



LABORATUVAR PENCERESİNDEN AŞI YANITLARI

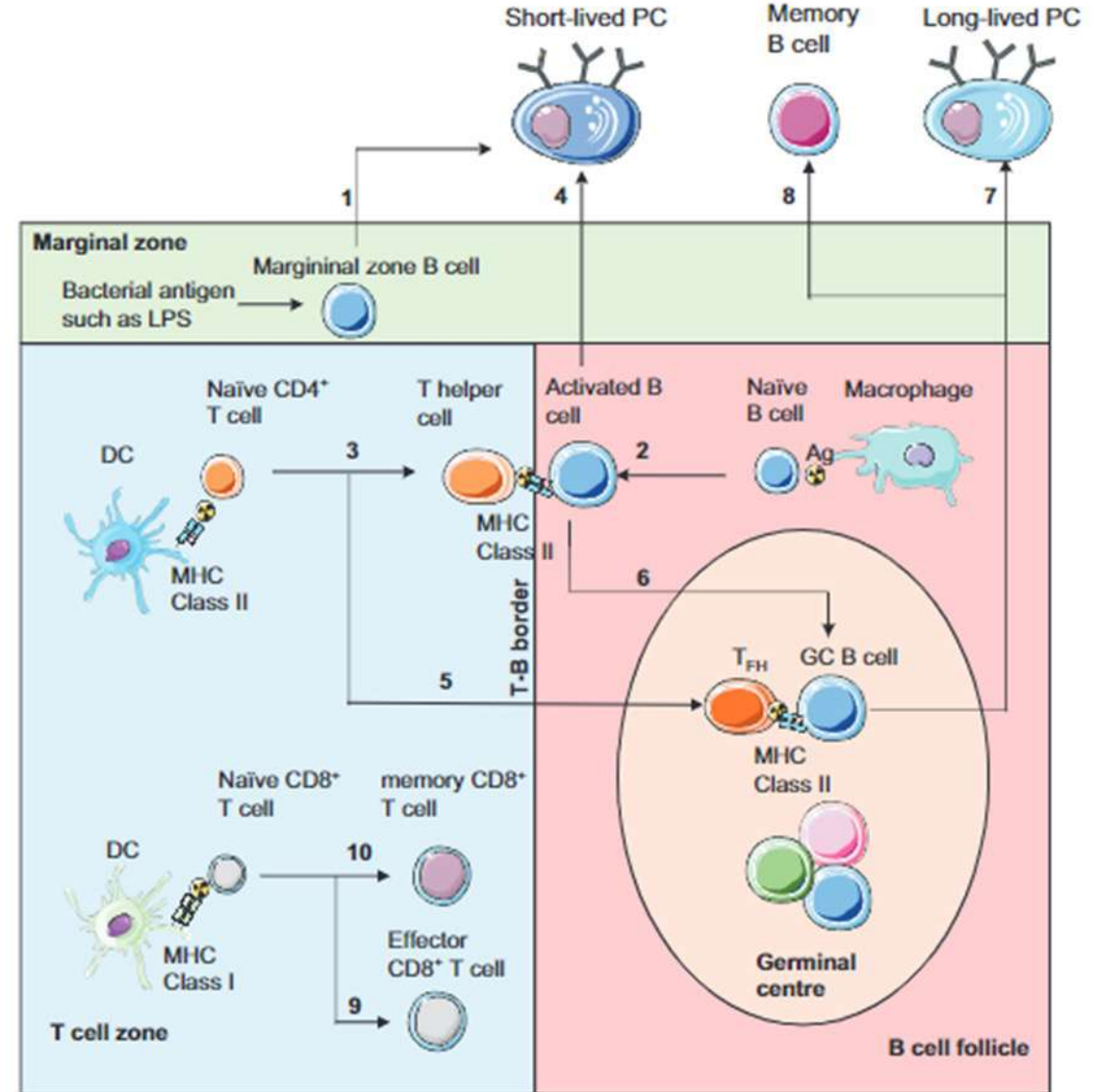
Doç. Dr. Çiğdem Erol

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi

Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD

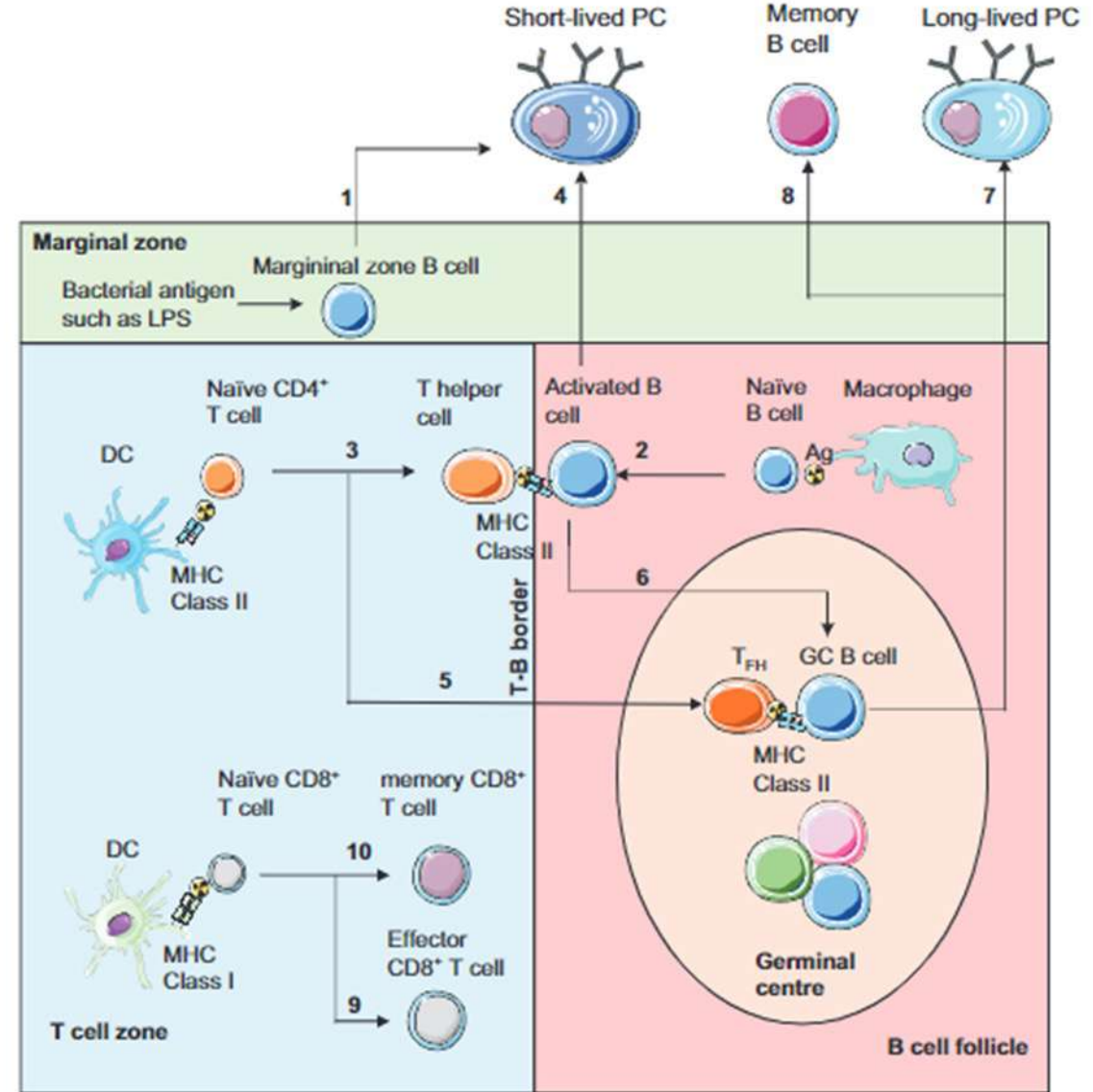
Aşı yanıtları nasıl oluşur?

- Aşı antijenleri APCs ile sekonder lenfoid organlara taşınır
 - Marjinal zon (MZ)
 - B lenf folikül
 - T hücre zonu
- MZ'deki B hücreleri, Th yokluğunda bakteri LPS antijenlerine yanıt veren kısa ömürlü plazma hücrelerinin (PC) gelişimini sağlayabilir
- Naif B h.leri makrofajlar tarafından işlenen antijenler ile aktive olur...T-B sınırına göç eder



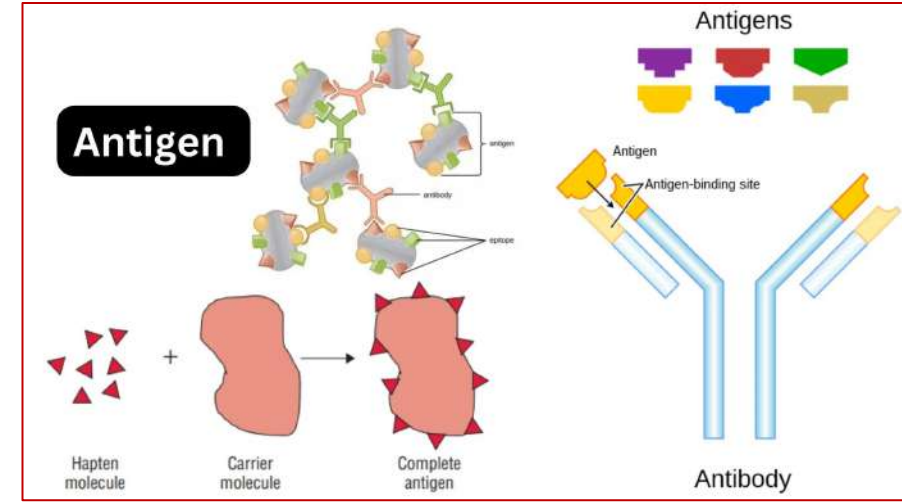
Aşı yanıtları nasıl oluşur?-2

- Naif CD4+T hücreleri, APC'ler (DC gibi) tarafından sunulan antijenler tarafından uyarılır
- Th ler, T-B sınırındaki B hücrelerine yardımcı sinyaller sağlayarak;
 - kısa ömürlü ektrafoliküler PC'ler oluşturur veya
 - TFH farklılaşmasını gerçekleştirerek GC yanıtlarının başlatılmasını ve sürdürülmesini destekler.
- Germinal merkez B hücreleri güçlü proliferasyona (SHM) uğrar veya yüksek afiniteli antikolar veya hafıza B hücreleri salgılayan LLPC terminal farklılaşması+
- Naif CD8+T hücreleri de DC tarafından çapraz sunulan antijenler tarafından aktive edilebilir; bu, kısa ömürlü efektör hücrelere veya kalıcı hafıza hücrelerine farklılaşmayı yönlendirir



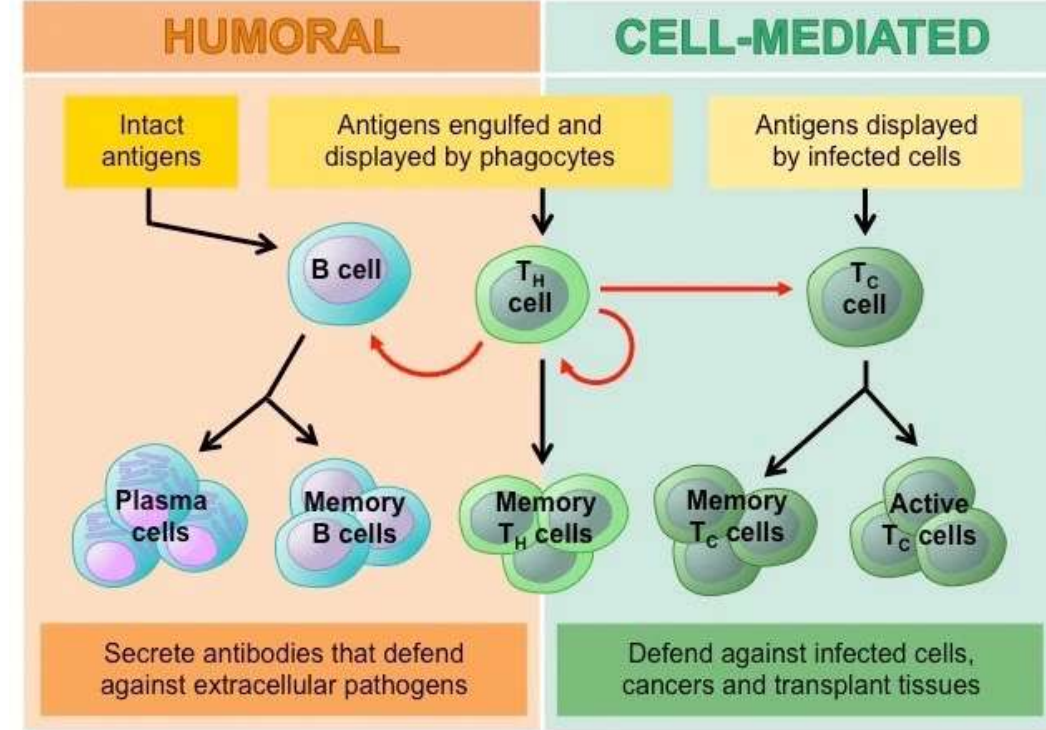
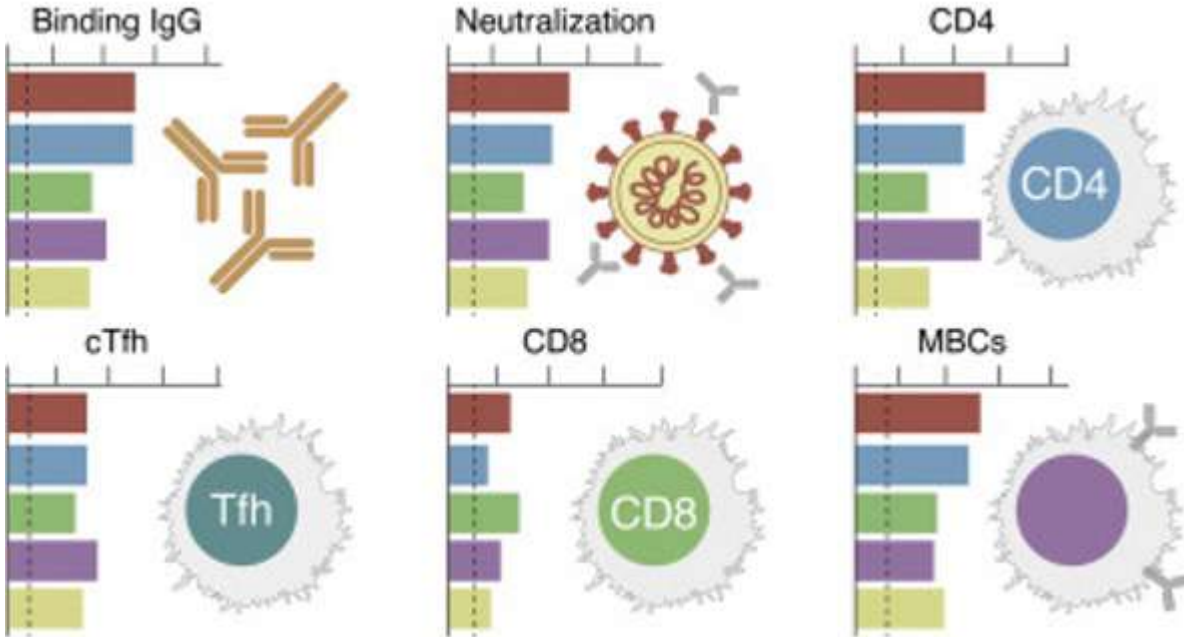
İmmünojenisitenin Belirleyicileri

- Hangi antijene maruz kalındığı
 - Antijenin fiziksel ve kimyasal özellikleri
 - Veriliş yolu (IM, SK, İD...)
 - Dozlar ve doz aralıkları,
 - Adjuvan varlığı
- Aşılanan bireyin genetik özellikleri,
- Aşılanan bireyin fizyolojik durumu
 - Yaş,
 - Beslenme durumu,
 - Cinsiyet,
 - Gebelik,
 - Stres,
 - İnfeksiyon durumu,
 - İmmün durumu (immün yetmezlik ?)



Aşı yanıtlarının ölçülmesi

- Aşı yanıtları;
 - Hümorale yanıt
 - Hücresele yanıt



Aşı yanıtlarının ölçülmesi-2

- Çoğunlukla aşı yanıtları.....Serumda spesifik antikor varlığı
- Kızamık ve kızamıkçık aşıları.....Serum antikor varlığı klinik hastalıktan korunma ile korelasyon +
- Ancak serokonversiyon yalnızca **humoral immün yanıt** parametresi***
- **Sekonder aşı yanıtı...**Önceden bağışıklık yanıtı olan birinde zamanla kaybolması,
 - Antijenle tekrar karşılaşmamış
 - Memory T ve B lenf KAYBI (Örn. KHN,...)



Aşı yanıtlarının ölçülmesi-3

- Antikor devamlılığı... Antikor varlığı ile klinik korumanın korele olduğu aşılar için önemli ***
- **Ölçülebilir antikor yokluğu korunma olmadığı anlamına gelmez !!!**
- Titre azalması/ negatifleşme....Booster doz....Hızlı ikincil yanıt
 - Hızlı IgG artışı
 - Eşlik eden anlamlı IgM artışı (-) } ****Kalıcı bağışıklık**

Humoral yanıtın ölçülmesi

- Antikor düzeylerinin ölçülmesi
 - EIA,ELISA ile IgG ölçümü
- Fonksiyonel antikor düzeyi***
 - Nötralizan antikor düzeylerinin ölçülmesi
 - Opsonofagositik antikor düzeylerinin ölçülmesi
 - Bakteriyel polisakkarit aşılarda*!!!
 - Bakterisidal antikor düzeylerinin ölçülmesi
 - Meningokok aşısı, kolera aşısı !!

Humoral yanıtın ölçülmesi-2

Nötralizan antikor ölçümü:

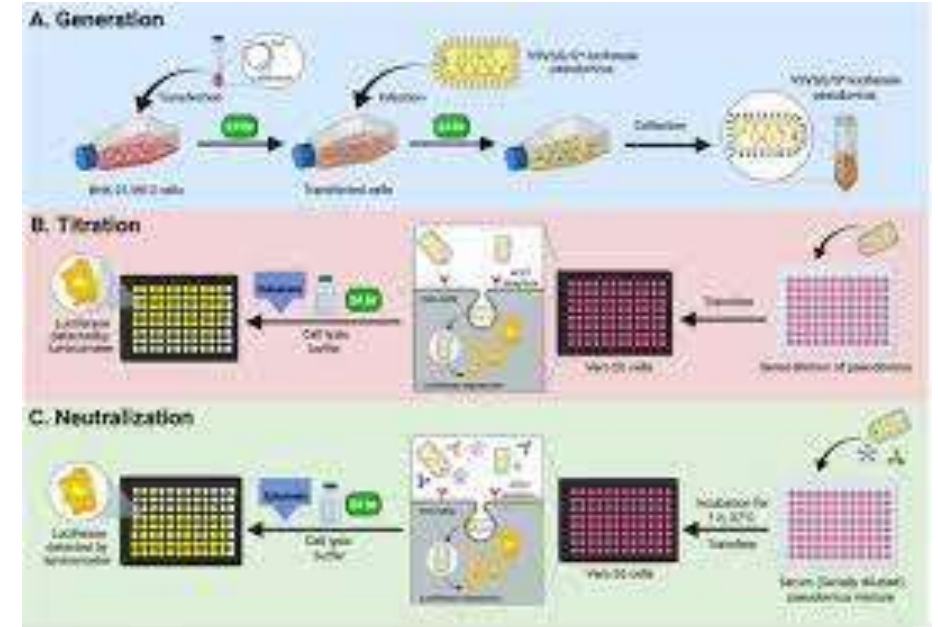
Amaç: Nötralizan/ koruyucu özelliği olan antikor tayini

Altın standart: **Plaque reduction neutralization test (PRNT)**

- Serum örneği seri dilüsyonlar... virusla inkübasyon
- İmmün kompleks-hücre kültürü inkübasyonu
- Sitopatik etki ölçümü
- Dezavantajları: Uzun süreli – sınırlı sayıda örnek

Alternatif yöntemler:

- Focus reduction neutralization test (FRNT)
(kısa süreli- daha fazla örnek)



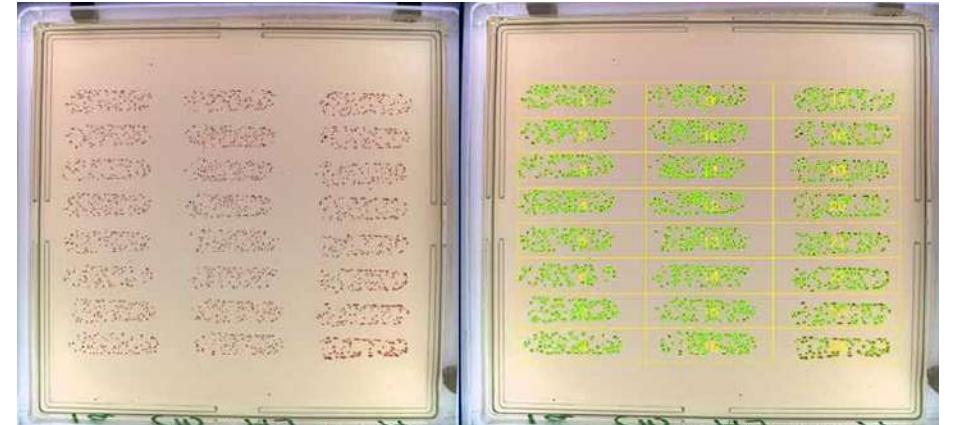
Humoral yanıtın ölçülmesi-3

Opsonofagositik antikor ölçümü:

(The opsonophagocytic killing (OPK) assay)

Amaç: Aşıya bağlı oluşan antikorların işlevsel kapasitelerini ölçmek

- İn vitro analiz
- Aşı kaynaklı antikorların etkili kompleman birikimini ve ardından opsonofagositik öldürmeyi sağlayıp sağlamadığını gösterir
- Bakteri suşları ile serum + komplemaninkübasyon..... Plakalara farklı dilüsyonlarda ekim...inkübasyon
- Koloni sayıları kontrollerle karşılaştırma
- Serumdaki antikorların öldürme yüzdesi***

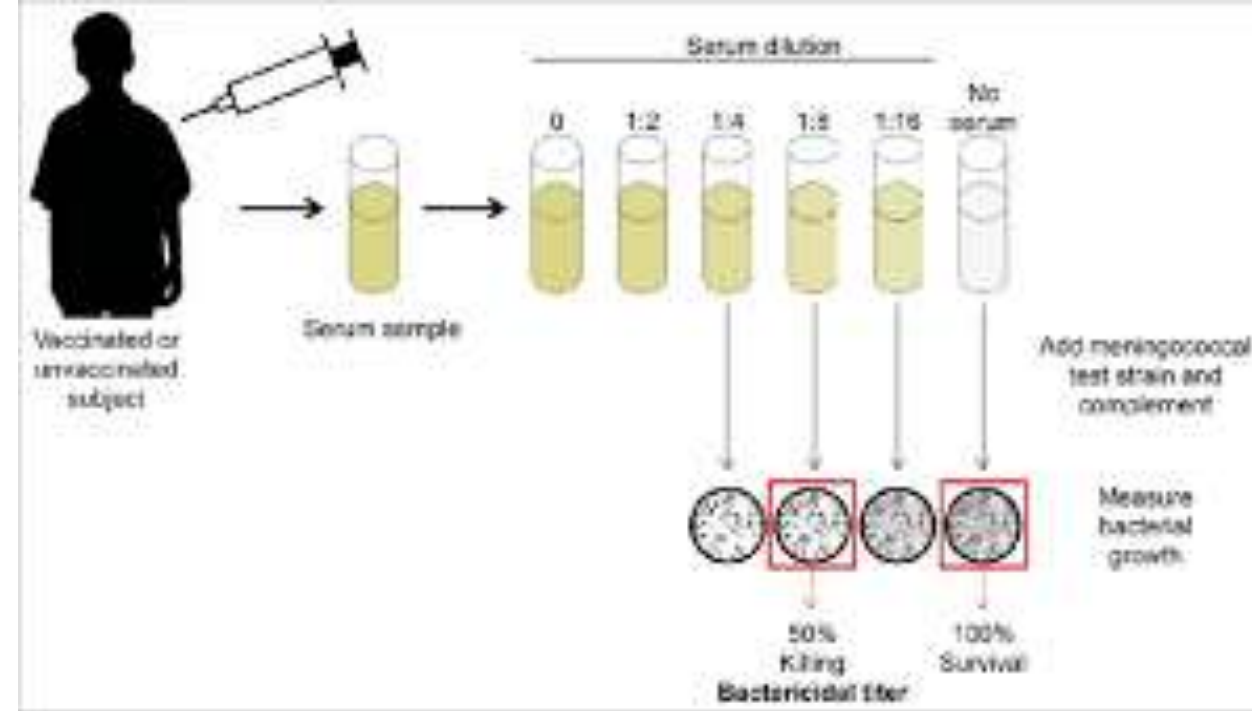


Humoral yanıtın ölçülmesi-4

Bakterisidal antikor ölçümü

Amaç: Kompleman aracılı bakteri lizisini göstermek

- In vitro analiz
- Aşı kaynaklı ya da geçirilmiş infeksiyonlara bağlı oluşan antikorlar olabilir
- Dolaşımdaki antikorların, kompleman varlığında bakterileri lizise uğratma yeteneğini ölçer; (klasik yol - kompleman aracılı öldürme)



Hücreyel yanıtların ölçülmesi

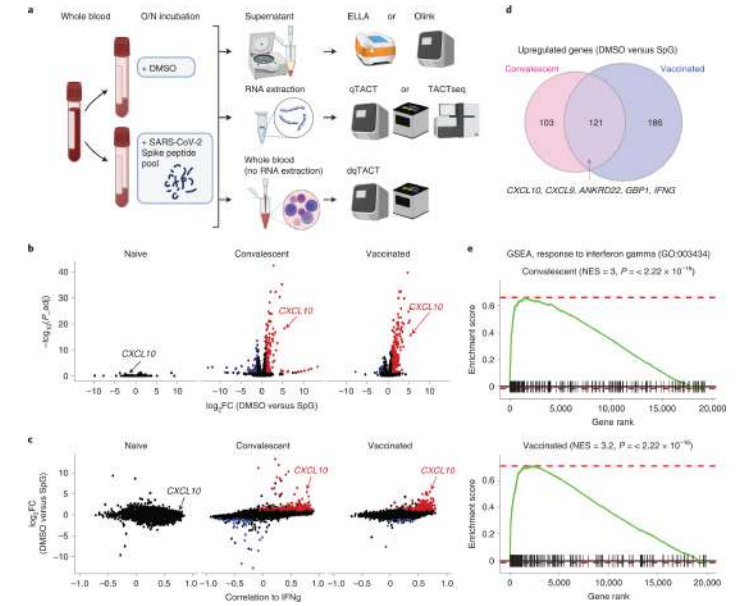
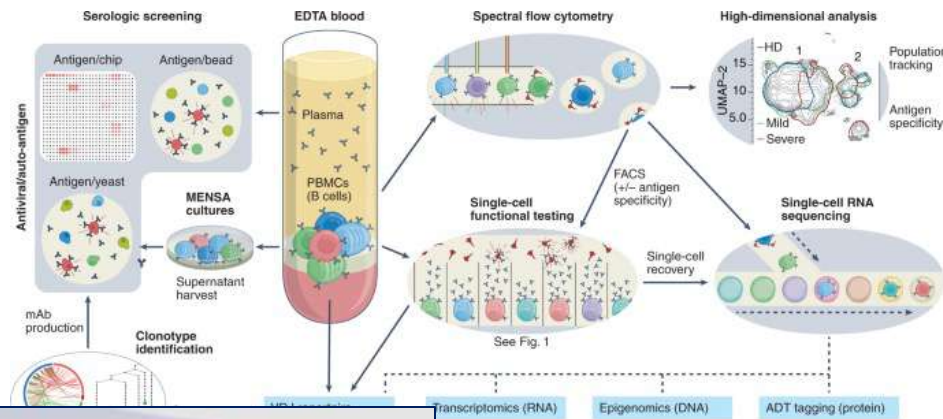
- Hafıza CD4 ve/veya CD8 eksprese eden T hücreleri veya hafıza B hücreleri tarafından yönlendirilen immün reaksiyon
- Hücre aracılı bağışıklığın ölçümü, birçok durumda devam eden korumanın derecesinin değerlendirilmesinde yardımcı !!!
- Koşullar genellikle araştırma laboratuvarlarıyla sınırlıdır ve sınırlı aşular ile çalışmalar !!

Hücresel yanıtların ölçülmesi-2

- Bazı viral infeksiyonlar için ölçülebilen antikorların rolü ve koruyucu etkinliği ???

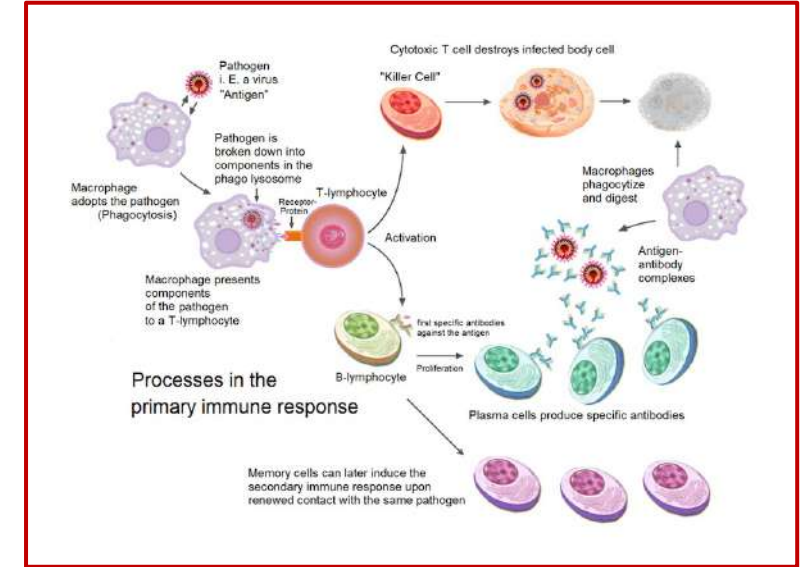
(Herpes zoster, kabakulak ve boğmaca gibi)

- Hepatit B gibi koruyucu antikor düzeyleri saptanamaz hale geldikten sonra devam eden koruma ???!!!



Hücresel yanıtların ölçülmesi-3

1. Sitokin yanıtlarının ölçümü
2. Fenotipleme ve T/B lenfosit karakterizasyonu
3. T hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi
4. Antijen spesifik sitotoksisite değerlendirilmesi
5. Diferansiyel gen ya da mikro RNA ekspresyonunu içeren yeni sistem biyolojisi yaklaşımları



Hücreyel yanıtların ölçülmesi-4

A. Sitokin temelli ölçümler

ELISPOT (enzyme-linked immunosorbent spot)

- Kan örneğinden (veya mevcut diğer bazı hücrelerden) izole edilen B veya T hücreleri antijen ile uyarılır.
- Aktive hücrelerden sitokin/ antikor salınımı
- Test plağı bu sitokin/ antikorları yakalayacak antikorlar ile kaplı
- Bağlanan antikorların enzim aracılı görüntülenmesi
- FloroSpot teknolojisi...aynı plakta çoklu sitokin/ antikor değerlendirmesine olanak tanır

Hücresel yanıtların ölçülmesi-5

ICS (Intracellular Cytokine Staining)

- Flowsitometri yöntemiyle antijen spesifik sitokin salınımının görüntülenmesi
- Spesifik yüzey markerları olan hücreler (Th1, Th2, Th17, CD4+ or CD8+)
- Hafıza hücre markerları CD45RO, CD62L, CCR7
- Yüzek markerlarının varlığı ya da yokluğuna göre sonuçlanır.

Hücresel yanıtların ölçülmesi-6

CBA or CTA (cytometric bead array)

- Flow sitometri temeline dayalı başka bir yöntemdir.
- Serum örneğinde sitokin ve kemokinlerin eş zamanlı ölçümleri için antikor kaplı boncuklar kullanılır
- Sınırlı serum örneğinde birden fazla sitokin tayini eş zamanlı yapılabilir

Flow Cytometry/Cell Phenotyping Assay

- Antijen spesifik hücresel yanıtların kantitatif ölçümü imkanı tanıyan güçlü teknoloji

(Hem hücre tipini hem de aktivasyon durumunu belirleme)

- En önemli avantajı hızlı ve çok parametrelili değerlendirme.

Hücresel yanıtların ölçülmesi-7

B. İmmün fenotipleme

• Tetramer staining

-Antijen spesifik CD8+ ve CD4+ lenfositlerin tayininde kullanılan yöntem

-Tetramerler, antijen spesifik T hücre reseptörlerine bağlanabilen sentetik MHC-spesifik antijen kompleksleri

• Time-of-flight mass spectrophotometry (CyTOF)

- CyTOF sitometri temelli bir teknoloji

- Tek basamakta 60 parametre kapasiteli (yüzey markerları, aktivasyon markerları ve hücre içi moleküller dahil)

-Floresan işaretli antikolar yerine ağır metal işaretli antikolar+,
(Flowsitometride karşılaşılabilecek spektral örtüşme problemi yok)

Hücresel yanıtların ölçülmesi-7

Lenfosit proliferasyon testleri (LPA)

- Antijenle (protein veya peptidler) hücre kültürü stimülasyonunu takiben tam kanın veya PBMC'nin çoğalması
- Hücre sayısı ya da oran değişikliğihücresel aktivasyon ölçümü***

Cell-mediated cytotoxicity assays

Biyolojik sistemler.....

Standardization of an Opsonophagocytic Assay for the Measurement of Functional Antibody Activity against *Streptococcus pneumoniae* Using Differentiated HL-60 Cells


SANDRA ROMERO-STEINER,^{1,2} DANIEL LIBUTTI,¹ LORNA B. PAIS,¹ JANET DYKES,¹
PORTER ANDERSON,³ JOHN C. WHITIN,³ HARRY L. KEYSERLING,²
AND GEORGE M. CARLONE^{1*}

*Division of Bacterial and Mycotic Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia 30333*¹; *Department of Pediatrics, University of Rochester Medical Center, Rochester, New York 14642*³; and *Department of Pediatrics, Emory University, Atlanta, Georgia 30322*²

Received 15 November 1996/Returned for modification 2 February 1997/Accepted 1 April 1997

[Home](#) > [Group A Streptococcus](#) > Protocol

An Opsonophagocytic Killing Assay for the Evaluation of Group A Streptococcus Vaccine Antisera

[Reuben McGregor](#) , [Scott Jones](#), [Raynes M Jeremy](#), [David Goldblatt](#) & [Nicole J. Moreland](#)

Protocol | [First Online: 20 May 2020](#)

1320 Accesses | **4** Citations | **1** Altmetric

Part of the [Methods in Molecular Biology](#) book series (MIMB, volume 2136)



Longevity of vaccine protection: Immunological mechanism, assessment methods, and improving strategy

Zhian Chen^{1,2} | Xin Gao² | Di Yu^{1,2}

The protection duration and correlates of protection of major vaccines

Vaccines	Vaccine type	Estimated protection duration	Major CoP	References
Diphtheria	Toxoid subunit	Over 20 years	Antibody titer measured by neutralizing assays	[66]
Hepatitis B	Subunit	Over 10 years	Antibody titer measured by ELISA	[95]
HPV	VLP	Over 10 years	Antibody titer measured by ELISA	[70]
Influenza	Killed virus, subunit	Decline within 1 year	Antibody titer measured by hemagglutination Inhibition assay	[7, 67]
Measles	Live-attenuated	Over 10 years	Antibody titer measured by ELISA	[66]
Meningococcus	Subunit	Decline within 1 year in infants	Antibody titer measured by bactericidal assays	[96]
Mumps	Live-attenuated	Decline within 10 years	Antibody titer measured by neutralizing assays	[66]
Pertussis acellular	Subunit	Decline within 2 years	Antibody titer measured by ELISA	[97]
Poliomyelitis (Sabin)	Live-attenuated	Over 10 years	Antibody titer measured by neutralizing assays	[98]
Rubella	Live-attenuated	Over 20 years	Antibody titer measured by ELISA	
Smallpox	Live-attenuated	Over 10 years	Antibody titer measured by neutralizing assays	[66]
Tetanus	Toxoid subunit	Over 20 years	Antibody titer measured by neutralizing assays	
Tuberculosis (BCG)	Live-attenuated	Over 10 years	CD4 ⁺ T-cell responses	[98]
Yellow fever	Live-attenuated	Over 10 years	Antibody titer measured by neutralizing assays	[99]

Cell mediated immunity (CMI)

Characteristics of the immunoassays						
Assays	Sample	Read- out	Sensi- tivity	High throughput	Advantages	Disadvantages
Cytokine-based assays						
ELISA	Plasma or serum	Total T cell response	++	+	Simple Well validated	One cytokine per assay No cell phenotyping (subsets or activation markers) Low sensitivity for low frequency cells
CBA	Plasma or serum	Total T cell response	++	+++	Multiplexing capability Require small samples sizes	Low sensitivity for low-frequency cells No cell phenotyping
Luminex/ MagPix	Plasma or serum	Cytokines Multiparameter readout	++	+++	Multiplexing capability RNA probing Dedicated platform for analyzing data	Dedicated instrumentation and trained personnel Low sensitivity for low-frequency cells. No phenotyping Requires cell culture
ELISpot FluoroSpot (T and B cells)	PBMC	Total T-cell response Number of secreting cells. Single or dual readout	+++	+++	Qualitative and quantitative Most sensitive technique for low-frequency cells No cell fixation: cells can be restudied	No phenotyping Single- or dual detection (no multiplexing)
Intracellular cytokine staining (ICS)	Whole blood or PBMC	Surface and intra-cellular markers. Multiparameter	+++	++ (+++)	Multiple cytokines at single cell level. Cell phenotyping (subsets, activation markers)	Cells cannot be sorted for further analysis due to fixation and permeabilization. Validated for HIV clinical trials (SOPs)

Characteristics of the immunoassays

Assays	Sample	Read- out	Sensi- tivity	High throughput	Advantages	Disadvantages
Cell phenotyping						
Tetramer staining	Whole blood or PBMC	Epitope specific CD8 and CD4	+++	+	Identify antigen-specific T-cell population Can use to enrich for rare cell populations	Limited by peptide choice Requires individual MHC allele typing Not well validated in human studies
Pheno- typing	Whole blood or PBMC	Multiparameter - Differentiation			Phenotypic characterization of immune cells; T, B, NK, others and effector, central memory cells, etc	SOPs
Lymphoproliferation assays (LPA)						
³ H- thymidine Incorpo- ration	PBMC	Total T cell response. Single parameter	++++	++	Conventional Well validated	Radioisotope Semi-quantitative No phenotyping
CFSE (FC- based)	PBMC	Multiparameter parameter Functional and differentiation	++	++	Non-radioactive Cell phenotyping possible. Long term (4-6 days) in vitro stimulation	CFSE is toxic Relatively insensitive. Lack of standardization. Long term (4-6 days) in vitro stimulation
Ki67 (FC-based)	PBMC		++	++	Non-radioactive, non-toxic. Does not require cell culture. Cell phenotyping possible	Cells must have recently proliferated Cells must be fixed Relatively insensitive
FASCIA, FC-LPA (FC-based)	Whole blood or PBMC	Blast-formation	+++	++	Non-radioactive, non-toxic. Cell phenotyping possible	Long term (4-6 days) in vitro stimulation Sensitive
Cytotoxicity assays (CTL)						
Chromium release (Cr51)	PBMC	Lytic activity. T- or NK cell-mediated activity	+	+	Conventional Directly measures cytotoxic activity	Radioactive No cell phenotyping
CTL/flow (FC-based)			++	++	Allows comprehensive phenotyping of CTLs	

Review

Harnessing Cellular Immunity for Vaccination against Respiratory Viruses

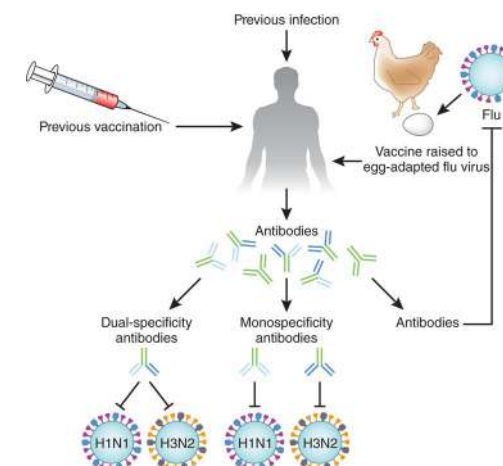
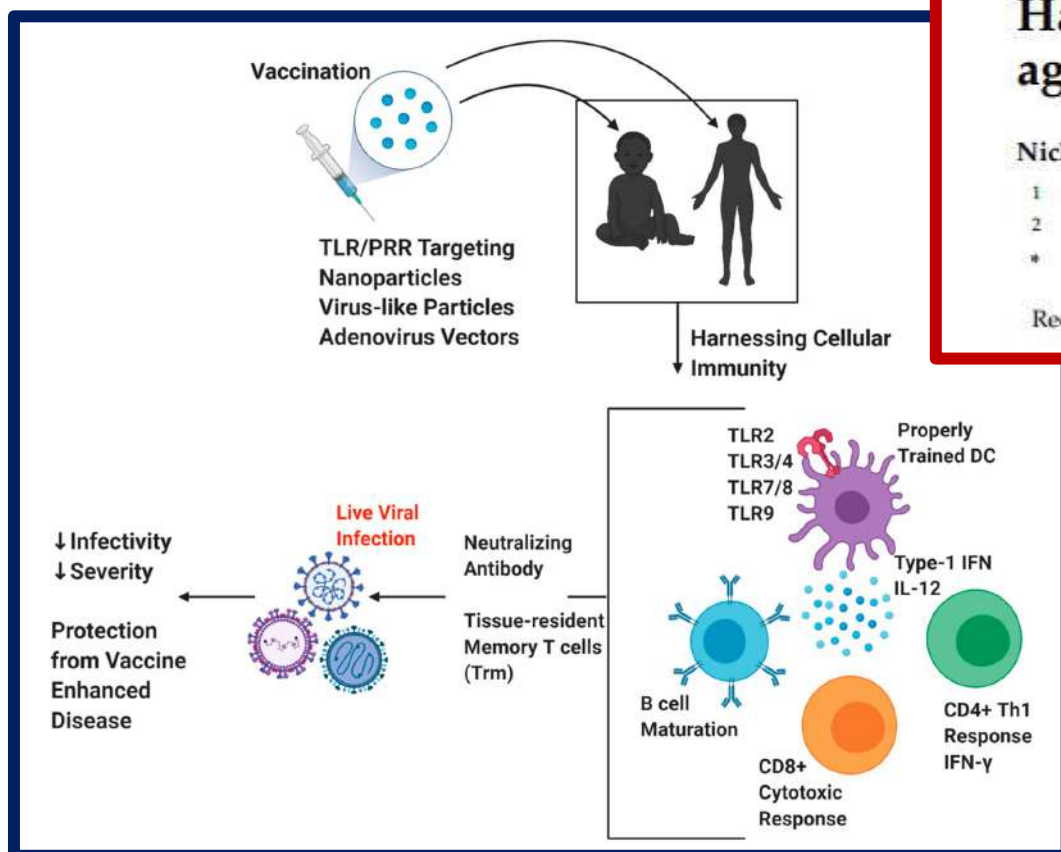
Nicholas W. Lukacs ^{1,2} and Carrie-Anne Malinczak ^{1,*}

¹ Department of Pathology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA; nlukacs@med.umich.edu

² Mary H. Weiser Food Allergy Center, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

* Correspondence: carrieam@med.umich.edu

Received: 25 November 2020; Accepted: 14 December 2020; Published: 21 December 2020



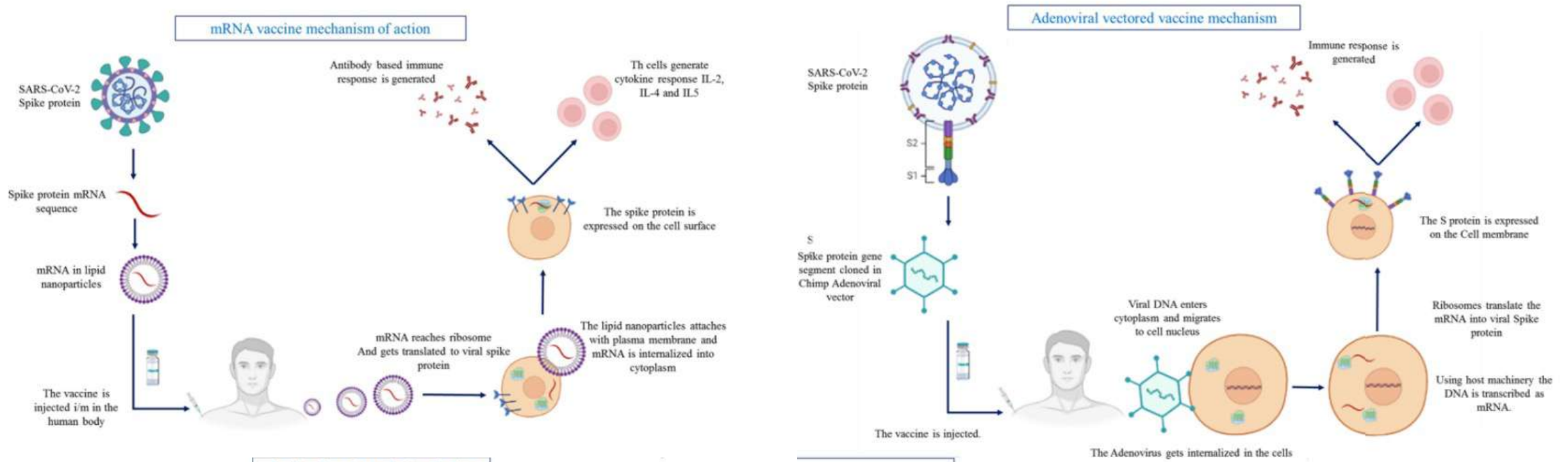


Figure 1. The mechanism of action by which immune response is generated by mRNA vaccine, adenoviral vaccines, and inactivated vaccines. Figure created using Biorender (<https://biorender.com/> accessed on 6 April 2022).

Review

Immune Response to SARS-CoV-2 Vaccines

Navya Bellamkonda^{1,†}, Upendra Pradeep Lambe^{2,†}, Sonali Sawant², Shyam Sundar Nandi^{2,*}, Chiranjib Chakraborty³ and Deepak Shukla^{4,*}

¹ Department of Ophthalmology and Visual Sciences, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL 60612, USA; navyab3@uic.edu

² ICMR-NIV, Mumbai Unit, A. D. Road, Parol, Mumbai 400012, India; upondralambe69@gmail.com (U.P.L.); ercintsonali@gmail.com (S.S.)

³ School of Life Science and Biotechnology, Adamas University, Kolkata 700126, India; dchiranjib@yahoo.com

⁴ Department of Microbiology and Immunology, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL 60612, USA

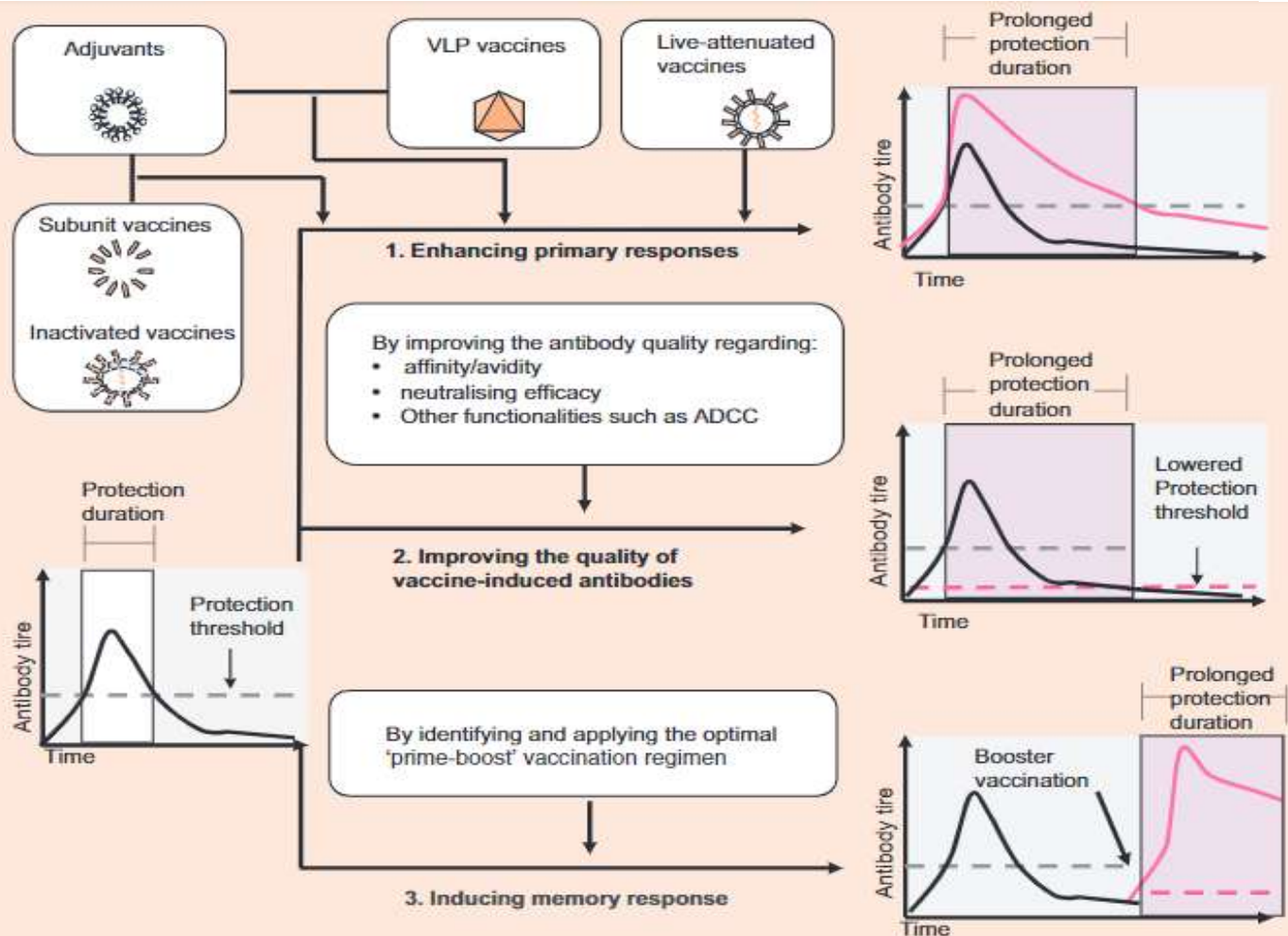
* Correspondence: nandibtech@gmail.com (S.S.N.); dshukla@uic.edu (D.S.)

† These authors contributed equally to this work.

What determines the longevity of vaccine protection and how to improve it?

Longevity of vaccine protection: Immunological mechanism, assessment methods, and improving strategy

Zhian Chen^{1,2} | Xin Gao² | Di Yu^{1,2}



Sonuç olarak;

- Aşı yanıtlarının ölçümü, aşuların geliştirilmesinden sonrasındaki bağışıklığın devamlılığının takibine kadar farklı aşamalarda gündeme gelmekte
- Bazı aşı yanıtlarında hümmoral yanıtların bazılarında hüccresel yanıtların ölçümü önemli
- Antikor yokluğu her zaman bağışıklığın olmadığı anlamına gelmemekte
- Fonksiyonel antikor ölçümleri !
- Hüccresel yanıtların ölçümlerinin kolaylaştırılması ...



BAŞKENT
ÜNİVERSİTESİ



TEŞEKKÜRLER

