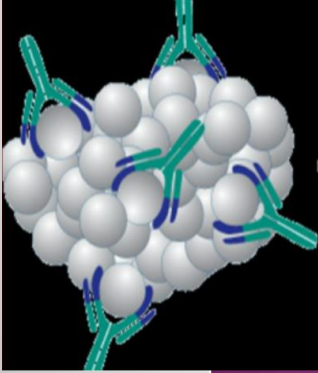


SEROLOJİK TESTLERDE GELİŞMELER



Dr Cemile SÖNMEZ
Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları
Daire Başkanlığı
Ankara

SUNUM AKIŐI

- ◉ Serolojik testlerin önemi?
- ◉ Hangi amaçla kullanıyoruz?
- ◉ Kullanımda olan testler?
- ◉ Son gelişmeler?



TARİHÇE

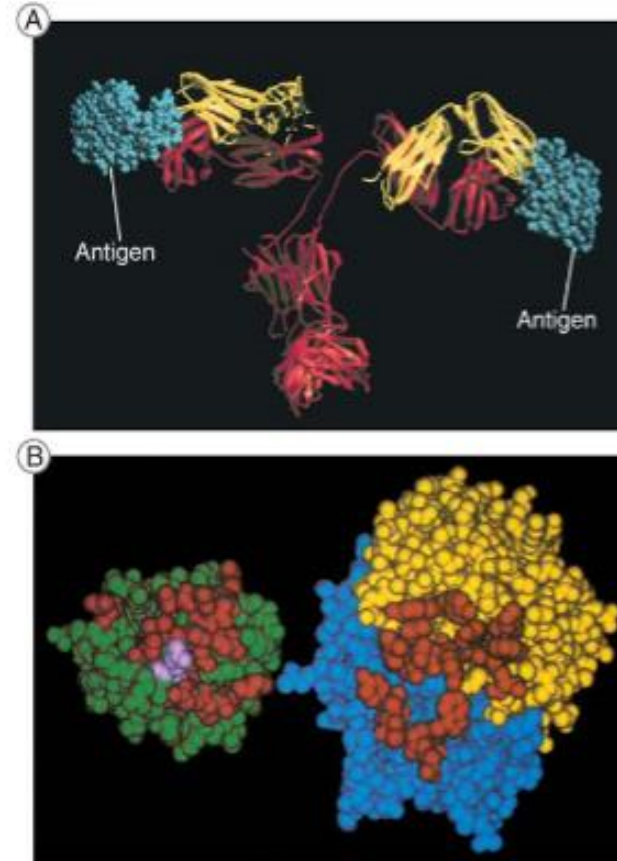
- 1965-1975: Minyatürize biyokimyasal testlerin gelişimi
- 1975-1985: İmmünolojik testlerin gelişimi
- 1985-1995: Moleküler sistemlerin ve PCR'ın uygulanması
- 1995-....Biyosensör ve mikroarray gibi sistemlerin gelişimi

LABORATUVAR TANISI

- ⦿ Etkenin görülmesi
(mikroskopik yöntemler)
- ⦿ Etkenin üretilmesi
(kültür yöntemleri)
- ⦿ Etkenin genetik materyalinin gösterilmesi
(moleküler yöntemler)
- ⦿ Etkenin antijenik yapısının veya ona karşı oluşmuş spesifik antikorların saptanması (serolojik yöntemler)

SEROLOJİK TESTLER

- Ag-Ab birleşmesi tepkimelerinin görülebilir, gözlemlenebilir, ölçülebilir hale getirilmesi temelli tanısal yöntemlerdir.



- Her pozitif test sonucu hastalığı kesinlikle gösteremeyebileceği gibi her negatif sonucu da hastalığı tamamen ekarte ettirmez.



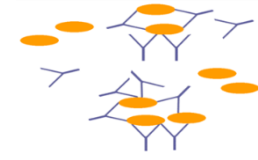
NEDEN SEROLOJİK TESTLER?

- Kolay ve pratik
- Kısa sürede sonuç verirler
- Ekonomik

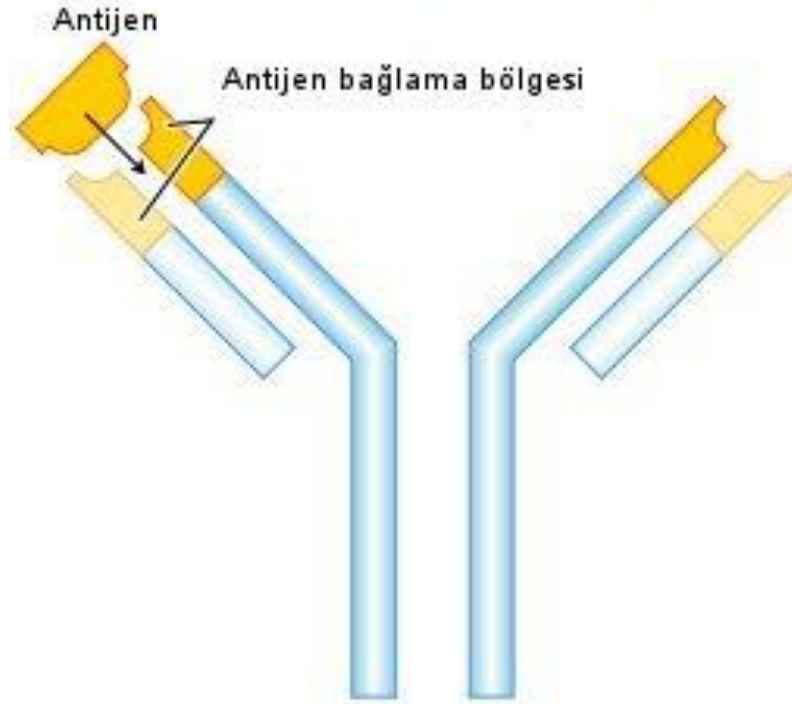
HANGİ AMAÇLAR İÇİN KULLANIYORUZ?

- Etkeni tanımlamak
- Tanıyı doğrulamak
- Hastalığın gidişi, prognozu ve tedavisini izlemek
- Bağışıklık durumunu saptamak
- Serogrup, serotip ve immünotip tayininde kullanılabilir.

SEROLOJİK TESTLERİN TEMELİ



Antijenler



Antikor

DİREKT YÖNTEMLER

Etkene özgü antijenin
saptanması

RSV, Influenza,
Parainfluenza,
Adenovirüs, HSV,
Varicella-zoster,
CMV, Rotavirüs, HBV...

İNDİREKT YÖNTEMLER

Etkene özgü antikorun
saptanması

Sifiliz,
HCV, HBV, HIV,
Kızamık, kızamıkçık,
HSV...

KLASİK TEKNİKLER

- Kompleman fiksasyon testi
- Aglütinasyon
- Hemaglütinasyon inhibisyon testi
- Nötralizasyon testi
- Counter immün elektroforez

YENİ TEKNİKLER

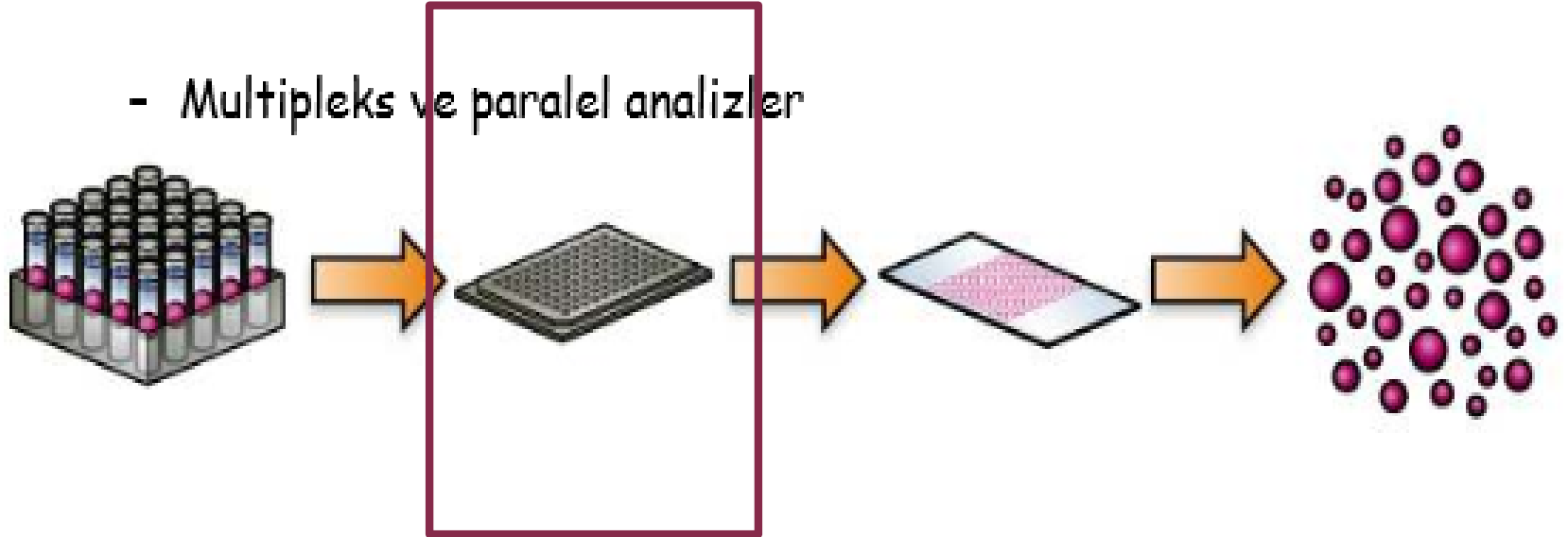
- ELISA
- Western blot
- Dot blot, immünoblot
- İmmünofloresan
- Hızlı testler
- İmmüno-PCR
- Mikro-boncuk yöntemi



Teknolojik Değişim

Serolojide teknolojiye paralel ilerlemeler:

- Multipleks ve paralel analizler



• Test tüpleri

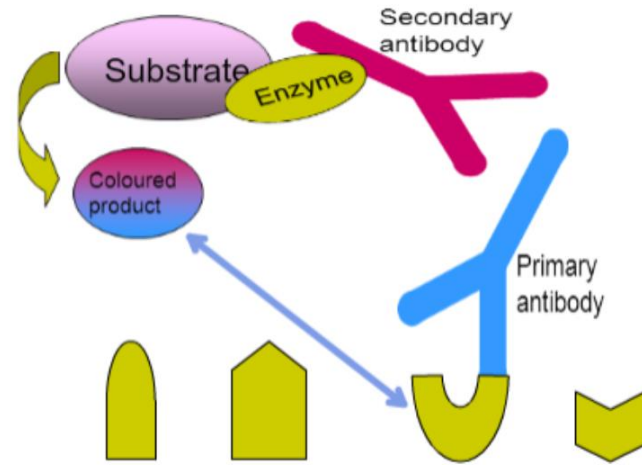
• Mikrokuyucuklar

• Mikroarray

• Mikroküre temelli
xMap

ELISA

Özgül antijen-antikor reaksiyonunu göstermek amacıyla enzimle işaretli konjugat ve enzim substratı kullanılarak reaksiyonun renklendirilmesi esasına dayanmaktadır.



ELISA₍₂₎

- Hepatit virüsleri, Rotavirüs, EBV, Adenovirüs, Herpes virüsler, CMV, HIV, Rubella, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Entamoeba histolytica*, *T. gondii*
- Antijen veya antikor tespitinde
- Kalitatif veya kantitatif sonuç verir.



ELISA⁽³⁾

- Direkt
- İndirekt
- Kompetetif
- Nonkompetetif
- Sandviç
- Makro ve mikro
- Avidin-biyotin ekli

- Yeni geliştirilen sistemlerde katı faz mikroboncuk sistemleri kullanılmaktadır.



Duyarlılığı yüksek
Test süresi kısa



ELISA, kullanılan substrat özelliğine göre;

Kolorimetrik

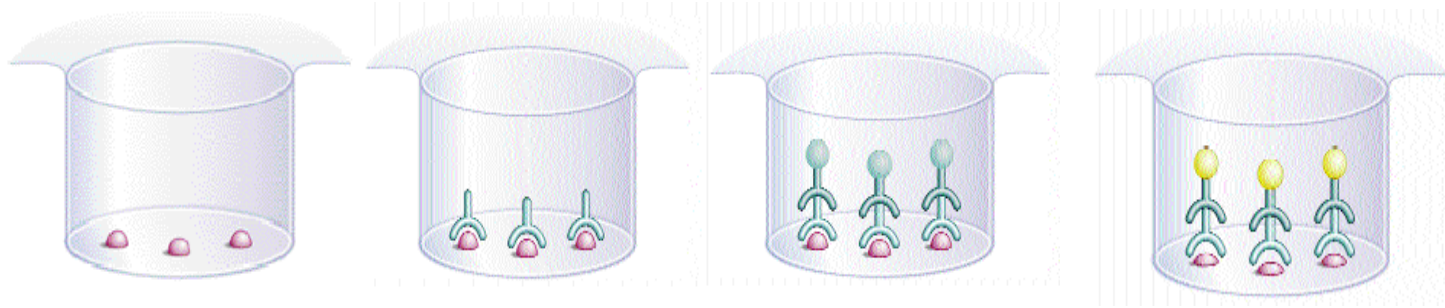
Floresan

Kemilüminesan



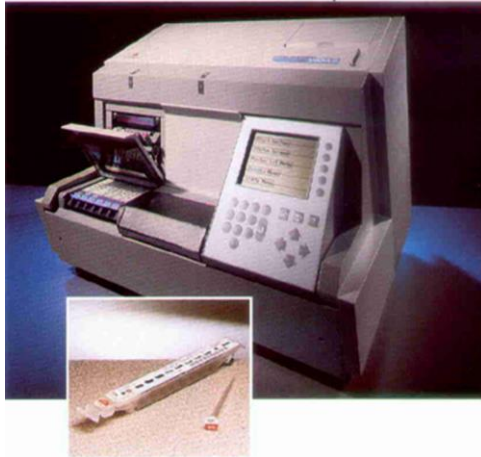
KOLORİMETRİK ENZİM İMMÜN YÖNTEMİ;

- ◉ Katalitik reaksiyon sonucunda renk geliştiren kromojenik substratlar kullanılarak gerçekleştirilir.
- ◉ Kromojen sonucunun optik dansitesi spektrofotometre ile ölçülür.



FLORESAN İMMÜN YÖNTEM

- Floresan substratlar kullanılır. Enzim reaksiyonu sonucu florofor oluşmaktadır.
- Duyarlılık %98.1, özgülük %97
- Otoantikorların, bakteri, virüs ve bazı parazitlere karşı oluşturulan antikorların ve bazı antijenlerin (hepatit virüs antijenleri) saptanmasında kullanılır.
- Viral antijen, antikor ve dışkıda *Clostridium difficile* toksin, *Listeria* spp, *Salmonella* spp saptamasında kullanılır.



VIDAS (Biomerieux)

KEMİLÜMINESAN İMMÜN YÖNTEM

- 1 pg/mL'deki antijeni saptayabilecek kadar duyarlıdır.
- RIA 'dan 10 kat duyarlı ve daha basittir.
- Katı faz olarak genellikle manyetik mikropartiküller kullanılır.
- Kimyasal reaksiyonun oluşturduğu ışık ölçülmektedir.





- ◉ Access (Beckman Coulter)
- ◉ IMMULITE (Diagnostic Products)
- ◉ Cobas 6000 (Roche Diagnostics)
- ◉ Vitros ECQ (Ortho Diagnostics)
- ◉ ARCHITECT ci4100 (Abbott)



OTOMATİZE ELİSA SİSTEMLERİNDE OLMASI GEREKENLER

Hız

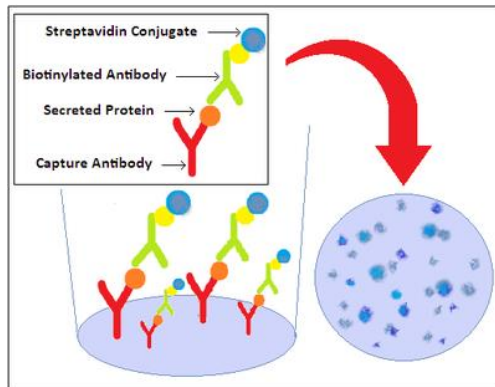
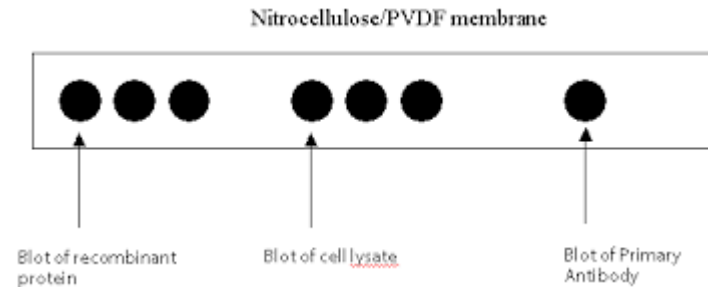
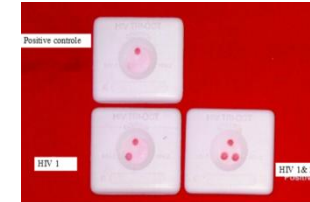
Kullanım kolaylığı

Yüksek performans

Yüksek duyarlılık

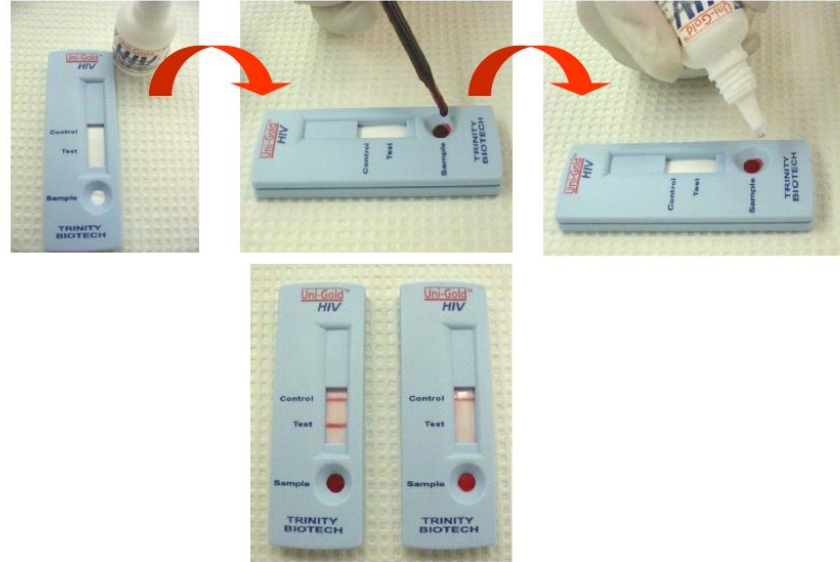
STANDART ELISA YÖNTEM MODİFİKASYONLARI

- ⦿ Kaset ELISA
- ⦿ Dot Blot ELISA
- ⦿ PCR ELISA
- ⦿ Elispot test



İMMÜNOKROMOTOGRAFİK TESTLER

- Kaset testlerdir
- Hızlı, basit, ekonomik ve güvenilir
- Membran, boya, spesifik antijen veya antikor
- Sonuçlar görsel olarak değerlendirilir
- Pozitif testte renkli çizgiler veya yuvarlak şekiller elde edilir.



LATERAL MİGRASYON İMMÜNOASSAY (İMMÜNOKROMATOĞRAFI)

- Acil sonuç gereken ve az numunenin çalışılacağı durumlarda,
- Düşük örnek kapasiteli merkezlerde, klasik ELISA'ya iyi bir alternatiftir.
- Avantajı: Tecrübeli eleman, spektrofotometre ve benzeri cihazlar gerektirmez.
- RSV, influenza virus ve HIV antikoru için, visceral leishmaniasis, filariasis, Legionella pneumophila serogrup 1 üriner antijeni



DOT BLOT ELISA (WESTERN BLOT, RIBA, LIA)

- Hasta örneğinin birtakım liganda karşı test edilmesini sağlayan hızlı yöntemlerdir.
- Katı faz olarak nitrosellüloz veya naylon şeritler ve kağıtlar kullanılır.

Rotavirus antijenleri, HIV virüsü (hücre kültüründe amplifikasyonu sonrasında) H.pylori ve EBV, CMV, HCV antikollarının ve otoantikolların saptanmasına yönelik dot blot ELISA testleri bulunmaktadır.

Pozitif kontrol

Negatif kontrol

Total ANA

dsDNA

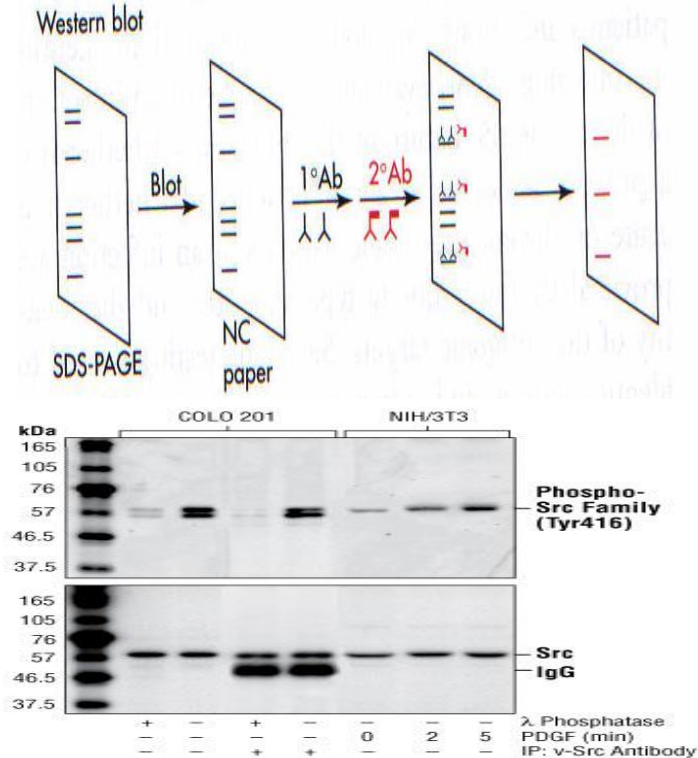
RNase Sm

SS-A/SS-B

WESTERN BLOT

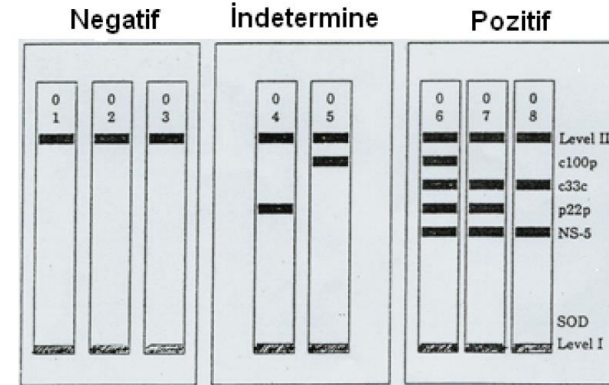
- Poliakrilamid jel elektroforezi ile molekül ağırlıklarına göre ayrıştırılan antijenler, bandlar halinde nitroselüloz kağıt membranlara geçirilir ve bu membranlar şeritler (strip) şeklinde hazırlanır.
- Hasta serumunda özgül antikor varlığı konjugat ve substratın eklenmesiyle saptanır.
- Sonuçlar görsel olarak değerlendirilebilir.

- *Treponema pallidum*,
- *Chlamydia trachomatis*,
- HIV,
- *Borrelia burgdorferi*



İMMÜNOBLOT YÖNTEMİ

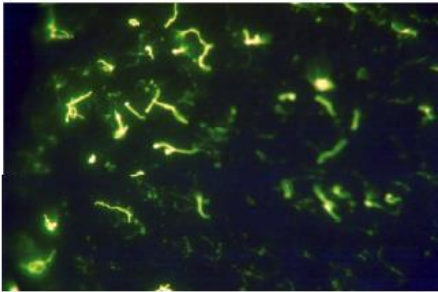
- Western blot'a benzer mekanizmaya dayanır.
- Rekombinant antijenler kullanılır.
- Kalitatif olarak değerlendirilir.
- Bu mekanizmaya dayanan testler arasında "Lineimmunoassay(LIA)" ve "Rekombinant immunoblot assay (RIBA)" sayılabilir.
- HIV zarf ve çekirdek proteinleri ve bunlara karşı özgül antikörlerin saptanmasında kullanılmaktadır.



HCV Recombinant Immunoblot Assay test sribinin değerlendirilmesi

FLORESAN ANTİKOR TESTİ

- Konjugatın işaretlendiği madde bir florokrom boyasıdır ve değerlendirme floresans mikroskobu ile yapılır.



Avantajları:

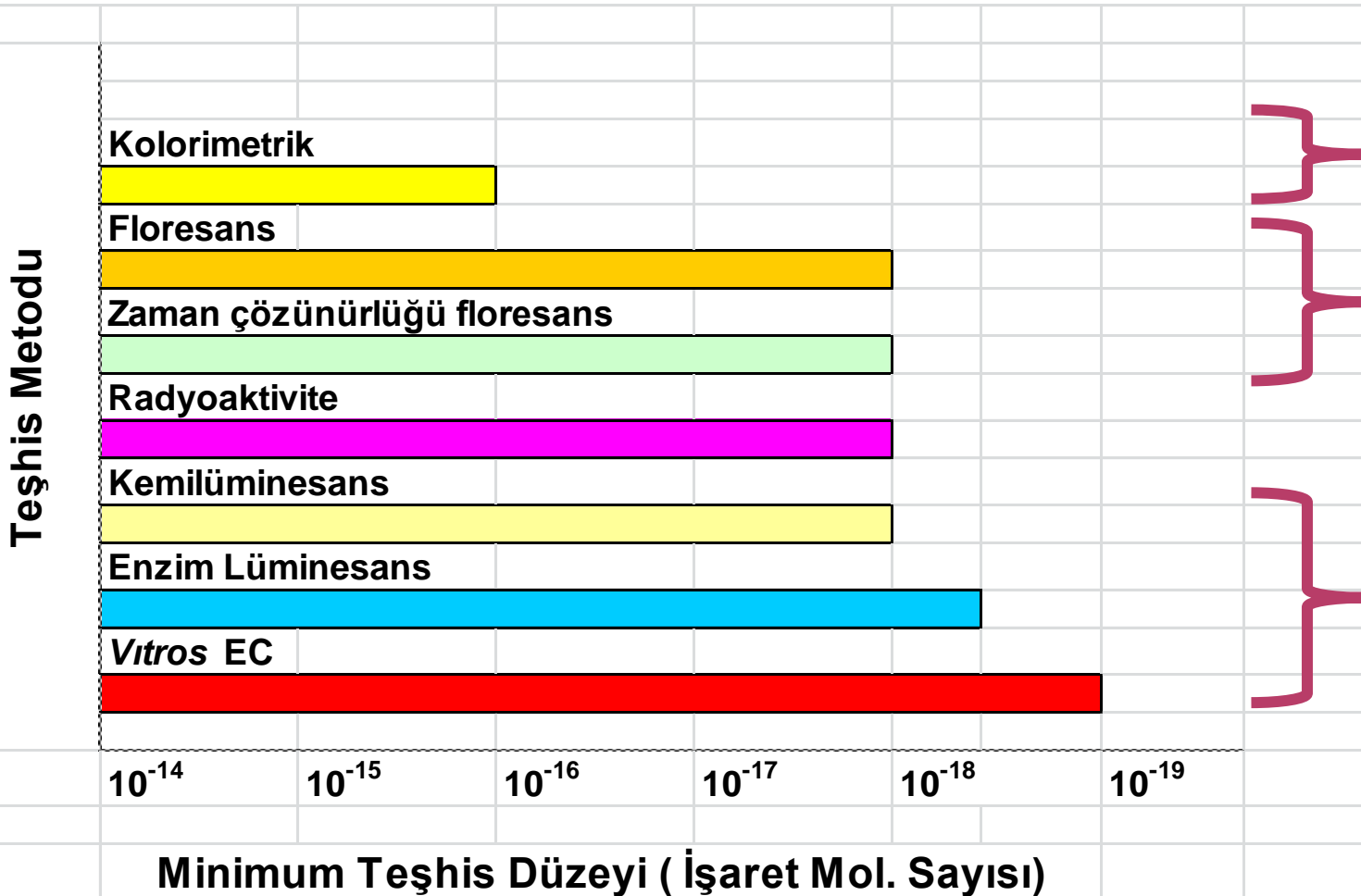
- Kolay uygulanabilir
- Özgül antijenlerin lokalizasyonunun belirlenmesine de olanak sağlarlar.

Dezavantajları:

- Zaman alıcı,
- Pahalı floresan mikroskobu
- Değerlendirme için eğitilmiş ve deneyimli personele gereksinim göstermesidir.

KULLANILAN İŞARETLERİN HASSASİYET

KARŞILAŞTIRMASI

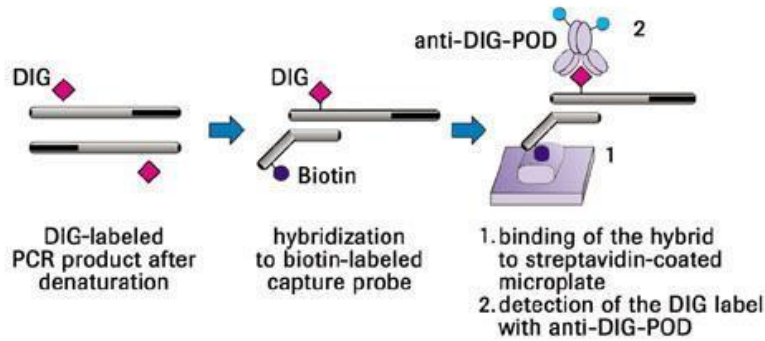


PCR-ELISA

- Real time PCR'a göre daha ucuz bir alternatiftir.
- Klasik ELISA ile PCR yöntemlerinin birleştirilmesi sonucu ortaya çıkmış yeni bir yöntemdir.
- Gelecekte infeksiyon hastalıklarının tanısında giderek artan oranda uygulama alanı bulacaktır.
- *Streptococcus* , HIV ve rotavirüsün gibi birçok infeksiyöz ajanın **yüksek duyarlılıkla** tanımlanmasında kullanıldığı bildirilmektedir.
- Rotavirüs tanısında 100 viral partikül /ml tespit edebilir.HIV-1'e ait p24 antijen yükünü tespit edebilmektedir.

PCR-ELISA

- PCR ürünlerini kantitatif olarak değerlendirmektedir.

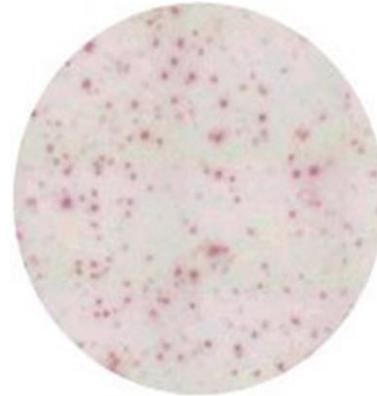


- İşaretli problemler (digoxigenin), PCR ürünlerinin katı faza immobilize edilmesinde kullanılmaktadır.
- Konjugat (Anti-digoxigenin-AP-konjuge antikorlar) ve substrat (paranitrophenyl) eklenerek,
- Optik dansite herhangi bir ELISA okuyucusunda okunmaktadır.

ELISPOT TEST

(ENZYMELİĞEK İMMUNOSORBENT SPOT TEST)

- ◉ Sandviç ELISA tabanlı test
- ◉ Antijen-antikor birleşmesine dayanır.
- ◉ Spesifik antijene karşı antikor/protein üreten T/B lenfositlerin kantitasyonu için geliştirilmiş bir testtir.

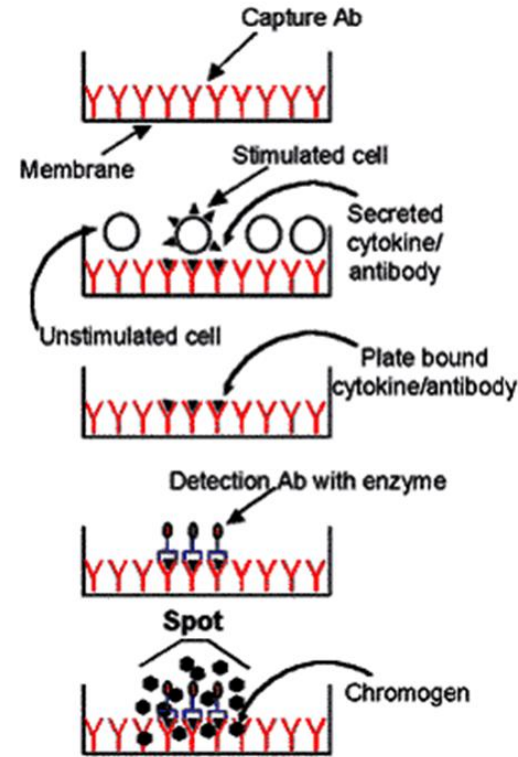


ELISPOT TEST (2)

Avantajları:

- ELISA'dan 20-200 kat daha duyarlıdır.
- İn vitro koşullarda in vivo koşullara yakın sonuç vermesidir.
- Aşı çalışmalarında, Tb tanısında aktif infeksiyonu aşıllı olanlardan ve Tb'yi Tb dışı mikobakterilerden ayırt eder, tedavinin takibinde

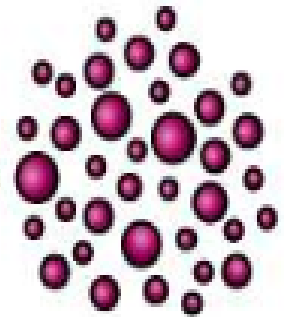
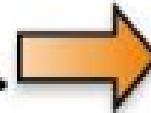
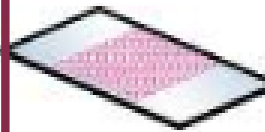
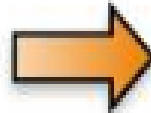
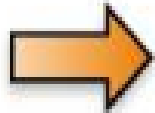
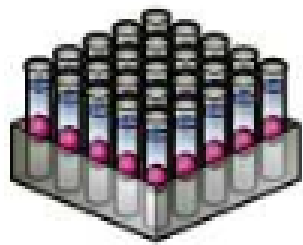
ELISPOT assay



Teknolojik Değişim

Serolojide teknolojiye paralel ilerlemeler:

- Multipleks ve paralel analizler



• Test tüpleri

• Mikrokuyucuklar

• Mikroaray

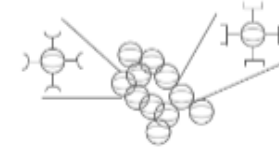
• Mikroküre temelli
xMap

ÇOKLU ANALİZ SİSTEMLERİ

- Çok analiz avantajlı sistemler
- Antijen ya da antikorlar ELISA'daki gibi bir zemine sabitlenirse planar array,
- Mikrokürelere sabitlenirse süspansiyon ya da bead array (**Luminex** ve **Xmap**)



Planar Array



Bead Array

PLANAR ARRAY

Avantaj:

- ◉ Kompleks setler oluşturulabilir

Dezavantaj:

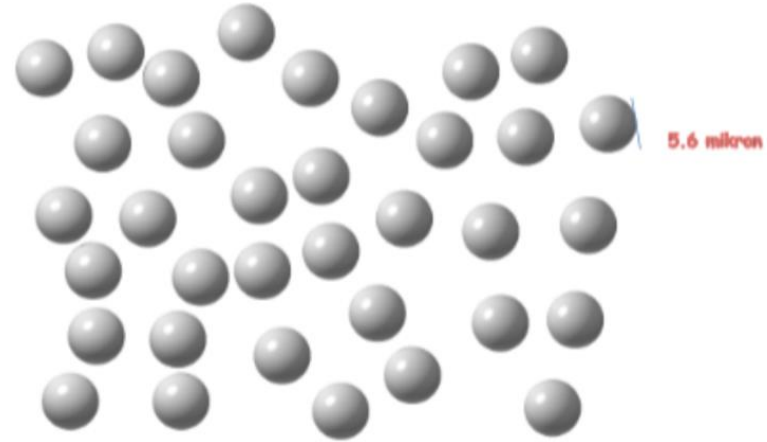
- ◉ Antijen üç boyutlu yapısının bozulabilmesi

BEAD ARRAY

Avantaj:

- ◉ Esneklik

Dezavantaj?



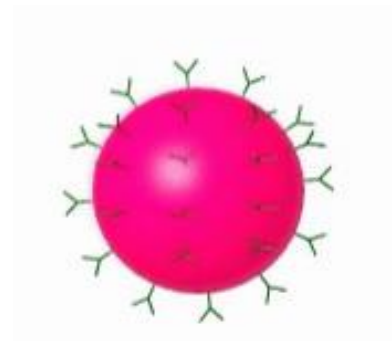
Hastalık profillerinin çıkarılmasında güçlü bir tanısal araç

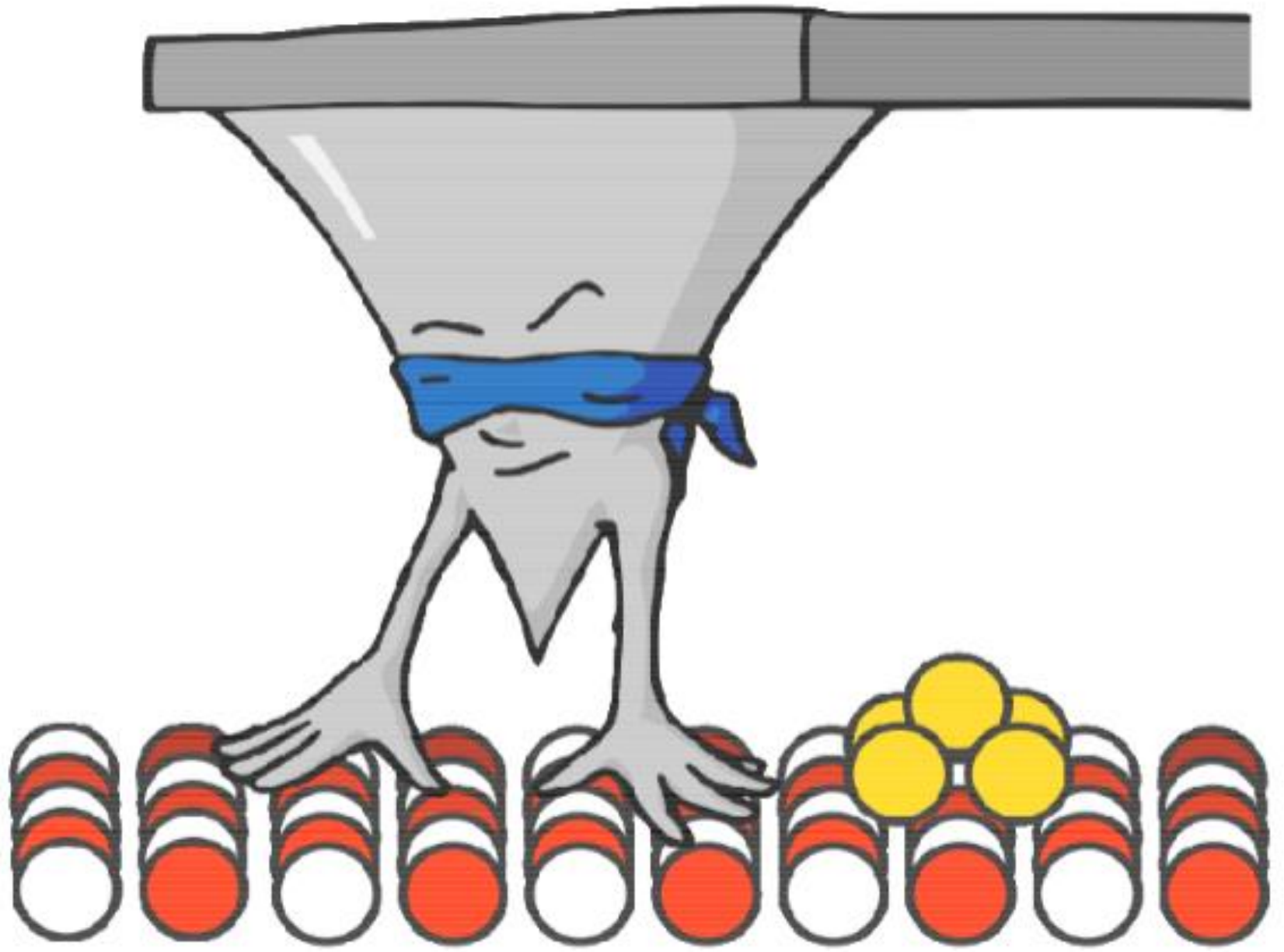
ÇOKLU ANALİZ SİSTEMLERİNİN

Avantajları:

- Tek örnekte en fazla 100 analitin eş zamanlı ölçümü ve biribiri ile kıyaslanmasına
- Sadece düşük örnek hacmi ile en fazla 100 analitin ölçümü
- Her bir test için maliyet düşük
- Hızlı

- Serotip tayininde, aşı çalışmalarında
- Luminex, xMAP teknolojileri







Ağı nereye atacağınızı
bilmeniz dileđiyle...