçirmekte olduğunu anlamını taşır.

Allerjik testlerdeki reaksiyonun görünümü çeşitli infeksiyon allerjilerinde küçük değişmelerle birlikte benzer görünümde dir. Reaksiyon benzerlik derecesine bağlı olarak genellikle bir hafta içinde kaybolur.

Sellular immun yanıtın ölçülmesinde kullanılan bu in vitro ve in vivo testlerden başka, uyarılmış T- lenfositlerinin kültür filtratlarında bulunan ve diğer özelliklere sahip mediatörlerin aktivitelerine bağlı olarak pekçok testler geliştirilmiştir.

Bu mediatörlerden makrofajlar üzerine etkili

— Makrofaj aktivasyon faktör (MAF)

— Makrofaj kemotaktik faktör (MKF)

Polimorfnükleer lökositleri etkileyen

— Lökosit inhibitör faktör (LIF)

— Polimorfnükleer kemotaktik faktör

Ayrıca,

— Koloni uyaran faktör sayılabilir.

KAYNAKLAR

- 1 — ANON (1983) : The Complement Fixation Test in Microtiter System. An International course Workshop In Veterinary Immunology, October 5-12, Ankara.
- 2 — ANON (1983) : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) For the Detection of Antibodies. An International Course/Workshop In Veterinary Immunology, October 5-12, Ankara.
- 3 — ANON (1983) : Outline of Immunofluorescence. An International Course/Workshop In Veterinary Immunology, October 5-12, Ankara.
- 4 — ANON (1983) : Separation of B- and -lymphocytes by E-Rosetting An International Course/Workshop In Veterinary Immunology, October 5-12, Ankara.
- 5 — ARDA, M. (1985) : İmmunoloji, Cilt 1. A.Ü. Basım Evi, Ankara.
- 6 — ARDA, M, MİNBAY, A., AYDIN, N. (1982) : Özel Mikrobiyoloji. A.Ü. Basım Evi Ders Kitabı 386/284, Ankara.
- 7 — AYDIN, N. (1986) : İmmunoloji ve Seroloji. A.Ü. Vet. Fak. Teksir 86/11, Ankara.
- 8 — BARTO, O. (1981) : Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 4(2), 131-160.
- 9 — BİLGEHAN, H. (1984) : Genel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Bilgehan Basımevi, Bornova, İzmir.
- 10 — BOYD, W.C. (1966) : Fundamentals of Immunology, 4th edition, 305-385.
- 11 — CLADWELL, J.L. (1980) : Antigen-Antibody Reactions. Basic and Clinical Immunology, 3rd edition Los Altos Lange Medical.
- 12 — ÇETİN, E.T. (1981) : İmmunoloji, Fatih Gençlik Vakfı İşletmesi. Ceridehane Sok. No: 2 Cağaloğlu-İstanbul.
- 13 — EISON, H.N. (1980) : Immunology. Second Edition, Hagerstown, Harper and Row.
- 14 — FEVRIER, M. (1985) : Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 8(2): 159-170.
- 15 — GÜRTÜRK, S. (1976) : Genel Viroloji. A.Ü. Basımevi, Ankara.
- 16 — GORDON, B.L. and FORD, D.K. (1971) : Essential of Immunology, F.A. Davis Company, Philadelphia, P.A.
- 17 — GRÖHN, K. and GENIGEORGIS, C. (1985) : Adaptation of ELISA for the detection of Campy. antibodies and its application in seroepidemiological studies In sheep and cattle herds. Acta Vet. Scand. 26, 30-48.

- 18 — HUDSAN, L., HAY, F.C. (1980) : Practical Immunology. Blackwell Scientific Publications Oxford, London, Edinburgh.
- 19 — KAWANA, K., YAMANOTO, S., MINAMISHIMA, Y. (1986) : Detection of Early Hemagglutination Inhibitory Antibodies to Rubella Virus by Pretreatment of Sera with Streptococcal cells. J. of Med. Virology. 19, 101-110.
- 20 — MENGISTA, M., LARYEA, E., MILLER, A. and WALL, J.R. (1986) : Clin. Exp. Immunol. 65, 19-27.
- 21 — ROITT, I. (1974) : Essential Immunology. Second Edition. Blackwell Scientific Publication Osney Med. Oxford Eng.
- 22 — TIZARD, I. (1983) : An Introduction to Veterinary Immunology. Second Edition. W.B. Saunders Company.
- 23 — YOLKEN, R.H., STOP, P.J. (1979) : Enzyme-Linked Fluorescence assay: Ultra sensitive solid phase assay for Detection of human Rotaviruses. J. Clin. Microbiol. 10: 317.