

VET 208
İMMUNOLOJİ-SEROLOJİ DERSİ
UYGULAMA KİTAPÇIĞI



2021

Uygulamanın adı	Biyogüvenlik uygulamaları, Serolojinin tanımı, seroloji laboratuvarında kullanılan temel gereçler, biyolojik ve kimyasal maddeler, kullanım amaçları
Yapılacağı hafta	1
Uygulamanın temel hedefi	Serolojinin tanımı, seroloji laboratuvarında kullanılan temel gereçler, biyolojik ve kimyasal maddeler, kullanım amaçlarının öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

•İmmünolojinin bir alt dalı olan seroloji antijenlerle bağışıklık sistemi ürünlerinin etkileşimini invitro olarak inceler. Antijen ve antikor birleşmesi özgül bir reaksiyon olduğu için, bilinen bir antijen olduğunda örnek materyal içerisinde özgül antikor aranabilir veya bilinen bir antikor olduğunda örnek materyal içerisindeki özgül antijen değişik teknikler ile saptanabilir. Ayrıca örnek materyal içerisindeki özgül antijen veya antikor miktarları niceliksel testler kullanılarak saptanabilmektedir.

•Serolojik testlerden elde edilen sonuçlar;

- 1.Klinik tanı veya diğer laboratuvar bulguları ile tanısı konan hastalıklarda serolojik testler doğrulama amaçlı kullanılabilir.
- 2.Bir kişinin veya toplumun bağışıklık durumunu saptamak amacı ile kullanılabilir.
- 3.Hastalığın gidişi, tedavi ve/veya prognozu serolojik testlerle izlenebilir.
- 4.Etken mikroorganizmanın serogrup, serotip veya immunitipi saptanabilir.
- 5.Etken mikroorganizmanın üretilmediği veya üretmenin pratik olmadığı durumlarda etkeni tanımlamak sadece serolojik testlerle mümkündür.

•Bir enfeksiyonun tanısında önemli olan, varolan enfeksiyonu yansıtan antikorların önceden geçirilmiş enfeksiyona ilişkin antikorlardan ayırdedilmesidir. Burada ayırimda önemli olan, enfeksiyonu izleyen 2-3 hafta süresince antikor titresinin yükselip sonra yavaş yavaş düşmesidir 10-14 gün ara ile alınan iki serum örneği **antikor** titresinin yükseldiğini gösterirse yeni bir enfeksiyon söz konusudur. ilk serum örneğinin enfeksiyonun erken evresinde alınması önemlidir; tersi durumda, titre artışı atlanmış olur. Yeni enfeksiyonun tanınmasına olanak sağlayan bir başka durum enfeksiyondan sonra ilk ortaya çıkan antikorların çoğu kez IgM sınıfında olmalarıdır.

•Serolojik testlerin miktar tayininde duyarlılık bakımından ayrılıkları vardır. Örneğin basit presipitasyona bakarak agarda iki yönlü yayılma 15, bakteri aglütinasyonu ve kompleman bağlanması 300, dolaylı hemaglütinasyon 600, ELISA ve virüs nötürlenmesi 300000 kez daha hassas bildirilmiştir.

•Duyarlılık (sensitivite) : Belirli bir hastalığı olan kişilerde bir yöntemle alınan pozitif sonuçların yüzdesine o metodun duyarlılığı denir. Duyarlı bir testte yalancı negatiflik çok azdır.

•Özgüllük (spesifisite) : Sağlıklı kişilerde bir yöntem ile araştırılan hastalık bulgusunun negatif sonuç yüzdesine o yöntemin özgüllüğü denir.

•Bir testin duyarlılığı aranan hastalığı olan , özgüllüğü ise o hastalığı olmayan seçilmiş bir popülasyonda aranır.

•Antijenin tek bir determinantının antikorun tek bir yanına yani bir epitopun bir paratop'a olan birleşme ilgisine afinite denir.

•Doğal antijenlerin çoğunluğu çok valanslıdır. Antikorlarında en az iki valansı vardır. Bu şekilde çok valanslı(determinantlı) bir antijenin çok valanslı antikorlarla bağlanma gücüne avidite denir.



Uygulamanın adı	Kanın yapısı, kan alma işlemleri, serum, plazma, elde edilmesi ve kullanım alanları
Yapılacağı hafta	2
Uygulamanın temel hedefi	Kanın yapısı, kan alma işlemleri, serum, plazma, elde edilmesi ve kullanım alanlarının öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

SERUM: Pıhtılaşmaya terk edilen kanda (antikoagulanlı) pıhtının sıkışması sonucu pıhtıdan ayrılan beyaz-sarı renkli sıvıya SERUM denir. Serum, fibrinojen içermez.

Elde edilmesi

- Kanda tüpe alındıktan sonra pıhtılaşmaya başlar. Pıhtılaşan kanın tüp ile ilişkisi çizilerek ayrılır. Bu işleme kanın çizilmesi denir. Çizilen kan 22° C, 37 C°, 4 C° de bir süre bekletilerek pıhtının büzüşmesi sağlanır. Kan pastasından tümüyle ayrılan sıvı (serum) alınarak hemen kullanılır veya hemen kullanılmak üzere saklanabilir.

- Antikoagulanlı alınan kanın pıhtılaştırılması, çizilmesi ve santrifüj edilmesi ile serum daha kısa süre içinde elde edilebilir.

- Uygun yöntemlerle hazırlanan serumun serolojik ve immunolojik önemi büyüktür. Bilindiği gibi serumda (antikorlar ve komplement bulunur. Bundan dolayı serolojik reaksiyonların temel reaktiflerinden birini oluşturur) erimiş halde proteinler (gammaglobulinler, komplement vs.), hormonlar ve enzimler bulunur. Çeşitli hastalıkların teşhisinde bu maddelerdeki değişiklikler incelenir. İmmunolojik açıdan: Serumun içinde bulunan sıvısal bağışıklığı sağlayan ve antikor adı verilen gammaglobulinler bulunur. Çeşitli enfeksiyonlarda veya aşılamalarda bu antikorların varlıklarının ve yoğunluklarının saptanmasında kullanılan serolojik testler kullanılır ve enfeksiyon olgularının veya bağışıklık düzeyi saptanır.

Ayrıca bazı hastalıkların sağaltımında hastalık etkenine özgül fazla miktarda Ig içeren immun serumlar kullanılabilir.

Serumun saklanması:

- Dondurularak
- Çeşitli prezervatif maddeler ilave edilerek saklanabilir.

PLAZMA

Tanım: Antikoagulanlı olarak alınan kan santrifüj edildiğinde hücre kısmı dipte toplanarak üst kısımda sıvı kalır ki, fibrinojen içeren beyaz-sarı renkli bu sıvıya PLAZMA adı verilir.

Elde edilmesi

- Kan antikoagulanlı olarak alınır.
- 3000-3500 devir/dak. 30 dak. santrifüj edilir.
- Üst kısımdaki sıvı plazma olarak kullanılır.

ANTİKOAGULAN MADDELER

Heparin

Na sitrat
EDTA
Na, K okzalat
Pepton
Hirudin
Dikumarol v.s.

Na sitrat: Katı bir madde olup, genellikle %10'luk çözeltisi hazırlanarak 1/10 oranında kullanılır.

EDTA: %10'luk hazırlanan EDTA 1/1 olarak kan ile karıştırıldığında pıhtılaşmayı önler.

DEFİBRİNE KAN

Fibrin içermeyen kan demektir. Antikoagulan maddenin toksik etkisi söz konusu olduğunda defibrine kana gerek duyulur.

Elde edilmesi:

Defibrine kan elde etmek için cam boncuklu şişeler kullanılır. Kan uygun yöntemlerle cam boncuklu şişelere alınarak pıhtılaşmasını önlemek amacıyla sürekli olarak karıştırılır. Oluşan fibrin iplikleri boncuklar çevresinde toplanarak, kanın pıhtılaşması önlenir. Defibrine kan bu şekilde hazırlanabildiği gibi özel solusyonlar (Alsever solusyonu v.s.) ile de hazırlanabilir.

HEMOLİZ

Tanım: Alyuvarlar içinde bulunan ve kana kırmızı rengini veren hemoglobinin hücre dışına çıkmasına HEMOLİZ denir. Hemoliz olmuş kan narçiçeği renginde ve berraktır.

Normal koşullar altında alyuvarlar içinde bulunan sıvının ozmotik basıncı plazmanın ozmotik basıncına eşittir ve bu da % 0.9 NaCl çözeltisinin ozmotik basıncı kadardır. Bu konsantrasyondaki çözeltilere İZOTONİK çözelti denir ve böyle bir ortamda hücreler sıvı kaybederek büzülür. Alyuvarların ozmotik basıncı kanın ozmotik basıncından az olduğunda (HİPOTONİK) hücreler su alarak şişer ve gerilir. Gerilme ile hücre duvarındaki porlar buyur. Normalde bu deliklerde geçemeyen Hb dışarı çıkar, ya da hipotoniklik fazla ise hücre patlayarak hemoliz meydana gelir.

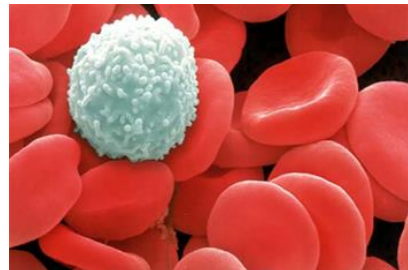
Distile su hipotonik bir sıvı olduğundan kan, distine suda hemoliz olur.

KANIN YIKANMASI

Kan yıkanarak saf eritrositler elde edilir. Eritrositler pek çok serolojik reaksiyonda önemli bir reaktif olarak yer alır. Örn: KF, HA, HI, IHA v.s.

Yöntem:

- Kan antkoagulanlı olarak alınır,
- 1000-1500 devirde 5 dak. santrifüj edilir,
- Üst sıvı (plazma) atılarak, atılan hacim kadar FTS ilave edilir ve pipet ile homojenize edilir,
- 1000-1500 devirde 5 dak. tekrar santrifüjlenir,
- İşlem 3 kez tekrarlanır.
- Tüpteki sediment çeşitli testlerde yıkanmış kan olarak kullanılır. Genellikle % 2'lik solusyonları hazırlanır (10^8 h/ml).



Uygulamanın adı	<i>Serolojik reaksiyonlar, mekanizmaları, kullanım alanları</i>
Yapılacağı hafta	3
Uygulamanın temel hedefi	<i>Serolojik reaksiyonlar, mekanizmaları, kullanım alanlarının</i> öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

- Antijen : Organizmaya uygun yollardan girdiklerinde kendilerine karşı bağışık yanıtın oluşmasına yol açan, bu yanıt sonucunda ortaya çıkan ürünlerle (antikorlar ve duyarlı hücrelerin reseptörleri) özgül olarak birleşme özelliğinde olan, organizmanın kalıtsal yapısına yabancı maddelerdir.
- Antikor : Antijenlere karşı sıvısal bağışık yanıt sonucunda plazma hücreleri ve dolayısıyla duyarlı B lenfositleri tarafından oluşturulan ve antijenleri ile özgül olarak birleşme özelliğinde olan özgül globulinlerdir.

Serolojik reaksiyonlar antijen antikor komplekslerinin bağlanma durumlarına göre şekillenir ve yorumlanır.



Uygulamanın adı	Sulandırma sıvılarının (FTS, PBS) hazırlanması, farklı oranlarda (1/2, 1/5, 1/10) sulandırmaların yapılması
Yapılacağı hafta	4
Uygulamanın temel hedefi	Sulandırma sıvılarının (FTS, PBS) hazırlanması, farklı oranlarda (1/2, 1/5, 1/10) sulandırmaların yapılmasının öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

1X PBS (Fosfat Tamponlu Salin) Tampon oluşur:

- 137 mM NaCl 137 mM NaCl
- 2.7 mM KCl 2.7 mM KCl
- 100 mM Na₂HPO₄ 100 mM Na₂HPO₄
- 2 mM KH₂PO₄ 2 mM KH₂PO₄

To make **10X PBS Buffer** , dissolve the following reagents in 800 ml ultra saf su. **Tampon** yapmak **10X PBS** için saf olarak 800 ml reaktif gerekmektedir.

NaCl NaCl	80 g 80 g
KCl KCl	2 g 2 g
Na ₂ HPO ₄ Na ₂ HPO ₄	14.4 g 14.4 g
KH ₂ PO ₄ KH ₂ PO ₄	2.4 g 2.4 g

HCl ile 7.4 'e PBS Tampon Çözelti pH ayarlanır. Otoklav veya filtrasyon ile sterilize edilir.



Tüp dilüsyon tekniği ile sulandırılmış serumlar

Uygulamanın adı	Presipitasyon testleri, agar jel presipitasyon testinin yapılması ve yorumlanması
Yapılacağı hafta	5
Uygulamanın temel hedefi	Presipitasyon testleri, agar jel presipitasyon testinin yapılması ve yorumlanması
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

PRESİPİTASYON

A) Tanım: Eriyebilir durumdaki antijenlerin elektrolitli ortamda özgül olarak antikorlarla birleşerek çökmesi şeklindeki immunolojik reaksiyonlara Presipitasyon denir.

B) Mekanizması: Presipitasyon reaksiyonlarının mekanizması çökelti veren reaksiyonlarda olduğu gibi Lattice teorisi ile açıklanmaktadır.

LATTICE TEORİSİ

Elektriksel yüklere bağlı olarak etkileşen bivalan antikorlar ile multivalan antijenlerin birleşerek çökmesidir.

-Genellikle bivalan olan antikorlar fazla olduğunda multivalan antijen moleküllerini kaplar, diğer antijen-antikor kompleksleri ile bağlanmasını önler. Dolayısıyla az presipitasyon oluşur.

-Antijenin fazla olması halinde antikor molekülü antijen ile bağlanır. Ancak, bağlanma az olduğundan presipitasyon da azdır.

-Oysa antijen ve antikoru optimal oranlarda karışması ile antijen ve antikor arasında tam bir bağlanma olur ve Lattice formasyonu meydana gelir.

Bu mekanizma ile oluşabilecek presipitasyon reaksiyon özelliğini $IgG > IgM > IgA$ lar göstermektedir.

C) Uygulama Şekilleri:

Presipitasyon reaksiyonları, sıvı, katı ve yarı katı ortamlarda uygulanır. Bu amaçla çeşitli teknikler geliştirilmiştir.

1) Sıvı Ortamda Presipitasyon:

Antraksın teşhisinde kullanılan AsColi (halka deneyi) testi örnek olarak verilebilir. Bu test kantitatif bir testtir. Kapillar 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:

Alınan bir seri tüpe belli miktarlarda antikor (presipitin) ve üzerine de değişen miktarlarda antijen (presipitinojen) ilave edilir. Test tüpleri önce 37°C' de sonrada soğukta inkube edilir. Antijen ve antikoru 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 antikoru tümü birleşerek presipitasyon meydana getirir.

3) Agar Jel Presipitasyon Yöntemi:

Katı veya yarı katı ortamda uygulanan presipitasyon reaksiyonuna Jel Presipitasyonu denir. Bu yöntemle homolog antijen ve antikorların agar içinde diffuz

olmaları ve kalınlaştıkları yerde presipitasyon bandı oluşturmaları esastır. Agarda presipitasyon testinin çeşitli modifikasyonları olmasına rağmen genel olarak 3 temel yöntem vardır.

A-Basit Difüzyon Yöntemi

Antijen veya antikorların birinin difüz olduğu yöntemdir.

a-)Tek yönlü Basit Difüzyon:

Oudin Tüp Yöntemi olarak da bilinir.Antiserum içeren agar tüpü konur.Donduktan sonra üzerine antijen tabaka halinde ilave edilir.Oda derecesinde bir süre inkube edilir.Agar içinde diffuz olan antijen,homolog antijeni ile karşılaştığı yerde çöker ve bir band meydana getirir.

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

b-)Çift Yönlü Basit Difüzyon:

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

B-)Çift Difüzyon Yöntemi

Hem antijen hem de antikorun difüz oldukları bir yöntemdir.

a.)Tüpte Çift Difüzyon Yöntemi:(Oacley ve Fulthrop)

Tüp- petri ve lamda uygulanabilir.

Antiserum içeren agar (% 0.3'lük) tüplere alınır.Üzerine agaroz ve daha sonra da belli miktarlarda antijen konur.Karşılıklı difüzyon ile agar içinde antijen ve antikorun karşılaştığı noktada çökerek oluşturduğu mat-beyaz bandın gözlenmesi pozitif olarak değerlendirilir.

b-)İki Yönde Çift difüzyon: Ouchterlony

%1-5'lük agar veya agaroz petrilere dökülerek üzerinde delikler açılır.Deliklere, ortaya antijen çevreye antikor veya tersi olacak şekilde antijen ve serum konur. Petriler 1-5 gün 4°C 25°C 35°C'de inkube edilirler. İnkubasyondan sonra oluşacak presipitasyon çizgileri değerlendirilir.

Bitişik çukurlarda presipitasyon reaksiyonunun başlaması iki antijen arasındaki immünolojik ilişkiye bağlanabilir.İlişkili olmayan antijenler arasında kross reaksiyon sonucu çizgiler oluşabilir.Birleşmiş çizgiler kullanılan antiserumun benzerliği ile ilgilidir.

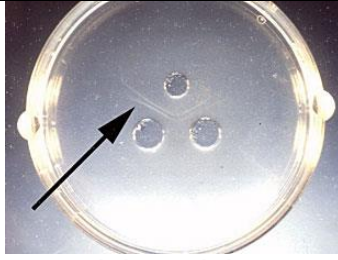
c)Single Radial İmmunodifüzyon:

Bu teknikte uygun miktarlarda dilue edilmiş antiserum içeren agar üzerinde açılan bir çukura konan antijenin difüz olması sonucu özgül antijen ve antikorlar arasında homolog etkileşim sonucu çukur çevresinde halka şeklinde bir presipitasyon zonu meydana gelir. Antijenin (veya antikorun) konsantrasyonu arttıkça presipitasyon halkasının çapı da büyür. Ters çevrilmiş yani antijen içeren agarın kullanıldığı radial immunodifüzyon testi de vardır.

Konsantrasyonları bilinen standart antijen veya antikorlar kullanılarak bilinmeyen reaktifin miktarı gelen presipitasyon halkasının çapına bağlı olarak saptanır.

Kullanıldığı Yerler:

1. Hastalıkların serolojik tanısında
- 2) Antijenik ilişkilerin saptanmasında
- 3) Antijen ve antikorların molekül ağırlıklarının saptanmasında
- 4) özellikle besin kontrol ve adi tıpta proteinli maddelerin tip tayininde (kan grubu tayini, et tipinin tayini vs).



Agar jel presipitasyon

Uygulamanın adı	Aglutinasyon testleri, çabuk lam aglutinasyon testi yapılması ve yorumlanması
Yapılacağı hafta	6
Uygulamanın temel hedefi	Aglutinasyon testleri, çabuk lam aglutinasyon testi yapılması ve yorumlanması
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Aglutinasyon bir antijen-antikor reaksiyonu olup serolojik testler arasında sekonder bağlanma testleri içinde yer alır. Partiküler karakterdeki antijenler , elektrolitli ortamda homolog antikorlarla birleşerek gözle görülebilecek büyüklükte kümeler halinde çökerler ki bu olaya AGLUTINASYON denir.

Farklı Ig moleküllerinin aglutinasyon yöntemleri birbirinden farklıdır. Bu fark antikorların antijen ile bağlanma glerinden ileri gelir. Örneğın, Ig'lerin aglutinasyon gücü IgG'lerden daha fazladır.

Aglutinasyon testleri genelde uygulanması basit olan testlerdir. Oldukça duyarlı olan bu testler ile 1ml. serumdaki 0.1 gm. miktarındaki antikorlar saptanabilir.

Aglutinasyon reaksiyonundan;

-İnfeksiyonların teşhisinde (Brucella, Listeria, Salmonella, Campylobacter, Ruam, Morexella, vs.)

-Mikroorganizmaların identifikasyonunda

-Bağışıklık durumunun belirlenmesinde (antikor titresi) yararlanılır.

Aglutinasyonun Mekanizması:

Aglutinasyon 0.5 M NaCl solusyonunda meydana gelir.Bu reaksiyonda iyon gücü önemlidir. Antijen ve antikor arasında yeterli oranda spesifik bağların oluşması için hücrelerin yüzeyindeki negatif yükün karşıt yükler tarafından nötralize edilmesi gerekir.Bu da nötral pH'da olur. Bu nedenle antikorlar antijenlerle özgül olarak bağlanmış olsalar bile 10^{-3} NaCl ve daha düşük tuz konsantrasyonunda aglutinasyon meydana gelmez. Ortamda fazla miktarda tuz bulunması halinde ise antikorların bulunmadığı durumlarda bile aglutinasyon oluşur.

Laboratuvarda aglutinasyon iki şekilde yapılır:

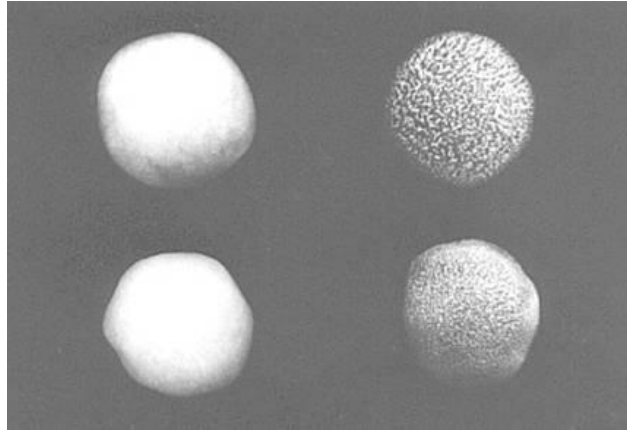
-abuk lam aglutinasyonu

-Yavaş tp aglutinasyonu

abuk Lam Aglutinasyonu:

Bu yöntem, PLATE test veya CARD test olarak da isimlendirilir. Bu test daha çok bir tarama testi olarak kullanılır. Serum veya kan ile uygulanan testte kullanılan antijen tp aglutinasyon antijenine göre 10-50 kat daha konsantredir ve boyanmıştır. Örneğın, pullorum antijeni kristal violet, Brucella antijeni rose bengal, Mycoplasma antijeni ise metilen mavisi ile boyanmıştır.

Bu test için temiz 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 çöküntü pozitif reaksiyon olarak değeriendirilir.Negatif durumlarda ise homojen bir dağılım oluşur.



Lam aglutinasyon

Uygulamanın adı	Yavaş tüp aglutinasyon testinin yapılması ve yorumlanması
Yapılacağı hafta	7
Uygulamanın temel hedefi	Yavaş tüp aglutinasyon testinin yapılması ve yorumlanması
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Yavaş tüp aglutinasyonu:

Bu testte ise bir seri aglutinasyon tüpü alınır ve şüpheli serum $\log_2$ tabanına göre FTS ile sulandırılır. Bunun için ilk tüpe 0.8ml. diğerlerine ise 0.5ml. FTS konur. İlk tüpe 0.2ml. test edilecek serum konarak pipetaj ile iyice karıştırılarak ikinci tüpe 0.5ml. aktarılır. Böylece ilk tüpteki serum sulandırması 1/5 olmuş olur. İkinci tüpte de aynı işlem yapılarak üçüncü tüpe 0.1ml aktarılır. İkinci tüpteki sulandırma da 1/10 olmuş olur. Son tüpe kadar aynı şekilde sulandırmaya devam edilir ve son tüpten 0.5 ml. atılır. Böylece serum sulandırması hazırlanmış olur. Tüplerin üzerine konsantrasyonun belli lam aglutinasyon antijeninden eşit miktarda ilave edilir. Tüpler çalkalanarak 37° C de 24-48 saat inkubasyona bırakılır ve sonuçlar değerlendirilir.

Pozitif tüplerde şüpheli serumdaki antikor homolog antijeni ile birleşerek yerçekimi etkisiyle tüpün dibine çöker, üst taraf ise pozitiflik durumuna göre kısmen veya tamamen berraklaşır. Tüplerin dibinde dantela tarzında bir çöküntü gözlenir. Tüpler çalkalandığında ise aglutinasyondan dolayı çöküntü iri granüller halinde ortama yayılır.

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

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

A- Serumda bulunan izotonik tuzlu su içinde antijen ile birleşemeyen **İNCOMPLE ANTİKORLAR** ile izotonik tuzlu su içinde homolog antijeni ile birleşebilen **COMPLE ANTİKORLAR**'dır.

İncomplete antikorlar 3'e ayrılır:

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

Crypt antikorlar: IgG ve IgA grubu antikorlar olup ancak, indirekt Coombs testi ile ortaya çıkarılırlar.

Blocking antikorlar: Antijenik yapıları örterek aglutinasyonu inhibe eden antikorlardır.

B-) Diğer bir neden ise **PROZON FENOMEN** olarak tanımlanır. Tüp aglutinasyonunda ilk dilusyonda reaksiyon oluşmayıp düşük 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 ve antijenin fenol yerine formalinle hazırlanması prozon fenomenini arttırır. Bunu önlemek için serumun 1/80-1/160 sulandırılmaları kullanılmalı veya taze serum 56°C'de 30 dk. bekletilerek inaktive edilmelidir.

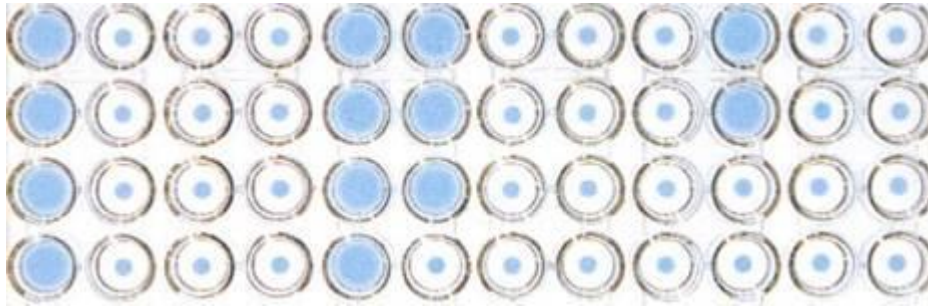
Bazen de infekte olmayan hayvanlardan alınan serumlarda düşük düzeyde nonspesifik aglutininler ile koaglutininlerden ileri gelen aglutinasyon reaksiyonu görülür. Serumun bu özelliği 65°C' de 10-15 dk. inaktive edilerek veya asitlendirilmiş plate test antijeni (pH 4) kullanılarak önlenir.

Hemolizli serumla yapılan tüp aglutinasyon testlerinde antijen ve sulandırma sıvısında bulunan fenol, serum içindeki serbest haldeki hemoglobinin ile presipite olup çöker. Yalancı bir aglutinasyon reaksiyonu ile sonucu yanıltabilir.

Akut infeksiyon veya aşılama ile ilk olarak IgM'ler ortaya çıkar. Kronik infeksiyonlarda ise IgG'ler meydana gelir. Bu nedenle aşı ve aktif infeksiyonlu hayvanları ayırt etmek için ve gerçek infeksiyonu ortaya çıkarmak için IgM'leri ekarte etmek gerekir. Bunun için çeşitli mekanik (santrifüj, blocking test, inaktivasyon, Coombs testi) ve kimyasal (MET; rivanol, tripsin) olarak modifiye aglutinasyon testleri uygulanır.

Aglutinasyon reaksiyonlarında antikorların belirlenmesi için sadece kan veya kan serumu kullanılmaz. Başka biyolojik materyaller de kullanılır ve buna göre çeşitli şekillerde isimlendirilir.

- Süt serumu ile aglutinasyon
- Vajinal mukus ile aglutinasyon
- Seminal plazma ile aglutinasyon gibi



Yavaş aglutinasyon

Uygulamanın adı	Kanın yıkanması ve eritrosit suspansiyonu hazırlanması, kullanım amacı
Yapılacağı hafta	8
Uygulamanın temel hedefi	Kanın yıkanması ve eritrosit suspansiyonu hazırlanması, kullanım amacı
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

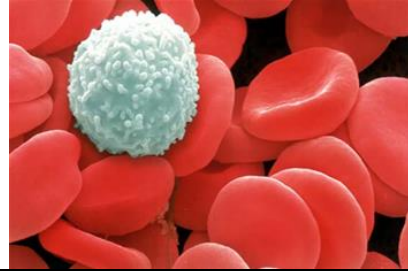
UYGULAMA BİLGİSİ

KANIN YIKANMASI

Kan yıkanarak saf eritrositler elde edilir. Eritrositler pek çok serolojik reaksiyonda önemli bir reaktif olarak yer alır. Örn: KF, HA, HI, IHA v.s.

Yöntem:

- Kan antkoagulanlı olarak alınır,
- 1000-1500 devirde 5 dak. santrifüj edilir,
- Üst sıvı (plazma) atılarak, atılan hacim kadar FTS ilave edilir ve pipet ile homojenize edilir,
- 1000-1500 devirde 5 dak. tekrar santrifüjlenir,
- İşlem 3 kez tekrarlanır.
- Tüpteki sediment çeşitli testlerde yıkanmış kan olarak kullanılır. Genellikle % 2'lik solusyonları hazırlanır (10^8 h/ml).



Uygulamanın adı	Hemaglutinasyon testinin uygulanması ve yorumlanması
Yapılacağı hafta	9
Uygulamanın temel hedefi	Hemaglutinasyon testinin uygulanması ve yorumlanması
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Eritrositlerin serum ya da m.o. etkisiyle bir araya gelerek, kümeler halinde çökmeleridir. Pek çok m.o. ve viruslar; HA yeteneğine sahiptir. Burada olay bir ag-ab reaksiyonu değil ; doğrudan doğruya m.o.da bulunan ve eritrositlerdeki reseptörlere yapışma ve onları çöktürme özelliğidir.

MEKANİZMA : HA özelliğinde olan m.o.ların duyarlı eritrositlerin yüzeylerine yapışma eğiliminde olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda; HA özelliği bulunan m.o.ların yüzeylerinde kısa ,çivi benzeri organeller bulunduğu gözlenmiştir. Bunların eritrositlerin yüzeylerindeki mukopolisakkarit içeren reseptör bölgelerine özgün olarak bağlandıkları saptanmıştır. HA sırasında pek çok virus partikülü duyarlı eritrosite etki eder. Virus 2 eritrosit arasında kalacak şekilde bağlanır.

Bu bağlanma sürekli değildir. Virus , salgıladığı Neuroamidase enzimi ile reseptör bölgelerini tahrip eder. Ve eritrositlerden ayrılır. Bu olaya ELUSYON denir. Ayrılardan sonra eritrosit yüzeyindeki reseptörler tahrip olduğu için; aynı eritrosit ile aynı virus tekrar bağlanamaz. Ancak başka bir virus ile bağlanma olabilir. Çünkü eritrositler yüzeyinde her virus için ayrı bir spesifik reseptör bulunmaktadır.

AMAÇLARI :

1. etken varlığını saptamak
2. HI testinde kullanılacak olan virus ya da bakterinin HA ünitesini belirlemek.

KULLANILAN REAKTİFLER :

1. Yıkılmış Tavuk Eritrositi (YTE)
2. antijen
3. FTS

ÇABUK HA = LAMDA HA : virus yada bakterinin varlığını ortaya koymak için yapılır.
→ lamin üzerine → 1 damla Ag + 1 damla YTE → suspanse edilir → çökme varsa = HA +

YAVAŞ HA = TÜPTE/MİKROPLATE'TE HA : bu yöntemle virusun HA titresini de hesaplanır.

1. şüpheli virus log₂ tabanına göre sulandırılır.
2. bütün gözlere %2'lik eritrosit süspansiyonundan virus sulandırmalarına eşit miktarda konur.
3. oda sıcaklığında 2 saat ya da 37°C'de 30 dk. inkübasyona bırakılır. Ve sonuçlar değerlendirilir.

DEĞERLENDİRME :

- HA + → tüpün dibinde dantela tarzında irili ufaklı kümeleşme vardır.
- HA - → düğme çöküntü oluşur.

HEMAGLUTİNASYON BİRİMİ (HB) : HA oluşturan en son sulandırma oranı, o virus için HA Birimidir.



+



-

Hemaglutinasyon testi ve yorumlanması

Uygulamanın adı	Hemaglutinasyon-Inhibisyon testinin uygulanması ve yorumlanması
Yapılacağı hafta	10
Uygulamanın temel hedefi	Hemaglutinasyon-Inhibisyon testinin uygulanması ve yorumlanması
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

HA yeteneğine sahip olan m.o.ların bu yeteneklerini, bu m.o.ya karşı oluşmuş spesifik ab.tarafından inhibe edilmesidir. Yani spesifik serum ile virus birleşerek, onun HA yeteneğini ortadab kaldırır.

AMAÇ :

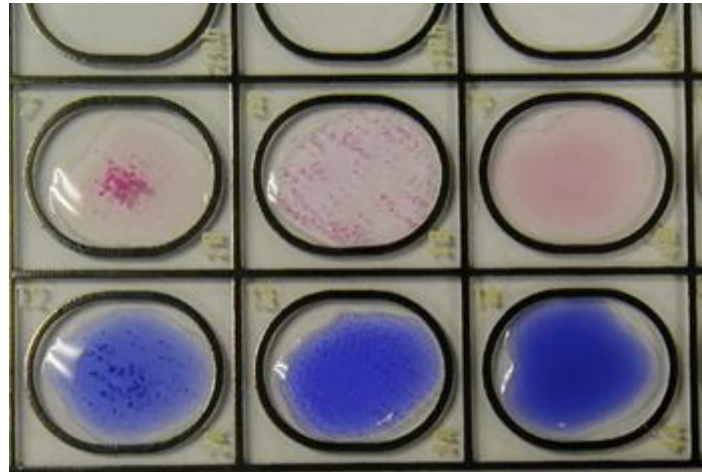
1. HI özelliğindeki m.o.ların identifikasyonu
2. serumdaki ab.ların titrelerinin ölçülmesi.

YAPILIŞI :

1. tüm gözlere FTS konur ve şüpheli serum log₂ tabanına göre sulandırılır.
2. serum sulandırmalarına eşit hacimde 4HB oranında sulandırılmış olan bilinen virustan ilave edilir.
3. 37°C'de 45 dk inkubasyona bırakılır.
4. her göze virus+serum toplamı kadar %2'lik YTE ilave edilir.
5. 37°'de 45 dk beklenip → sonuçlar değerlendirilir.

DEĞERLENDİRME :

HA meydana gelmesi bilinen virus ile ag nin birleştiğini yani bilinen virus ile şüpheli serum ab larının birleşmediğini gösterir. Dolayısı ile şüpheli serumda – bilinen virusa spesifik ab yoktur. HA (-) ise HI (+) tir. → düğme tarzındaki reaksiyonun görüldüğü son göz, tespit edilir. Ve 4 ile çarpılır. Bulunan rakam SERUM HI TİTRESİ'dir.



Hemaglutinasyon inhibisyon testi ve uygulanması

Uygulamanın adı	Diğer sekonder bağlanma testleri (komplement fikzasyon ve Coombs testi) temel bilgiler
Yapılacağı hafta	11
Uygulamanın temel hedefi	Diğer sekonder bağlanma testleri (komplement fikzasyon ve Coombs testi) temel bilgilerin öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

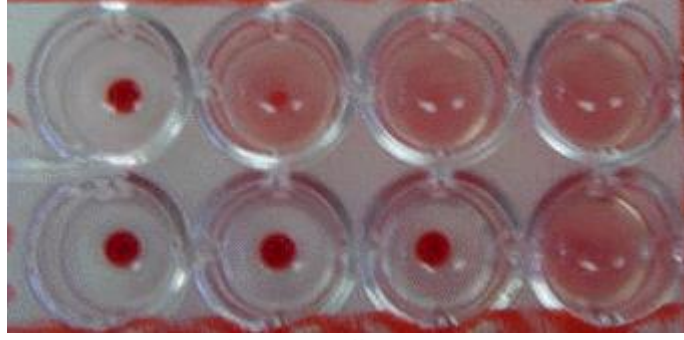
Coombs Testi

A. Direkt Coombs testi: Direkt Coombs testi ile yenidoğanın eritrositlerine bağlanmış olan anne kaynaklı antiRh antikorlarının varlığı gösterilir. Yenidoğandan alınan eritrositler yıkandıktan sonra üzerine antigamaglobülin (Coombs serumu) eklenir. Aglütinasyon oluşur ise bebeğin eritrositlerine anne kaynaklı antiRh antikorlarının bağlanmış olduğunu gösterir.

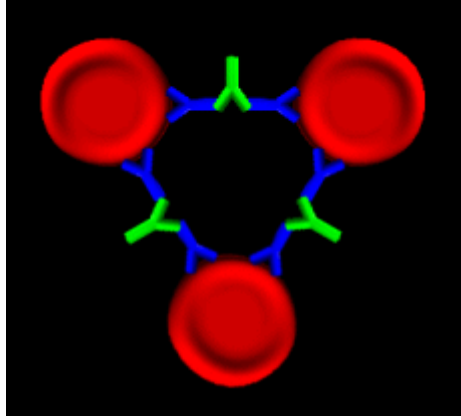
B. İndirekt Coombs testi: İndirekt Coomb testi Rh(-) anne kanında antiRh antikorların varlığını göstermek için yapılır. Rh pozitif 0 kan grubu eritrosit süspansiyonuna anne serumu eklendiğinde veya bu işlem sonrası Coombs serumu eklendiğinde aglütinasyon oluşursa anne kanında antiRh antikor varlığını gösterir.

Komplement Fiksasyon Testi

Antijen ve buna özgül antikorun birleşmesi ile immün kompleks oluşur. İmmün kompleks oluşumu antikorun Fc kısmında konfigürasyonel değişikliğe neden olur. Antikorun Fc kısmında oluşan bu değişiklik, kompleman proteinlerinin bağlanmasına ve aktivasyona neden olur. Söz konusu olan antijen eritrosit ise buna bağlanan antikorlar aracılığı ile aktive olan kompleman proteinlerinde zincirleme reaksiyon gelişerek eritrosit hücre membranında zımba delikleri şeklinde zedelenme olur ve hücre ölür (lizis). Antijen antikor birleşmesinin komplemanı uyarmasına dayanarak geliştirilen iki basamaklı bu teste “kompleman fiksasyon testi” denir. Kompleman fiksasyon testi ile 1 µg/ml’den daha düşük konsantrasyonlardaki antikor düzeyleri saptanabilmektedir.



Komplement Fikzasyon Testi



Coombs bağlanma testi

Uygulamanın adı	Primer bağlanma testleri (ELISA, İmmunofluoresan testi, RIA) temel bilgiler
Yapılacağı hafta	12
Uygulamanın temel hedefi	Primer bağlanma testleri (ELISA, İmmunofluoresan testi, RIA) temel bilgiler
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

PRİMER BAĞLANMA TESTLERİ : Antijen ve antikorun reaksiyona girmesine müsaade edilir. Oluşan immun kompleksin miktarı direkt ya da dolaylı olarak ölçülür. Bu reaksiyonu ölçebilmek için Ag. Veya Ab. ; radyoizotop, floresan boya ve ya enzim ile işaretlenir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra ; birleşmemiş materyaller ortamdan uzaklaştırılarak, reaksiyona giren kısmın miktarı , işarete dayanılarak ölçülür.

KULLANILAN MATERYALLER :

- Mikroplate
- Antijen→normalden az ya da fazla kullanılmamalıdır.
- Wash buffer
- Şüpheli serum
- Substrat → renksizdir ve reaksiyona girince renk verir.
- Konjugat → substrat'a bağlanır. Bağlanma sonucu renk oluşur.

Oluşan immunolojik reaksiyonun, enzim-substrat sistemi ile görünür hale getirilmesi esasına dayanan teknikleri kapsar. Hem ag , hem de ab varlığı ve miktarı hassas olarak ölçülür.

(n) sayıdaki serum için (n) sayıda sulandırma yapılır. Her göz bir serumu temsil etmektedir.

Bir tane IB için özel mikroplate kiti alınır.
Her örnek serum için 1 göz kullanılmaktadır.
Göze 0,1 ml en son sulandırmadan koy.
30 dk beklenir.
Sıvı dökülür.
4 kez yıkama solusyonu ile yıkanır.
0,1 ml konjugat koy.
30 dk beklenir.
Yıkama
0,1 ml substrat koy
15 dk bekle
0,1 ml stop solusyonu koy.
650 nm de sonuçlar okunur.

*** Mikroorganizmaların izolasyonunda ve serumdaki antikorların tespitinde kullanılan çok duyarlı ve spesifik bir testtir.

Testin esası; şüpheli antijen veya antikorun homoloğu olan ve enzim ile

işaretili bir konjugata bağlanması ve bu bağlantının substrat adı verilen kimyasal bir madde yardımı ile renginin değiştirilip görülür hale getirilmesidir.

1. DİREKT ELISA → şüpheli marazi maddede m.o. aranması için yapılır.
2. İNDİREKT ELISA → şüpheli serumda antikor aranması ve titre saptanması için yapılır.

NDV-IBV-IBD-Mg-Ms-ReoVirus v.b. için ticari kitler mevcuttur ve rutin olarak uygulanmaktadır.

ŞÜPHELİ SERUM daki Ab + Ag → birleşir.

Bu komplekse konjugat bağlanır ki enzim ile işaretlenmiştir.

Ortama substrat eklenir ve komplekse bağlanır.
Enzim substratı parçalar ve renk oluşur.
Stopper eklenerek reaksiyon durdurulur.
ELISA reader da okutulur.

KULLANILAN MATERYALLER

Şüpheli Serum
+/- kontrol
Serum sulandırıcısı
Ticari mikroyet
Wash buffer= yıkama solusyonu
Konjugat
Substrat
Stopper
Reader

TESTİN YAPILIŞI

Enfeksiyona spesifik ticari mikroyetler vardır ve mikroyetin her gözü taranacak olan enfeksiyonun etkeni ile yani antijen ile kaplıdır.

Mikroyet 8x12 olmak üzere 96 gözlüdür.

İlk göze negatif kontrol konur.

İkinci göze pozitif kontrol konur.

Diğer gözlere de serum sulandırıcısı ile 1/500 oranında sulandırılmış serumlar konur.

30 dk beklenir.

Wash buffer ile 4 defa yıkanır ve kurutulur.

Her göze konjugat eklenir.

30 dk beklenir.

Wash buffer ile 4 defa yıkanır ve kurutulur.

Her göze substrat eklenir.

15 dk beklenir.

Substratın üzerine stopper eklenerek, reaksiyon durdurulur.

ELISA reader da okutulur.

SONUÇ

Reader otomatik olarak renk değişikliklerini tespit eder ve bize antikor titresini verir. Böylece sürünün antikor titresini tespit edilir.

Hastalık durumu belirlenir.

Aşı zamanı belirlenebilir.

Yakın zamanda uygulanmış olan aşının sürüyü ne kadar koruduğu hakkında bilgi verir.

Immunofloresans Yöntemler

İmmünoflöresan yöntem (immunofluorescence assay), doku veya hücrede bulunan antijenlerde olduğu gibi “in situ” antijenlerin ya da dokudaki veya hücreyel antijenlere karşı gelişmiş ve bunlara bağlanmış antikorların (ör. otoantikorlar) saptanması amacıyla sıkça kullanılmaktadır. Özellikle doku kesitlerinde antijen varlığı UV ışık kaynağı olan mikroskop yardımı ile ve flöresan bir madde ile işaretli özgül antikorlar kullanılarak saptanabilmektedir. Bu amaçla kullanılmak üzere antikorlar bazı florokrom maddeler ile işaretlenmektedir. Antikoru işaretlemek için en fazla fluorescein isothiocyanate (FITC) kullanılmaktadır

A. Direkt flöresan antikor testi:

Direkt flöresan antikor testi doku kesitlerinde viral antijenin saptanması (ör. enfekte beyin dokusunda kuduz virusuna ait antijenlerin gösterilmesi) gibi değişik amaçlar için kullanılmaktadır. Direkt immunofloresan yöntemde antijen varlığını saptamak amacı ile kullanılan birincil antikor FITC ile işaretlidir

B. İndirekt floresan antikor (IFA) testi

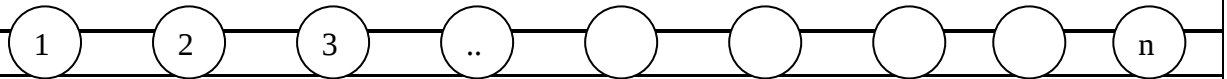
İndirekt flöresan yöntemde araştırılan antijene özgü birincil antikor ve birincil antikora bağlanabilen FITC ile işaretli ikincil antikor kullanılmaktadır.

Radioimmunoassay yöntemi özellikle düşük miktarlardaki antijen tayininde spesifitesi çok yüksek olan bir testtir. Radioimmunolojik testlerde antijen veya antikor bazı radioizotop maddeler ile (ör. ^{125}I , ^{57}Co) işaretlenerek daha çok kompetisyon esasına dayanmak üzere, sandwich-ELISA yöntemindeki gibi farklı şekillerde de yapılabilmektedir. Temel mekanizma radioizotop bir madde ile işaretli antijen veya antikor aracılığı ile karşılığı olan (özgül olduğu) antikor veya antijenin varlığını ve miktarını saptamaktır.

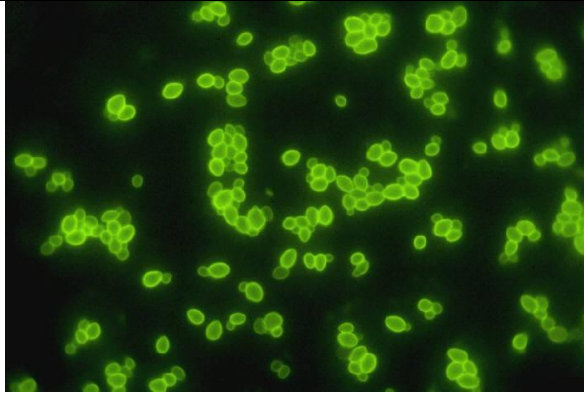
0,6 ml FTS + 25 μl şüpheli serum $\rightarrow$ 1/25



0,9 ml FTS + 100 μl I.sulandırma $\rightarrow$ 1/250



ELISA testi



Floresan antikor testi

Uygulamanın adı	Serolojik testler ile elde edilen sonuçların hastalıkların tanısı veya aşı bağışıklığının değerlendirilmesi amacı ile incelenmesi ve yorumlanması
Yapılacağı hafta	13
Uygulamanın temel hedefi	Serolojik testler ile elde edilen sonuçların hastalıkların tanısı veya aşı bağışıklığının değerlendirilmesi amacı ile incelenmesi ve yorumlanması
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ
•İmmünolojinin bir alt dalı olan seroloji antijenlerle bağışıklık sistemi ürünlerinin etkileşimini invitro olarak inceler. Antijen ve antikor birleşmesi özgül bir reaksiyon olduğu için, bilinen bir antijen olduğunda örnek materyal içerisinde özgül antikor aranabilir veya bilinen bir antikor olduğunda örnek materyal içerisindeki özgül antijen değişik teknikler ile saptanabilir. Ayrıca örnek materyal içerisindeki özgül antijen veya antikor miktarları niceliksel testler kullanılarak saptanabilmektedir. •Serolojik testlerden elde edilen sonuçlar; •1.Klinik tanı veya diğer laboratuvar bulguları ile tanısı konan hastalıklarda serolojik testler doğrulama amaçlı kullanılabilir. •2.Bir kişinin veya toplumun bağışıklık durumunu saptamak amacı ile kullanılabilir. •3.Hastalığın gidişi, tedavi ve/veya prognozu serolojik testlerle izlenebilir. •4.Etken mikroorganizmanın serogrup, serotip veya immunotipi saptanabilir. •5.Etken mikroorganizmanın üretilmediği veya üretmenin pratik olmadığı durumlarda etkeni tanımlamak sadece serolojik testlerle mümkündür. •Bir enfeksiyonun tanısında önemli olan, varolan enfeksiyonu yansıtan antikorların önceden geçirilmiş enfeksiyona ilişkin antikorlardan ayırdedilmesidir. Burada ayırmada önemli olan, enfeksiyonu izleyen 2-3 hafta süresince antikor titresinin yükselip sonra yavaş yavaş düşmesidir 10-14 gün ara ile alınan iki serum örneği antikor titresinin yükseldiğini gösterirse yeni bir enfeksiyon söz konusudur. ilk serum örneğinin enfeksiyonun erken evresinde alınması önemlidir; tersi durumda, titre artışı atlanmış olur. Yeni enfeksiyonun tanınmasına olanak sağlayan bir başka durum enfeksiyondan sonra ilk ortaya çıkan antikorların çoğu kez IgM sınıfında olmalarıdır. •Serolojik testlerin miktar tayininde duyarlılık bakımından ayrılıkları vardır. Örneğin basit presipitasyona bakarak agarda iki yönlü yayılma 15, bakteri aglütinasyonu ve kompleman bağlanması 300, dolaylı hemaglütinasyon 600, ELISA ve virüs

nötürlenmesi 300000 kez daha hassas bildirilmiştir.

- Duyarlılık (sensitivite) : Belirli bir hastalığı olan kişilerde bir yöntemle alınan pozitif sonuçların yüzdesine o metodun duyarlılığı denir. Duyarlı bir testte yalancı negatiflik çok azdır.

- Özgüllük (spesifisite) : Sağlıklı kişilerde bir yöntem ile araştırılan hastalık bulgusunun negatif sonuç yüzdesine o yöntemin özgüllüğü denir.

- Bir testin duyarlılığı aranan hastalığı olan , özgüllüğü ise o hastalığı olmayan seçilmiş bir popülasyonda aranır.

Antijenin tek bir determinantının antikorun tek bir yanına yani bir epitopun bir paratop'a olan birleşme ilgisine afinite denir.

Doğal antijenlerin çoğunluğu çok valanslıdır. Antikorlarında en az iki valansı vardır. Bu şekilde çok valanslı(determinantlı) bir antijenin çok valanslı antikorlarla bağlanma gücüne avidite denir.

Uygulamanın adı	Aşılar, aktif bağışıklık oluşumu ve aşı uygulamaları
Yapılacağı hafta	14
Uygulamanın temel hedefi	Aşılar, aktif bağışıklık oluşumu ve aşı uygulamaları
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Pleyt, mezür, kan alma tüpleri, santrifüj, pipet, pipet uçları
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

AŞILAR

Tanım: Verildikleri canlıda immun sistemi uyararak vücudu hastalıklara karşı aktif bağışık hale getiren maddelerdir.

Bağışıklık ise, vücuda giren immunojenlere (mikroorganizma , toksin, çeşitli protein ve kompleksleri gibi) karşı organizmanın hücresel ve humoral bir yanıt bir yanıt oluşturacak kısa veya uzun bir süre o immunojenin zararı etkisinden korunmasıdır.

Aşıların Sınıflandırılması

I- Klasik aşılar

a) Mikroorganizma aşıları (bakteri, virus, mantar, protozoon, vs.)

- Canlı (aktif) aşılar

- Ölü (inaktif) aşılar

b) Toksin aşıları

II- Biyoteknoloji yolu ile elde edilen aşılar (Rekombinant DNA aşıları, Rekombinant virus aşıları, mutant aşılar, anti-idiotip aşılar, sentetik aşılar)

Canlı aşılar: Hastalık etkeninin kendi konakçısı veya değişik konakçılarda olduğu gibi çeşitli besiyerleri, doku kültürleri ve embriyolu yumurtalarda uzun süre pasajları sonucu hastalık yapma yetenekleri kaybolmuş veya çok zayıflamış ancak, immunojenik yetenekleri korunmuş mikroorganizmalardan hazırlanırlar. Bu şekilde elde edilen suşlarla hazırlanan aşılar **ATTENUE AŞILAR**, işleme ise **ATTENUASYON** denir. Attenuasyon mikroorganizmaların kendi doğal konakçılarındaki üretilmesiyle gerçekleşebilir ve utant suşlar elde edilebilir.

Örnek:

Veteriner Hekimlikte	Antraks	Mavi dil
	Br. abortus S19	At vebası
	Newcastle (adale)	Avianize kuduz (Kelev)
	Marek	Koyun çiçeği
	Gumboro	Kanatlı encephalomyelitisi
	ILT	
	BCG	
İnsan Hekimliğinde	Çiçek	Kızamık
	Poliomyelit	Kabakulak
	Sarı humma	Influenza

Ölü aşılar: Bu aşılar "Bakterin" adı da verilir. Aşı suşları besiyerlerinde üretilerek toplandıktan sonra çeşitli yöntemlerle öldürülerek (ısı, formol, fenol, UV, vs.) ml'deki bakteri sayısı aşı FTS ile standardize edilir. Aşıya koruyucu amaçla fenol veya merthiolat katılır.

Örnek:

Veteriner Hekimlikte Sığır ve mandaların P. multocida
Koyun vibriosisi
L. gryppotyphosa
Şap
Kanatlı korizası
Hindi erysipelası
Kanatlıların bazı kombine aşıları
İnsan Hekimliğinde Kolera
Tifo
Veba

Toksin aşıları: Bu aşılar toksine karşı bağışıklamada kullanılır. Toksin oluşturan mikroorganizmaların kültür filtratlarının süzülmesiyle elde edilen toksinin detoksifikasyonundan (genellikle formolle) sonra uygun sulandırılmaları aşı olarak kullanılır (Toksoin).

Örnek:

Anaerob infeksiyon etkenlerine karşı hazırlanan aşılar.
Cl. haemolyticum (beta toksinine karşı)
Cl. botulinum
Cl. septicum
Cl. chauvoei vs.

Anaeroblarda bazen tüm kültür formolle muamele edilip aşı olarak kullanılır ki bunlara anakültür aşıları denir.

İnsanlar için: Difteri toksin aşıları
Tetanoz toksin aşıları
H. pertusisi aşıları vs.

CANLI AŞILAR

- Bağışıklık verme gücü fazla
- Meydana gelen bağışıklık uzun süreli
- Bağışıklamada tek doz yeterli
- Dozun miktarı az verilir
- Genellikle adjuvant kullanılmaz
- İmmün defekti olanlarda kullanılmaz
- Stres yaratır
- Canlı aşılar ile diğer infeksiyöz etkenler bulaşabilir
- Latent seyirli hastalıkları aktive edebilir
- Canlı aşı virüsleri doğada pasaja uğrayarak virulent olabilirler ve çoğalma sırasında da spontan mutantlar oluşabilir

İNAKTİF AŞILAR

- Zayıf
- Bağışıklık kısa süreli
- Genellikle çift doz uygulanır
- Miktarı fazla verilir
- Adjuvant kullanılır
- Kullanılabilir
- Strese neden olmaz
- Bulaşma tehlikesi yok

Biyoteknoloji Yolu İle Elde Edilen Aşılar

1) Rekombinant DNA aşıları

Rekombinant DNA teknolojisi yardımı ile E. coli'de hazırlanan biyosentetik aşılar (Örn. Şap) kullanılmaktadır. Yine Newcastle, İnfluenza, vesicular stomatitis, kuduz, herpes simplex vs. virüslerinin yüzey proteinlerini kodlayan genler (DNA, RNA virus) saptanarak bunlara karşı çeşitli mikroorganizmalarda aşı hazırlama çalışmaları vardır.

2) Mutant Aşılar

Mikroorganizmaların herhangi bir antijenik determinantını kodlayan genin kodlanması ile elde edilen aşılar Subunit aşılar denir.

3) Sentetik Aşılar

Gelişen teknoloji ve moleküler kimya sayesinde antijenik karakterdeki yapıların açık kimyasal formüller ortaya konarak etkili aşıların hazırlanmasına bir basamak oluşturmaktadır.

Örnek: Str. pyogenes'in "M" yüzey proteini (A grubu Streptokokların fagositoza olan dirençlerinin bu yüzey proteininden ileri geldiği sanılır). "M" proteininin yapılmasına uygun 35 aa'den kurulu sentetik peptit aşısı (SCB7) tavşanlara verildiğinde "M" proteinine karşı hem hücresel hem de humoral yanıt oluşturmaktadır.

- Difteri toksini, difteriye karşı kobaylarda, difteri toksininin derideki nekrotik aktivitesi ve letel etkisini nötralize eden antikorları oluşturan 188-201 a.a.'den oluşan sentetik bir polipeptit aşısı da yapılmıştır.

4) Anti İdiotip Antikor Aşıları

Aşı hazırlamada dikkat edilecek noktalar

- Suşun antijenik özelliği
- Antijenik dterminantların sağlam olması
- Aşının canlı veya ölü oluşu
- Adjuvant

Aşılamada Oluşabilecek Bağışıklık Düzeyine Etki Eden Faktörler

- Aşının dozu
- Aşının hazırlanması
- Aşının titresi
- Aşının muhafazası, liyofilizasyonu
- Aşılama yolları
- Aşılama adedi
- Aşılanan canlının yaşı, cinsiyeti, beslenmesi, parazitleri
- Bireysel faktörler
- Maternal antikor durumu
- Adjuvantlar
- Antibiyotikler

Aşıların Kontrolü

- Hazırlanan aşıların uygulamaya konmadan önce çeşitli kontrollerinin yapılması gerekir.

- 1- Kontaminasyon, sterilizasyon testi
- 2- Potens (etkinlik) testi
- 3- Yabancı patojenler için test
- 4- Antijen içeriğinin kontrolü
- 5- Zararsızlık testi
- 6- Dayanıklılık testi

İyi bir aşı:

- Zararsız olmalı
- Etkili olmalı ve yeterince bağışıklık sağlamalı
- En az bir yıl süreyle bağışıklık sağlamalı
- Ekonomik olmalı
- Özellikle canlı aşılar bulaşıcı olmamalı
- Saklanması ve verilmesi kolay olmalı

Aşı Reaksiyonları

- Aşının genelleşmesi ve yayılması
- Allerjik reaksiyonlar
- Postvaksinal ensefalit

- Latent bakteriyel ve viral hastalıkların proaktivasyonu
- Onkojenik etki
- Aşının hastalığın klinik tablosunu değiştirmesi

İMMUNSERUMLAR

Hiperimmun serum: Antijen uygun deneme hayvanına belli kurallar ve süreler içinde enjekte edilerek elde edilen yüksek titrede homolog antikor içeren serumlardır (antibakteriyel, antiviral, antiparaziter vs.).

Antitoksik serum: Önce toksoid sonra da az miktarlardan başlayarak arttırmak üzere tosinin birkaç kez ve uygun aralıklarla enjeksiyonu sonucu elde edilen yüksek titrede antitoksin içeren serumlara denir.

Konvelesans serum:

AŞILAR VE İMMUNSERUMLARLA BAĞIŞIKLAMA

İnsanlar ve hayvanlar, canlı (attenué, patojenitesi zayıf veya zayıflatılmış) veya inaktif (fiziksel, kimyasal vs. yöntemlerle) mikroorganizmalar veya bunların çeşitli ürünleri (toksin, toksoid, toksik substanslar) ile hayatlarının belli dönemlerinde kısa veya uzun bir süre temas etmeleri halinde doğal aktif bir bağışıklık oluşur. Oysa, organizmaya etken koruma veya sağaltım amacıyla aşı olarak verildiğinde yapay aktif spesifik bir bağışıklık meydana getirilir. Yani aşılama ile vücutta immunolojik sistemler uyarılarak humoral veya sellüler (veya her ikisi birden) yanıt oluşturulur.

Oysa, başka bir şahısta bulunan veya hazırlanan antikorların (hiperimmun serum, antitoksik serum) hasta kişilere sağaltım amacıyla verilmesiyle pasif bir bağışıklık oluşur. Ancak, böyle elde edilen bağışıklık uzun ömürlü olmaz ve genellikle 2-3 ay sonra sona erer. Pasif bağışıklık oluşturmak için verilen antikorların katabolize olma oranları da yüksek olduğundan kısa bir süre sonra etkinliklerini kaybederler.

Yapay pasif bağışıklıkta, başka bir hayvandan veya insandan elde edilen hiperimmun serumun ya da antitoksik serumun korunma veya sağaltım amacıyla diğer hayvana veya insana verilmesi amaçlanır. Ancak, pasif bağışıklamada olumsuz sonuçlarla karşılaşılabilir. Bunlar: kısa bir bağışıklık oluşumu, serum hastalığı, anafaksi ve aktif immunizasyonun baskılanmasıdır.