

İMMÜNOKİMYASAL (İMMÜNOASSAY) YÖNTEMLER

İmmünokimyasal yöntem nedir?

- **Antijen-antikor** etkileşimine dayalı analiz yöntemlerine **immünokimyasal yöntemler** denir.
- Bu yöntemlerle örnek materyal içerisinde özgül **antikor** veya özgül **antijen (veya hapten)** saptanabilir.
- Antikorların antijenlere mükemmel bağlanma özelliği ile yüksek spesifite ve affinite de olması, çeşitli yöntemler tarafından maddelerin belirlenmesi ve ölçümünü sağlar .
- İmmünoassay yöntemler çok duyarlı yöntemlerdir (0,1 pg/ml'den daha düşük miktardaki analit tespit edilebilmektedir)
- Bu deneyler; birçok ilacın, biyolojik maddelerin (hormonlar, immünglobülinler, komplementler, lipoproteinler, akut faz proteinleri) enfeksiyöz ajanların antikorlara konak cevabının varlığını saptamak ve miktarını belirlemek için kullanılır.
- Bu yöntemlerin **bir çoğu otomatize** edilmiştir

İmmünokimyasal Tanımlamalar

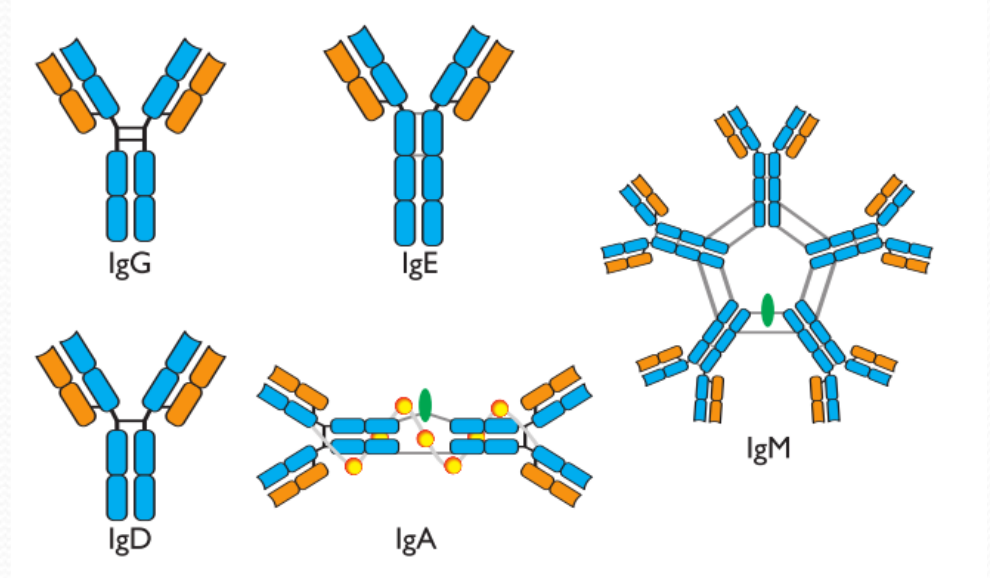
- **Antijen(Ag):** Organizma için yabancı olan ve organizmaya girdiğinde immün yanıt oluşturan (antikor oluşumuna neden olan) bir protein veya genellikle protein olan taşıyıcıya bağlı bir maddedir (Antikorla reaksiyona girebilen proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler, lipitler, doğal veya sentetik herhangi bir maddedir).
- **Hapten :** Kendi başına immün yanıt oluşturmayan fakat bir immünolojik taşıyıcı ile birleştiği zaman antikor yanıtını uyaran kimyasal belirleyicilerdir.
- **Antikor(Ab):** Doğal veya sentetik antijenlere spesifik olarak bağlanabilen **immünglobinlerdir.**
- **İmmünglobin G (IgG)** kullanılan en yaygın immünokimyasal reaktiftir.

- **Epitop (antijenik determinant):** Antijenin üzerinde bulunan ve komplementer antikoru bağlayan özel bölgeye denir.
- **Paratop:** Antikorum üzerinde bulunan ve antijen üzerindeki epitop ile birleşen bölgeye denir.
- **Affinite:** Antikorum bağlanma yeri (paratop) ve antijen üzerindeki ona uyan epitopun etkileşiminin gücüdür.

- **Avidite:** Antijenle ile antikor arasındaki bağlanmanın gücünü ifade eder ve antikor üzerindeki bütün bireysel bağlanma yerleri bağlanma affinitelerinin toplamını kapsar.
- **Spesifite:** Antikorum sadece kendisine özgü antijenle bağlanmasıdır. Antikorum spesifikite özelliği onun reaktif olarak kullanılıp kullanılamayacağını belirler.
- **Cross Reaktivite (çapraz bağlanma):** Antikorum benzer başka antijenlerle reaksiyona girebilmesine denir. Spesifiteyi düşürdüğünden istenen bir özellik değildir.

Antikorlar

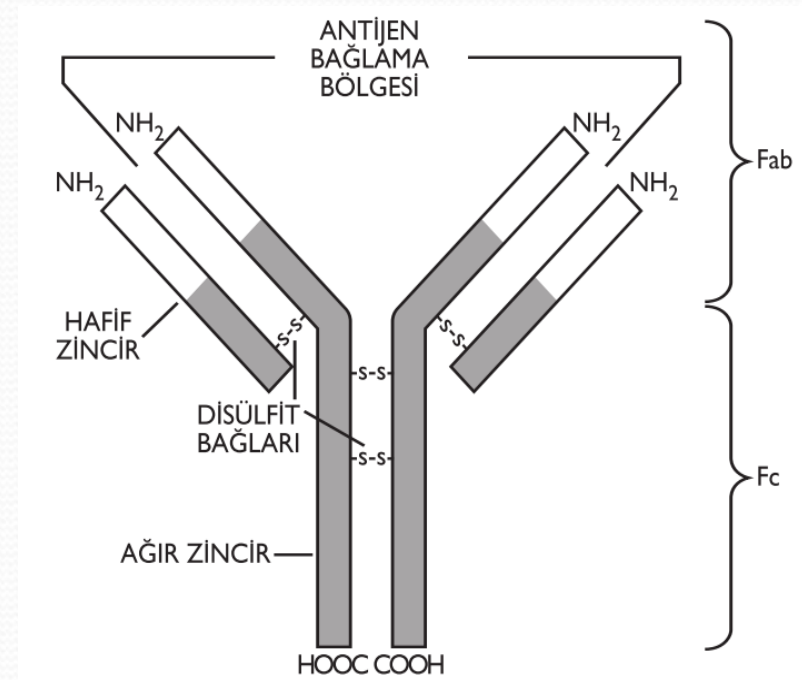
- İnsanlarda 5 sınıf immünoglobulin bulunmaktadır
- IgA dimer, Ig M pentamer, diğerleri monomer yapıdadır.
- **IgG**, en yaygın kullanılan immünokimyasal reaktiftir.



İmmünoglobulinler, organizmanın bağışıklık sistemi tarafından; kendisine ait olmayan organik yapılara karşı (antijen) geliştirilen glikoprotein yapısındaki moleküllerdir.

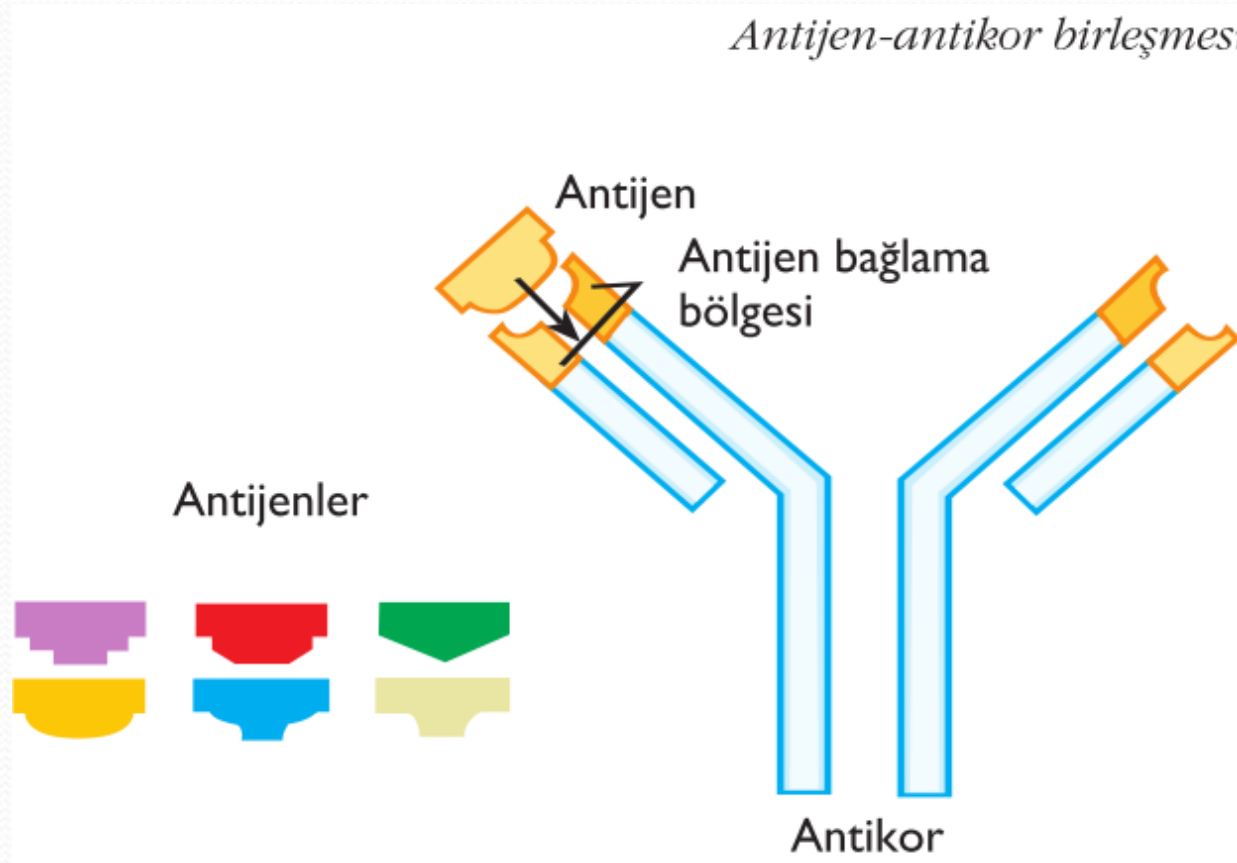
IgG'nin yapısı

- IgG, iki uzun ağır (heavy, H) ve iki kısa hafif (light, L) polipeptit zincirler bulunduran heterodimer yapıda glikoproteindir
 - Zincirlerarası disülfid bağları çift zincirleri bir arada tutar ve simetrik bir molekül oluşturur.
 - Her zincirin aminoterminal tarafta kalan iki parça birbirine eşit olup özgül antijenle birleşme özelliğine sahiptir. Bu parçalara, (değişebilir aminoasit dizisine sahiptir) **antijen bağlayan kısım** (fragment of antigen binding, **Fab**) denir ve belirli bir antikora karşı antijenin özgüllüğünü belirler.
 - Diğer kısım sabittir, kristalize olabilir (fragment of crystallizing, **Fc**).
-
- Ağır ve hafif zincirlerin şekilde beyaz gösterilen kısımları farklı genler tarafından yönetilir bu nedenle **değişkendir (Variable, V)**, ve siyah gösterilen kısımları tek gen tarafından yönetilir ve **sabittir (Constant, C)**



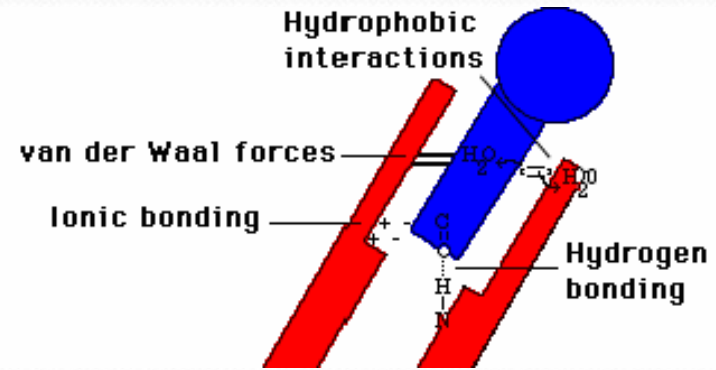
Antijen-antikor birleşmesinin özellikleri

- Antijen-antikor birleşmesi **spesifik** bir olaydır. Fakat birbirine benzeyen gruplar arasında da birleşme olabilir. Buna **çapraz reaksiyon** adı verilir.



- Antijen-antikor birleşmesi kimyasal bir olaydır.
- Bu birleşmede **nonkovalent** (kovalent olmayan) bağlar rol oynar:

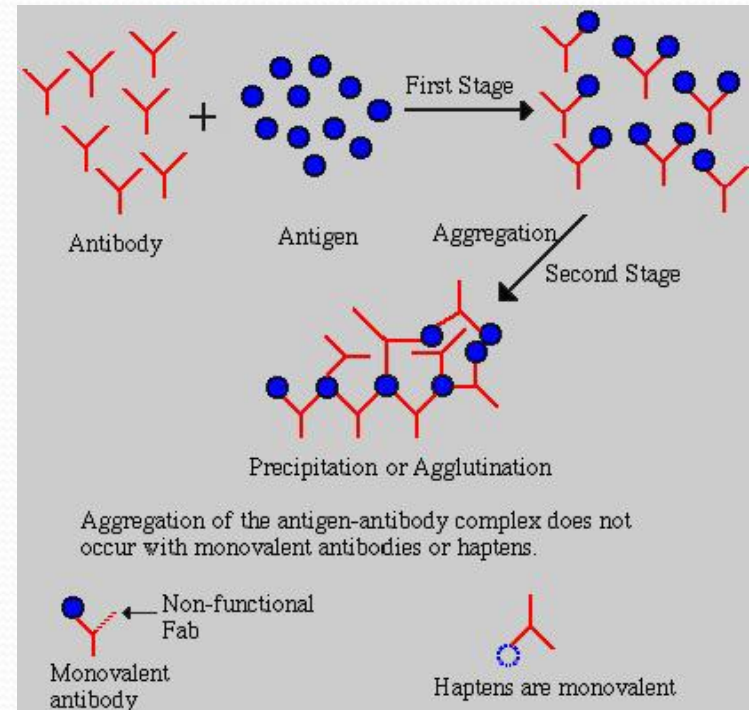
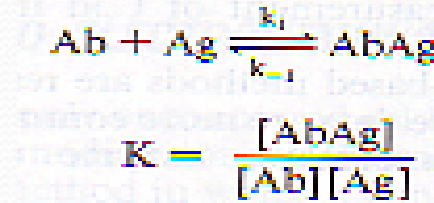
- Hidrofobik etkileşimler
- İyonik bağlanma
- Hidrojen bağı
- Vander Waals kuvvetleri



- Antijen ve antikor molekülü tam olarak reaksiyona girer ve birleşen moleküller parçalanmazlar

- Antijen-antikor birleşmesi reversibl (dönüşümlü) bir olaydır.
- Antijen ve antikor multivalan (çok değerlikli) olduklarından ve reaksiyon için bütün valansların doyması şart olmadığından değişik oranlarda birleşir

Antijen ve antikor birden fazla epitop ve paratop taşıyabilir. Antijen üzerindeki efektif epitop sayısı onun **valansını** verir. Antikor üzerindeki efektif paratop sayısı da **antikorum valansını** verir.



- Antijen-antikor birleşmesinde
 - pH,
 - Tuz konsantrasyonu ve
 - Isının etkisi vardır.

İmmünokimyasal tekniklerin sınıflandırılması

1. İşaret gerektirmeyen immünoassay

- Presipitasyon immünoassay
- Partikül immünoassay (Aglütinasyon testi)

Assay = Ölçüm

2. İşaretli immünoassay: Ölçüm için radyoaktif izotopların, enzimlerin ve lüminesans yayan maddelerin (işaretlerin) kullanıldığı yöntemlerdir.

- Radioimmunoassay(RIA)
- Enzim immunoassay(EIA)
- Floresan immunoassay (FIA)
- Kemilüminesans immunoassay
- Elektrokemilüminesans immunoassay

İŞARET GEREKTİRMİYEN İMMÜNOASSAY

İşaret gerektirmeyen immünoassay

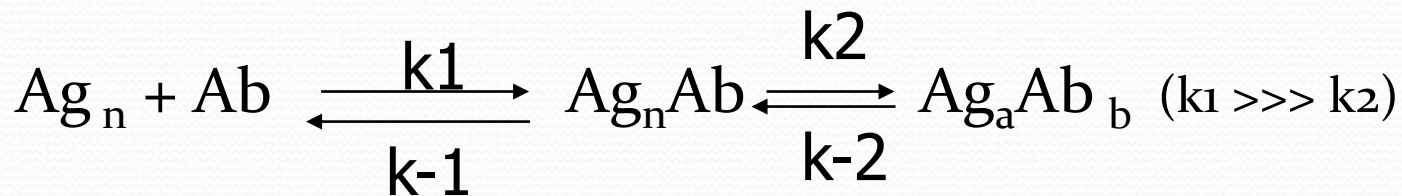
- Presipitasyon immünoassay
- Partikül immünoassay (Aglütinasyon testi)

Presipitasyon

- Antijenler antikorlarla reaksiyona girerek **immun kompleksleri** oluştururlar.
- Suda çözünen bir antijen ile spesifik antikorun karıştırılmasıyla suda çözünmeyen geniş **antijen-antikor komplekslerinin** meydana gelmesine **presipitasyon (çökme)** ve oluşan çökeltiye **presipitat** denir.
- Presipitat bir likit fazda (tüpte) veya jelde oluşturulabilir .
- Presipitasyon solüsyonda ve tüpte yapıldığında **presipitasyon testi**, agar jelde yapıldığında **jel presipitasyon testi** olarak adlandırılır.

Antijen-Antikor kompleksi

- Antijen antikor bağlanması statik değildir. Üç evrede ilerleyen bir denge reaksiyonudur.



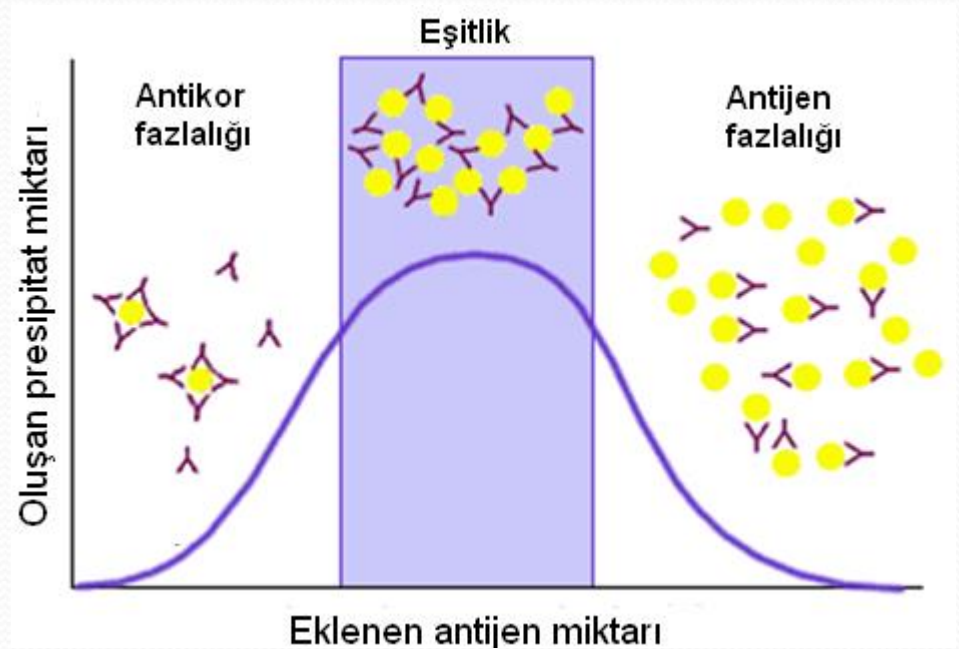
- n: Her moleküldeki epitop sayısı
- a,b: kompleksteki Ag ve Ab molekülü sayısı
- **1.Evre:** Başlangıç [Multivalan (çok değerlikli) bir Ag ile bivalan (iki değerlikli) bir Ab'nin hızla birleşmesi]
- **2.Evre:** Kompleksin büyümesi (daha yavaştır).
- **3.Evre:** Presipitat oluşumu (kritik büyüklüğe ulaşan kompleksin çökmesi).
- Bu reaksiyonların hızı elektrolit konsantrasyonu, pH, sıcaklık ile birlikte Ag ve Ab tipi ve Ab bağlanma affinitesine bağlıdır.

Antijen-Antikor kompleksi

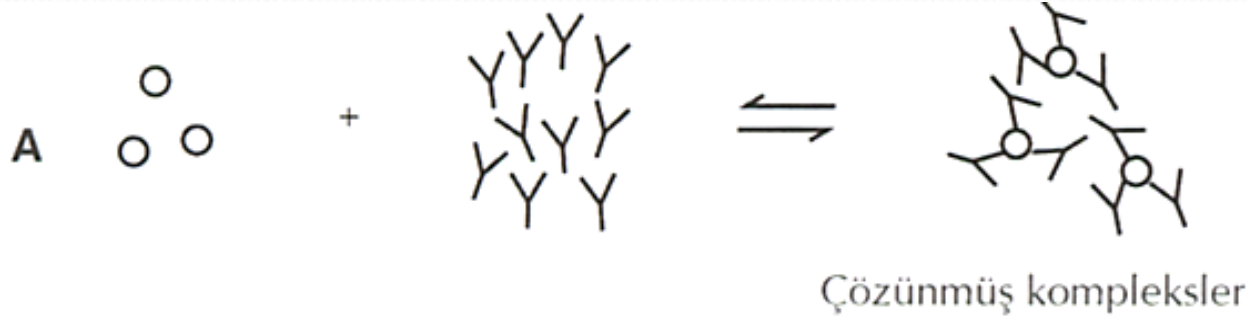
- İmmün kompleksin büyüklüğü, üzerindeki epitop sayısı ve bu epitoplara bağlanan antikor sayısı ile orantılı olarak artar.
- Antijen-antikor birleşmesi birbirine denk sayılarda olabileceği gibi, biri fazla da olabilir.

Presipitasyona dayalı deneylerde Ag ve Ab konsantrasyonu önemlidir

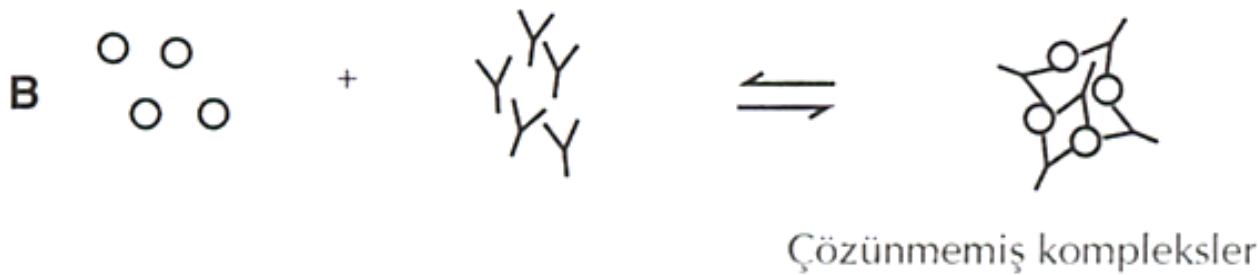
- Antijen veya antikordan herhangi biri çok fazla olduğunda küçük ve genellikle solubl (çözünen) kompleksler meydana gelir
- Büyük ve suda çözünmeyen kompleksler (presipitat) antijen-antikor oranları optimal (ikisinin konsantrasyonu birbirine eşit veya yakın iken) olduğunda meydana gelir.



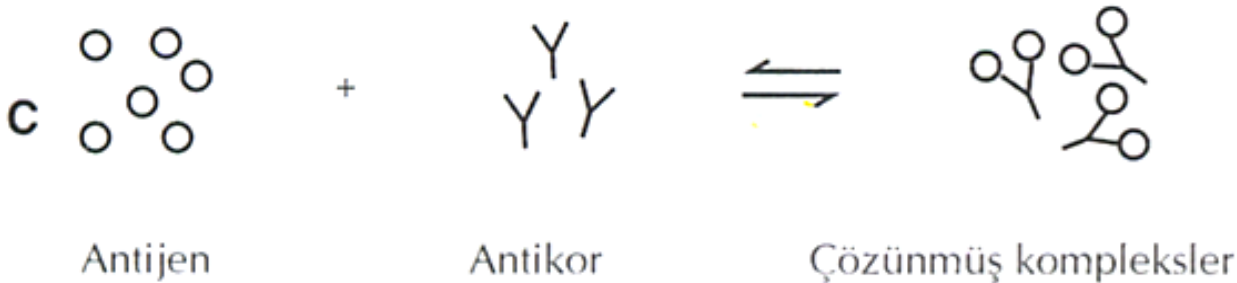
- Ab ve Ag oranlarına göre presipitasyon



Antikor fazlalığı
Bütün antijenik bölgeler
antikorlarla kaplanmıştır
ve kafes oluşumu inhibe
edilmiştir.



Eşitlik bölgesi
(Optimal oran)
Her bir antijen molekülü
başına 2 veya 3 antikor
molekülü olduğu zaman
maksimum kafes
formasyonu oluşur ve
böylece maksimum
presipitasyon oluşur.



Antijen fazlalığı
Bütün antikor bölgeleri
antijenlerle doyurulmuştur.
Üçlüler (2 antijen+1 antikor)
partiküllerce elde edilmiş
maksimum büyüklüktedir.
Çökelti oluşmaz.

Presipitasyon immünoassay

A. Kalitatif presipitasyon yöntemler

1. Pasif jel difüzyon
2. İmmünoelektroforez
3. İmmünofiksasyon
4. Western blot

B. Kantitatif presipitasyon yöntemler

1. Radyal immünodifüzyon
2. Elektroimmünodifüzyon
3. Nefelometrik ve türbidimetrik immünoassay

KALİTATİF PRESİPİTASYON YÖNTEMLER

1.Pasif Jel Difüzyonu

- Jelde presipitasyonda (immünodifüzyon), presipitasyon reaksiyonları antijen ve antikor moleküllerinin birbirine doğru yayılabildiği agar veya agaroz jel gibi yarı katı ortamlarda yapılır.
- Böyle bir ortamda birbirine doğru yayılan antijen ve antikor optimal oranda bulundukları bölgelerde karşılaştıklarında bir presipitasyon çizgisi veya bandı oluşturarak çökerler.

1. Pasif Jel Difüzyonu

2 temel pasif difüzyon vardır: Tek veya iki reaktant için jelde gradient oluşturulur.

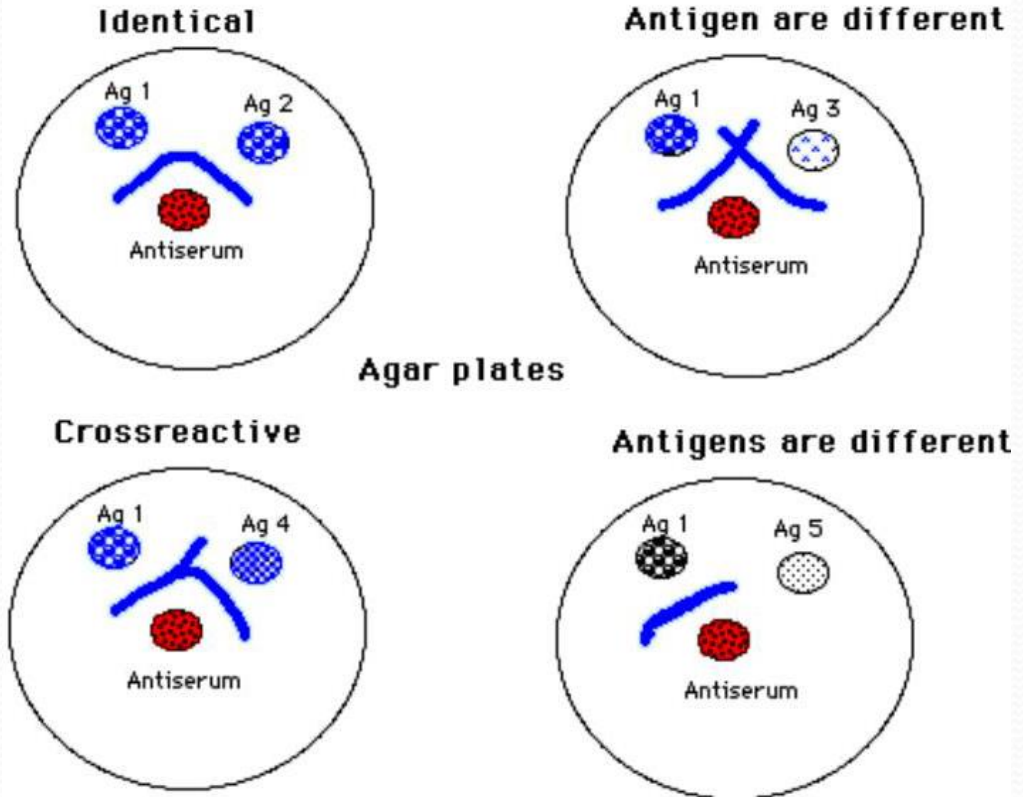
- 1. Single (tekli) immün difüzyon;** Sadece bir **tek** reaktant için konsantrasyon gradientinin oluşturulduğu yöntemdir.
 - Genellikle antikor katılarak oluşturulmuş agar içine bir antijenin difüzyonuna dayanır.
 - Bu ilkeye dayanan kantitatif uygulama Radyal immün difüzyondur. (RID)
- 2. Double (çiftli) immün difüzyon :** Konsantrasyon gradienti hem Ag hemde Ab için oluşturulur.”Ouchterlony” tekniği olarak bilinir.

- Çiftli immünodifüzyonda (Ouchterlony metodu), solubl antijen ve antikor molekülleri agar plağı üzerinde açılmış karşı çukurlara konur. Antijen ve antikor bu çukurlardan birbirlerine doğru agar içerisinde yayılırlar ve optimal konsantrasyonlarda karşılaştıklarında bir presipitasyon bandı veya çizgisi oluşur.
- Plağı dökülmüş agarın ortasına bir ve çevresine birkaç çukur açılır; ortadaki çukura antiserum ve çevredeki çukurlara antijenler konur.

- Bu teknik, pratikte iki veya daha fazla test materyalinin doğrudan karşılaştırılmasına izin verir:

- Bu testte aynı seruma karşı teste tabi tutulan birçok antijenin birbirine yakınlığı ortaya çıkarılabilir.
- Test örneğindeki antijenin, benzer çapraz reaksiyon verip vermediğini saptamak için kullanılan direkt ve basit bir yöntemdir.

Double dimension double diffusion (Ouchterlony)

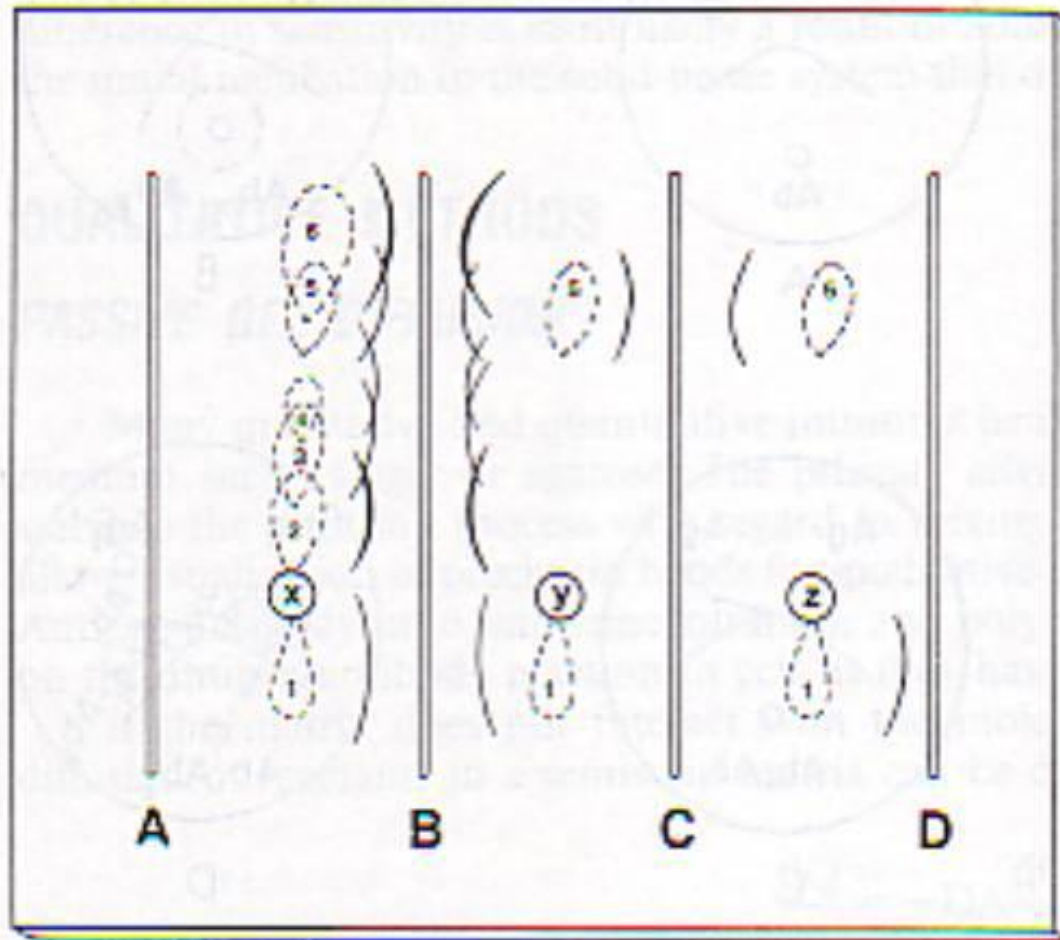


2.İmmünelektroforez

- Protein elektroforezi + antijen antikor etkileşiminin kombinasyonu olan bir tekniktir.
- Ag karışımları, antiserum spesifitelerinin değerlendirilmesi ve gamapatilerin değerlendirilmesinde kullanılır.
- Önce agaroz jel ortamda örnekler elektroforez uygulanır.
- Sonra ilgili proteine karşı antiserumlar örnekler paralel ve yakın bölmelere konur .
- +4 C de 27-72 saat inkübe edilir. Ayrılan örnekteki antijenin ve bölmedeki antikorum eş zamanlı difüzyonu, presipitasyon arklarının oluşmasına neden olur.
- **Her protein için bunların şekil ve pozisyonları farklıdır.**

- immünelektroforez sisteminde agar, ince bir tabaka halinde lama yayılır ve agarda çukur açılır. Daha sonra bu çukura antijen eklenir ve lam bir elektrik alanına konur. Antijen molekülleri bu elektrik alanında hareket eder ve spesifik pH'da elektrik yüklerinin farklı olması sebebiyle birbirlerinden ayrılırlar.
- Elektroforezden sonra agardan hareket yönüne paralel olacak şekilde bantlar kesilip çıkarılır ve yerlerine antiserumlar doldurulur. Antiserumun yayılması için bir süre beklenir. Uygun antijen antikorla karşılaştığında presipitasyon bandı oluşur.

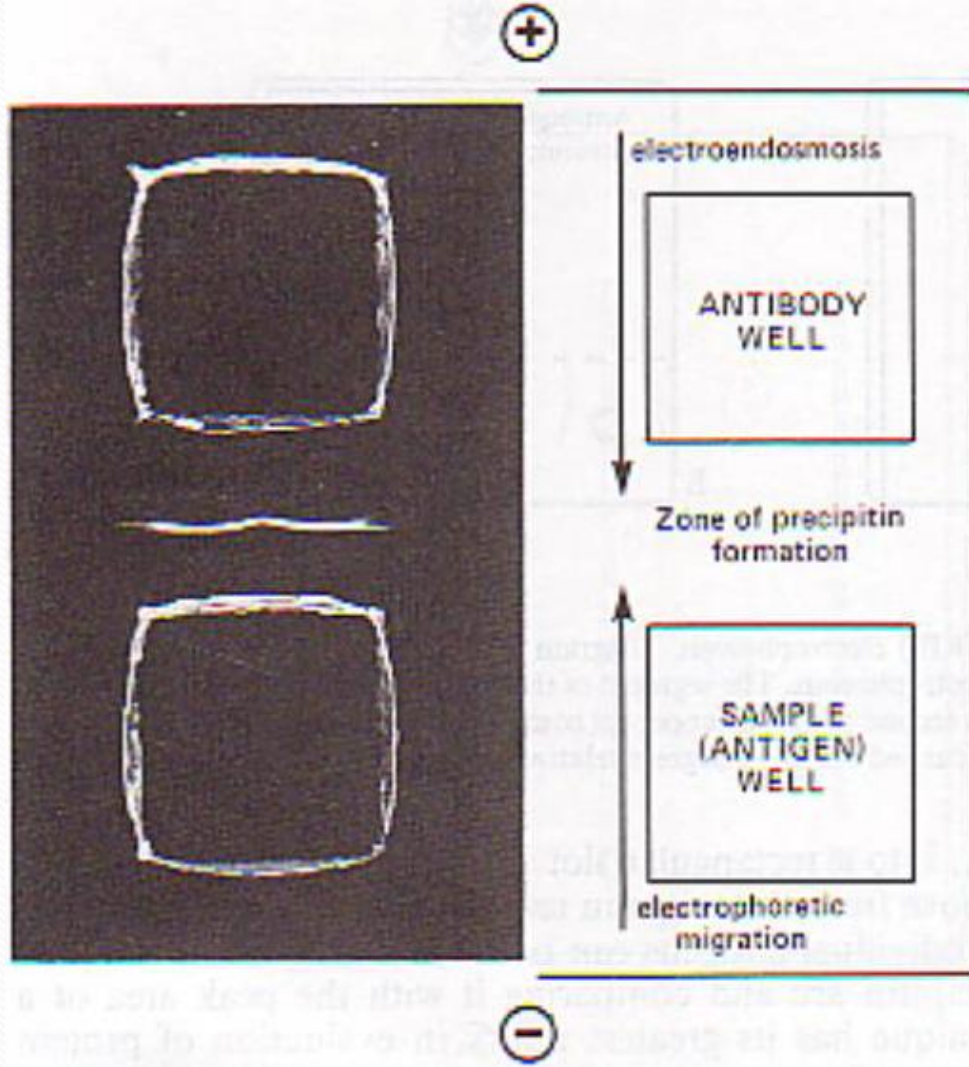
+



-

- Zıt yönlü immünelektroforez (counter immünelektroforez):
- Agar içinde biri Ag diğeri Ab solüsyonu ile doldurulacak iki paralel kuyu açılır.
- Ab ve Ag'nin birbirine karşı daha hızlı hareket etmesi için jele elektrik akımı uygulanır.
- Ag ve Ab birbirleri ile karşılaştıkları yerde çöktürme/çökelme hattı (bant) oluştururlar.
- BOS, kan ve idrarda bakteriyel Ag'lerin saptanmasında kullanılır.

- Zıt yönlü immünoelektroforez, çabuk yapılan çift yönlü jel difüzyon deneyidir.
- Patojenin hızlı bir şekilde tespit edilmesi gereken durumlarda kullanılan kalitatif bir metottur.
- Hazırlanıp lama yayılan agarın iki ucuna iki çukur açılır. Çukurun birine antijen, diğerine antiserum konur. Antikorum bulunduğu taraf pozitif kutba, antijenin bulunduğu taraf ise negatif kutba bağlanır. Negatif yüklü olan antijen antiseruma doğru, antikör ise elektroendozmozla antijene doğru hareket eder ve karşılaştıkları yerde bir presipitasyon bandı oluşur.



- İlgili antijenin (örneğin menejit) ve bilinmeyen antijenin antikorunun uygun pH'daki çözeltisi ayarlanır (antijen ve antikor zıt yüklü olacak şekilde). (sıklıkla pH=8,2'de bakteriyel antijenler negatif yüklü, immünglobülinler pozitif yüklüdür)
- Ag ve Ab agar jel üzerindeki kuyucuklara tatbik edilir ve akım uygulanır.
- Eğer patojenik antijen var ise presipitat bandı oluşur.

3. İmmünfiksasyon

- Proteinlere agar jel de elektroforez uygulanır.
- Ardından ayrılan proteinleri çöktürmek için, jel üzerine direkt olarak antiserum uygulanır.
- Jelde immün çökelti oluşur ve diğer bütün çökmemiş proteinler jel yıkanarak uzaklaştırılır
- Daha sonra jel, proteinleri belirlemek için boyanır.

4. Western Blot

- Bu teknikte elektroforez ile ayrılan proteinler, blotlama olarak adlandırılan işlem ile nitroselüloz membrana transfer edilir.
- Protein membran üzerinde fiks edildikten sonra, işaretli antikor kullanılarak saptanır.
- Antijen ölçümlerinde, jelde 500 ng/mL kadar düşük, enzim işaretli antikorun kemilüminesans özelliği yayılan ışığın film üzerinde saptanmasıyla 100 pg'a kadar ölçüm yapılabilir.

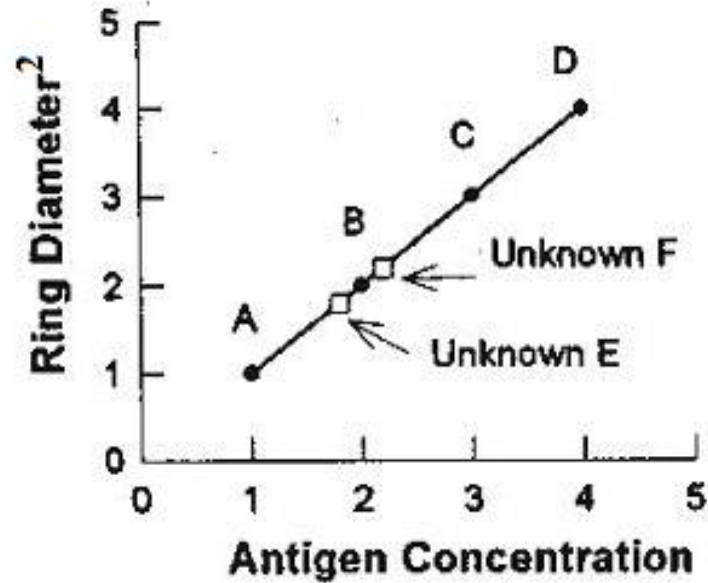
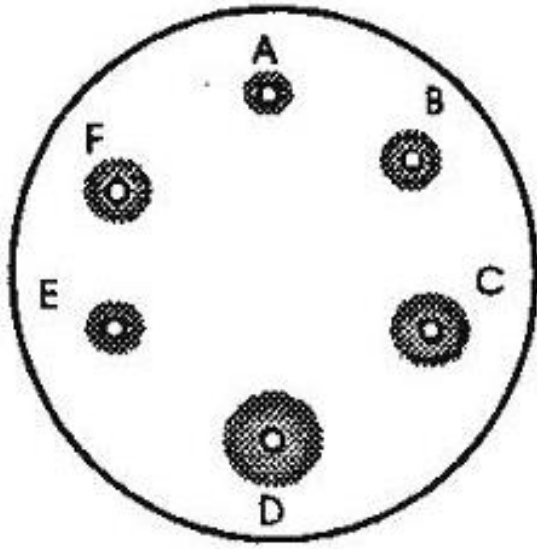
KANTİTATİF PRESİPİTASYON YÖNTEMLER

1. Radyal immündefüzyon (RID)

- RID (Mancini metodu), genellikle konsantrasyon gradientinin tek reaktant için oluşturulduğu pasif difüzyon yöntemidir.
- Ag –Ab etkileşimi (presipitat oluşumu) Ag kuyusunun etrafında iyi belirlenmiş bir **halka** oluşumu ile kendini gösterir.

- Radyal immünodifüzyonda bir antijen için monospesifik antikor agarla karıştırılır ve bir tabaka oluşturacak şekilde bir plağa dökülür. Daha sonra agarda çukurlar (kuyular) açılır ve açılan çukurlara numune (ölçülecek antijen solüsyonu) konur.
- Ag kuyudan jel içine doğru difüze olur (Ag çukurdan agarın içerisine yayılır) ve bir presipat oluştuğunda çukurun çevresinde bir **halka** meydana gelir.

- Mancini, **halkanın çapının karesi** ile çukurdaki **antijenin konsantrasyonu** arasında **doğru orantının** olduğunu belirlemiştir.
- *Standart eğri hazırlayarak kantitatif ölçüm yapılır.*

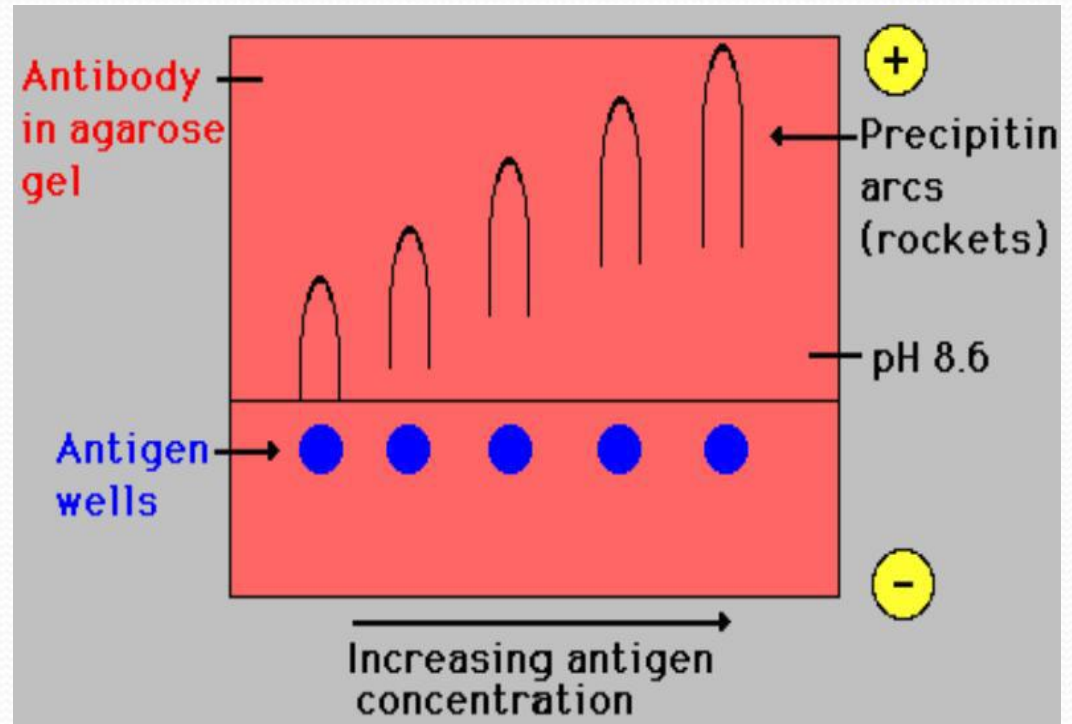


2. Elektroimmünölçüm (Roket)

- RID gibi tek bir konsantrasyon gradienti oluşturulur, ancak farklı olarak jele antijeni yürütmek için elektrik akımı uygulanır.
- Elektriksel alan uygulandığında **rokete benzer** şekilde presipitasyon bandları oluşur
- RID'nin tersine tek yönlü bir göç ve daha yüksek sensitivite vardır.

- Raket immünoelektroforezde, antikor içeren ve pH'ı antikorun hareketsiz antijenin negatif yüklü olmasını sağlayacak şekilde ayarlanmış agarda açılan çukurlara antijen içeren numune eklenir.
- Elektriksel alan uygulandığında **rokete benzer** şekilde presipitasyon bandları oluşur.

- Raket şeklindeki presipitasyon bantlarının yüksekliği eklenen antijen konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.
- *Standart eğri hazırlayarak kantitatif ölçüm yapılır.*



3. İmmünotürbidimetrik ve immünonefelometrik ölçümler

- Çözünmeyen Ag-Ab kompleksinin gelen ışığı saçması esasına dayanan tekniklerdir.
- Saçılma miktarı Ag-Ab kompleksinin miktarıyla orantılıdır.

Partikül immünoassay (Aglütinasyon testi)

Partikül immünoassay (Aglütinasyon ölçümleri)

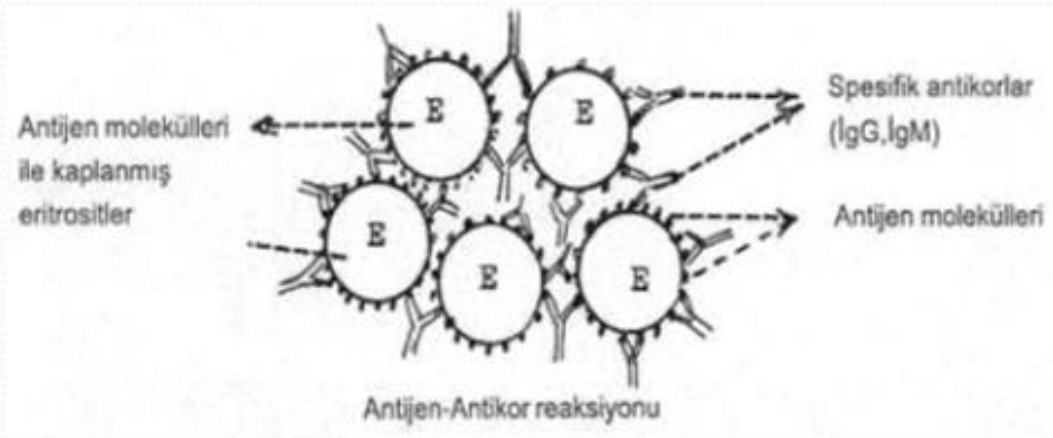
- **Aglütinasyon;** Bir **partiküle** yapışık antijenin spesifik antikoruyla birleşmesi sonucu süspansiyon içerisinde kümeleşmenin olmasıdır
- Agglütinasyon testleri, Antijen kaplı partiküllerin spesifik antikoruyla karşılaştığında çökelmiş kümeler (**agglütinat**) oluşturmaları esasına dayanır.
- Ag partikülün doğal bileşeni olabildiği gibi (**direk agglütinasyon**), kimyasal olarak da partiküle bağlanmış olabilir (**indirek agglütinasyon**)
- Agglütinasyon testlerinde IgM (multivalan), IgG'den 750 kat daha etkilidir.

- Aglütinasyon testlerinde genellikle 3 tip partikül kullanılmaktadır:
 - Eritrositler
 - Bakteri hücreleri
 - Lateks partiküller (Ag kimyasal olarak bağlanır)
- **Hemaglutinasyon testleri (HA):** Partikül olarak eritrositlerin kullanıldığı aglütinasyon testlerine denir.
- Kan gruplarının saptanması
- Kan transfüzyonlarında
- Babalık tayini
- Doku ve organ aktarımında ve
- Birçok bilimsel araştırmada kullanılan testlerdir.

- **Hemaglütinasyon, kan grubumuzun belirlenmesinde kullanılan en basit tekniktir.**
- Eritrositlerin yüzeyindeki antijenler, ortamda bulunan özgül antikorlarla birleşecek olursa, gözle görülebilecek kümeler (aglutinat) oluşturarak çökerler

AB0 Sistemi				
Kan Grubu (Genotip)	A Grubu (AA - AO)	B Grubu (BB - BO)	AB Grubu (AB)	O Grubu (OO)
Alyuvar- daki proteinler	 Sadece A antikorü	 Sadece B antikorü	 A ve B antikorü	 Antikor yok
Kan sıvısındaki antikorlar	 Sadece B antikorü	 Sadece A antikorü	Antikor yok	 A ve B antikorü

- HA reaksiyonu, bir infeksiyona karşı vücutta oluşan antikorların belirlenmesinde kullanılan önemli bir testtir.
- Teste, kullanılacak alyuvarlar tannik asitle muamele edildikten sonra antijenik substratlarla direk muamele edilerek, bu maddelerin alyuvarların yüzeyine adsorbe olması sağlanır.
- Bu şekilde hazırlanan alyuvar süspansiyonu, testin karakterine göre belli oranda dilüe edilerek kullanılır.



- **Testin yapılışı kısaca şöyledir:**

1. Şüpheli serumlar iki katlı olarak sulandırılarak tüplere 0.25 ml miktarında konulur.
2. Bunların üzerlerine de antijenle kaplanmış alyuvar solüsyonundan ilave edilir.
3. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra reaksiyon oda ısında 3-4 saat sonra gözle değerlendirilir.
 - a. Tüplerde HA'nın görülmesi kanda antikorların varlığını ortaya koymaktadır (**pozitif reaksiyon**).
 - b. Tüplerde HA yoksa, kanda da antikor bulunmuyor demektir (**negatif reaksiyon**).
4. Testte negatif ve pozitif serum kontrolleri de kullanılır.

İŞARETLİ İMMUNOKİMYASAL YÖNTEMLER

- **İşaretli immünoassay:** Ölçüm için radyoaktif izotopların, enzimlerin ve lüminesans yayan maddelerin (işaretlerin) kullanıldığı yöntemlerdir.
 1. Radioimmunoassay (RIA)
 2. Enzim immunoassay(EIA)
 3. Floresan immunoassay (FIA)
 4. Kemilüminesans immunoassay
 5. Elektrokemilüminesans immunoassay

İşaretli immünokimyasal yöntemler

- İmmünokimyasal ölçümlerin daha duyarlı ve özgül bir şekilde olması için işaretli Ab ve Ag kullanılmaktadır.

Tablo 10-1

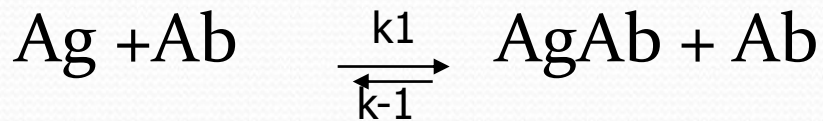
İzotopik-olmayan immünölçümler için işaretleyiciler

İşaretleyici	Örnek
Kemilüminesan	Akridinyum ester, akridinyum sulfonamid, isolüminol
Kofaktör	Adenozin trifosfat, flavin adenin dinükleotit
Enzim	Alkalen fosfataz, deniz bakteriyal lüsiferaz, B-galaktozidaz, ateş böceği lüsiferaz, glukoz oksidaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, "horseradish" peroksidaz, lizozim, malat dehidrogenaz, mikroperoksidaz, üreaz, ksantin oksidaz
Florofor	Europium şelat, floresein, fikoeritrin, terbiyum şelat
Serbest radikal	Nitroksit
Inhibitör	Metotreksat
Metal	Altın, selenyum, gümüş çözeltisi
Partikül	Bakteriyofaj, eritrosit, lateks boncuk, lipozom
Polinükleotit	DNA
Substrat	Galaktozil -umbeliferon

- 
- İşaretlenmiş immünokimyasal ölçümler, genel olarak
 1. Yarışmalı (kompetitif) veya yarışmasız (nonkompetitif) ve
 2. Heterojen veya homojen olarak sınıflandırılabilir.

- **Yarışmalı (kompetitif) reaksiyon** : Analit (işaretsiz Ag) ve işaretli antijen (Ag*) antikör üzerindeki bağlanma yeri için yarışır.
- Bütün reaktifler **eş zamanlı** veya **ardışık** olarak karıştırılır.
- **Eş zamanlı kompetitif ölçüm (one-step immünoassay)**: İşaretli Ag* ve işaretsiz Ag dahil tüm bileşenler reaksiyon ortamına aynı anda konur . Ag* ve Ag; Ab için yarışır.
- $$Ab + Ag + Ag^* \rightleftharpoons AgAb + Ag^*Ab$$
- Bu koşullar altında **elde edilen sinyal, Ag (analit) konsantrasyonu ile ters orantılıdır.**

- **Ardışık kompetitif ölçüm (Two-step immünoassay :**
Önce işaretsiz Ag aşırı Ab ile karıştırılır ve bağlanmanın dengeye ulaşması beklenir.
- İşaretili Ag* ardışık olarak eklenir, 2. Aşamada dengeye ulaşması beklenir.
- Seperasyon (ayırma) işleminden sonra bağlı işaret belirlenir ve işaretsiz Ag konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanılır.



- $\text{AgAb} + \text{Ab} + \text{Ag}^* \rightleftharpoons \text{AgAb} + \text{Ag}^* \text{Ab} + \text{Ag}^*$
- Eğer $k_1 \gg k_{-1}$ ise bu yöntem eş zamanlıdan daha sensitiftir.
- Kompetitif prensip; T₄, T₃, FT₄, FT₃, E₂, Progesteron, Testosteron, Kortizol, Folat, Vitamin B₁₂ analizlerinde uygulanmaktadır.

- **Yarışmasız (nonkompetitif) immünölçüm;**
- Önce Ab katı bir faza (tüp, boncuk, mikrowell) adsorbe edilir veya kovalent olarak bağlanır.
- Sonra Ag (analit) eklenir ve Ab tarafından yakalanması beklenir.
- Daha sonra diğer reaksiyon bileşenleri yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır ve aşırı miktarda işaretli Ab* eklenir.
- İkinci Ab* bağlı Ag üzerinde ikinci ve farklı bir epitop ile reaksiyona girer.
- Bağlanmayan (artan, fazlalık) Ab* 'yi uzaklaştırmak için tekrar yıkama yapılır. Bağlı işaretçi saptanır.
- Elde edilen sinyal Ag konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.
- Yarışmalı tekniklerden **daha sensitiftir.**

Heterojen ve homojen immünokimyasal ölçümler

- **Heterojen ölçümler:** Serbest işaretli antijeni (Ag^*) bağlı işaretli antijenden ($AbAg^*$) ayırmak için fiziksel ayırma teknikleri gerekir.
- **Homojen ölçümler:** Serbest işaretli antijeni (Ag^*) bağlı işaretli antijenden ($AbAg^*$) ayırmak için fiziksel ayırma teknikleri gerekli değildir.

Tablo 11.2. Heterojen ve homojen immunoassay karşılaştırılması.

Heterojen İmmunoassay:	Homojen İmmunoassay:
Bağlı ve serbest konjugatların seperasyonu yapılır	Bağlı ve serbest konjugatların seperasyonu yapılmaz.
Ölçüm süresi ve prosedürü uzundur (seperasyon işlemine bağlı olarak)	Ölçüm süresi ve prosedürü daha kısa
Background sinyalleri minimal ve yalancı pozitiflik daha az	Background sinyalleri minimal ve yalancı pozitiflik daha fazla
Maliyeti daha fazla	Maliyeti daha az

- Heterojen ölçümlerde en çok kullanılan **fiziksel ayırma teknikleri** (serbest Ag*’i bağlı antijenden (Ab-Ag*) ayırmak için kullanılır):

Tablo 10-2

İmmünlöçümler için ayırma yöntemleri

Adsorpsiyon

Aktif kömür, Florisil, pudra

Çöktürme

Polimer çöktürme: polietilen glikol

Çözücü veya tuzla çöktürme; etanol, dioksan, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Protein A veya çift (ikinci) antikor çöktürme

Katı-Faz Antikor

Çözünmeyen bir matrikse (örneğin plastik boncuk, plastik tüp veya mikro kuyucukların iç yüzleri ve manyetik boncuk) kovalent olarak bağlanmış veya adsorbe edilmiş antikorlar veya bağlayıcı proteinler (örneğin; protein A, biotin-avidin ve biotin streptavidin)

İşaretli İmmünölçüm Örnekleri

1. Radyoimmünoassay (RİA)

- Biyolojik sıvılardaki antijen veya antikorların tespitinde işaret olarak **radyoizotopları** (^{125}I , ^{131}I ve trityum) kullanan bir immünolojik tekniktir.
- RİA, 1959'da Yalow ve Berson tarafından geliştirilmiştir.
- RİA yöntemi örnekte bulunan sabit miktarda radyoaktif işaretli Ag^* ve işaretsiz Ag 'in (analit) sınırlı sayıdaki spesifik antikor bağlama bölgesi için yarıştığı **kompetitif bağlanma reaksiyonudur**.

- Bağlı veya serbest radyoaktif işaretli Ag^* daha sonra radyoizotopun radyoaktivitesi ölçülmeden önce birbirinden ayrılmalıdır (**heterojen ölçüm**).
- Ab'ye bağlı olan radyoaktif işaretli Ag^* % si test örneğindeki analit (işaretsiz Ag) konsantrasyonu arttıkça düşer.
- Dolayısıyla test örneğindeki **analit (Ag) konsantrasyonu** bağlı fonksiyondaki **radyoaktivite** miktarı ile **ters orantılıdır**.
- İşaretleyici ve radyoaktif Ag ve Ab dayanıksızlığı, radyoaktivite güvenliği, otomatize cihazların olmayışı nedeniyle kullanımı azaldı.

2. Enzim İmmümlölçüm(EIA)

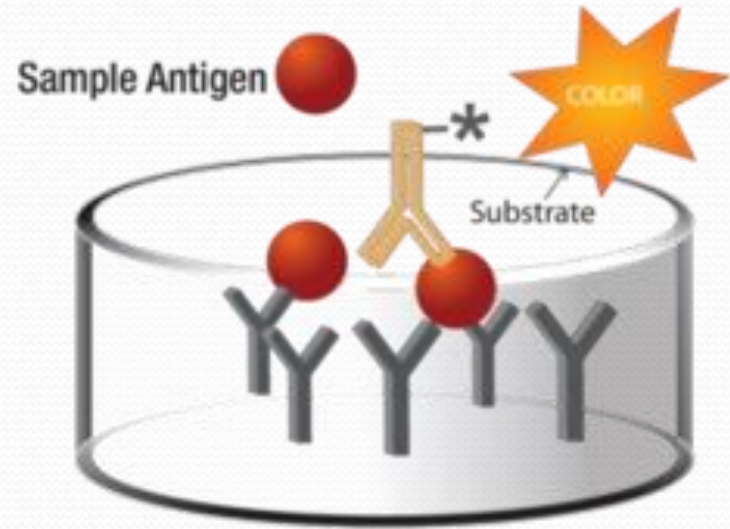
- İmmünolojik reaksiyonu saptamak ve ölçmek için enzimlerin katalitik özellikleri kullanılır.
- En çok Alkalen fosfataz, Horseradish peroksidaz, glukoz-6-P DH, β -galaktozidaz enzimleri kullanılır.

- EIA'de önce enzim işaretli Ag^* ve Ab^* liganda bağlanır
- Enzim substratı eklenir.
- Substrattaki azalma veya ürünündeki artma ölçülerek Ag-Ab reaksiyonu tespiti ve miktarlanması yapılır.
- EIA örnekleri:
 - Enzim-bağlı-immünsorbent ölçüm(ELISA),
 - Enzim-multiple-immünölçüm(EMIT),
 - Klonlanmış-enzim donör immünölçüm(CEDIA)

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

- Klinik analizlerde yaygın olarak kullanılan **heterojen** bir EIA tekniğidir.
- Reaksiyon komponentlerinden biri katı faz yüzeyine bağlanır.
- Ölçülecek Ag'yi içeren numune eklenir.
- Katı faz antikoru ile bağlanması için bir süre inkübe edilir.
- Katı faz yıkanır.
- Enzim işaretli antikor (Ab^*) eklenir. **Ab-Ag- Ab^* sandviç kompleksi** oluşur.
- Ortamdaki bağlı olmayan fazla Ab^* yıkama ile uzaklaştırılır.
- Enzim substratı eklenir. Enzim, eklenen substratı, ürüne dönüştürür.

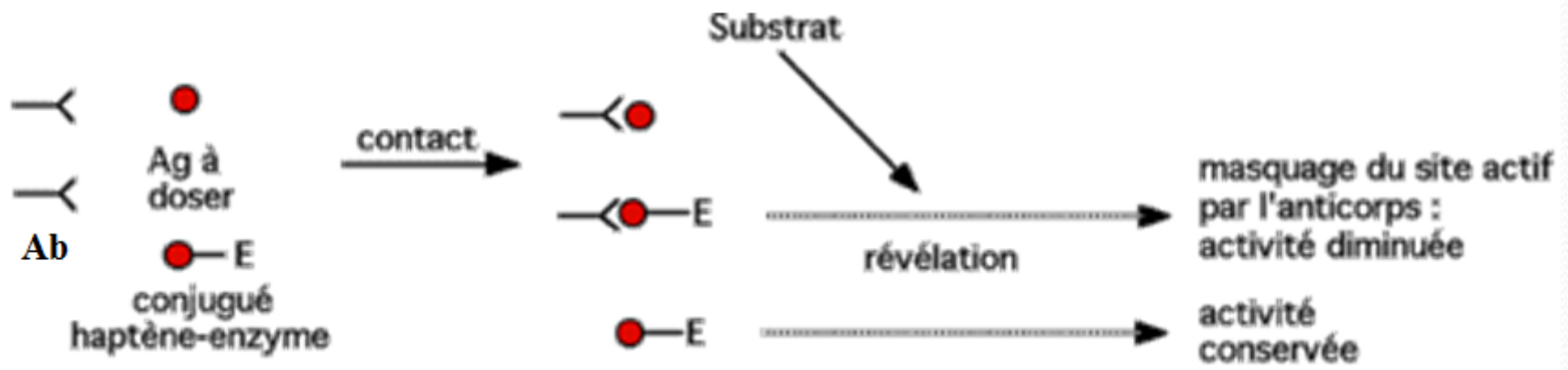
- Ürün miktarı örnekteki Ag (analit) miktarı ile **doğru orantılıdır**.
- Solid faza Ag konularak Ab tayinide yapılabilir (virüslere karşı, parazitlere karşı Ab saptamak için yaygın kullanılır).



Immunometric ELISA Format for
Large Molecules

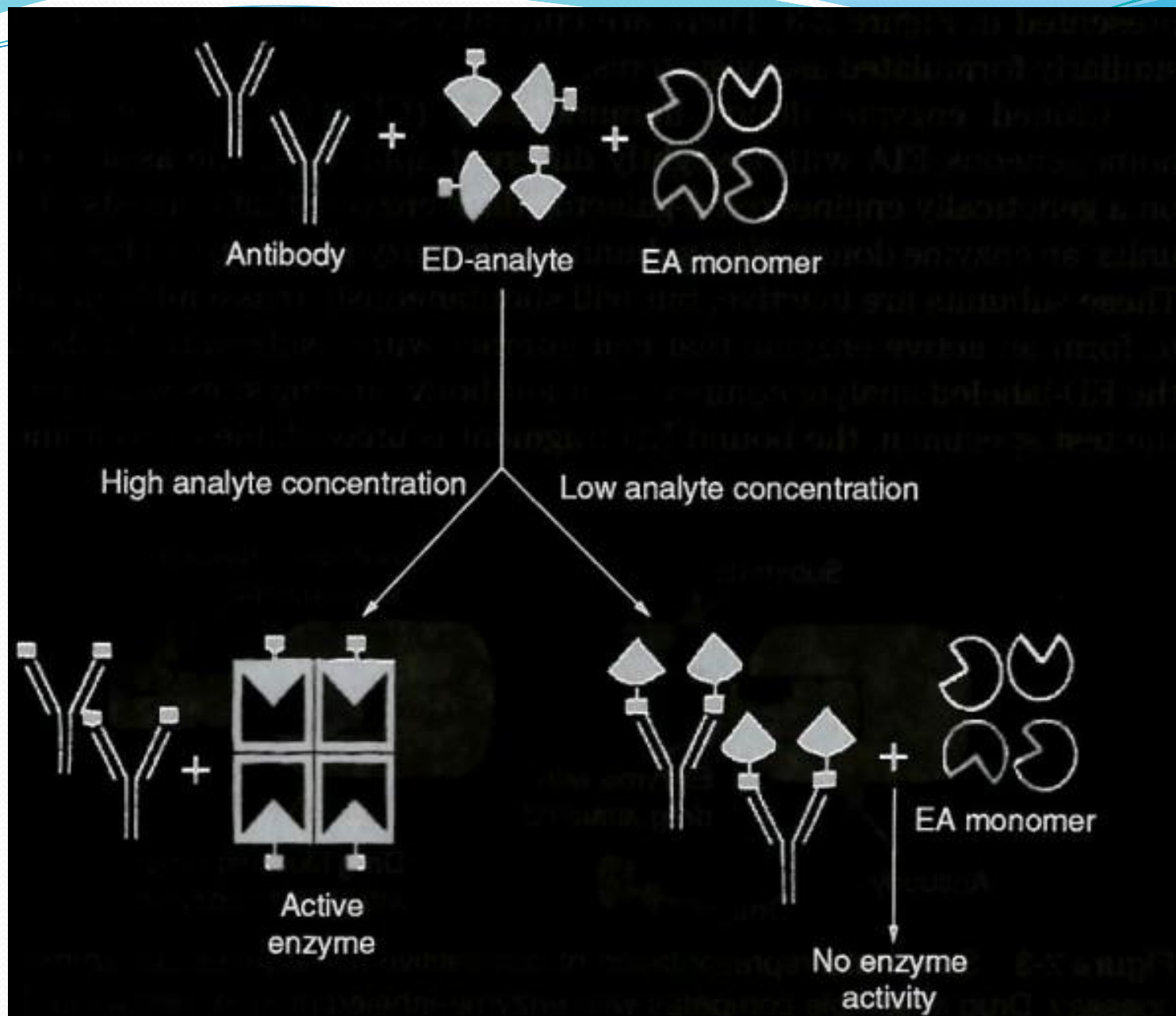
EMİT (Enzym multiple immümölçüm tekniği)

- **Homojen** bir EIA tekniğidir. Ayırma işlemi gerektirmediği için, uygulaması kolay bir ölçümdür.
- EMİT tekniğinde; ilaç, hormon veya metabolit gibi bir analite karşı Ab, substratla birlikte hasta serumuna eklenir.
- Ab ve analit Ag (Ab-Ag)bağlanır.
- Analitin enzim konjugatı (Ag-enzim, aktif form) ikinci reaktif olarak eklenir.
- Enzim analit konjugatı, ortamda kalan Ab fazlası ile birleşip Ab-Ag-enzim (inaktif form) kompleksi oluşturur. Fazlalık Ab'unun Ag-enzim konjugatı ile bağlanması, enzim aktivitesini azaltır.
- Sinyal analit konsantrasyonu ile orantılıdır.



CEDIA (Klonlanmış enzim donör immünoölçüm)

- **Homojen** bir EIA tekniğidir.
- Genetik mühendisliğin teknikleri kullanılarak geliştirilmiştir.
- CEDIA'da enzimlerin inaktif fragmentleri (parçaları) çoğaltılır (bu fragmentler birleştğinde aktif tetramer oluşur)
- Daha sonra bunlardan enzim donör-Ag konjugatı hazırlanır. (Bu durumda enzim hala aktifleşebilir.)
- Ab'un Ag-enzim konjugatına bağlanması ile enzim fragmanları birbirine bağlanamaz ve aktif enzim oluşamaz.
- Bu prensipten faydalanılarak ölçüm yapılır.
- **Enzim aktivitesi numunedeki Ag ile doğru orantılıdır.**



3. Floroimmümölçüm (FIA)

- İmmünolojik reaksiyonları saptamak ve ölçmek için işaret **floresans** molekül kullanılır.

Tablo 10-5 Floresan İşaretleyicilerin Özellikleri

Florofor	Eksitasyon(nm)	Emisyon (nm)
Florosein izotiyosiyanat	492	520
Europium (B-naftoil trifloroaseton)	340	590, 613
Lusifer Sarı VS	430	540
Fikobiliprotein	550-620	580-660
Rodamin B izotiyosiyanat	550	585
Umbelliferon	380	450

4. Kemilüminesans immünölçüm

- Kemilüminesans, kimyasal reaksiyon sırasında oluşan ışık yayılımıdır.
- İşaretleyici olarak kemilüminesans maddeler (**izoluminol, akridinyum esterleri**) kullanılır.
- **Akridinyum esterleri**; Ab ve haptenleri işaretlemek için kullanılabilen yüksek spesifik aktiviteye sahip işaretleyicilerdir(800 zeptomol saptama sınırı).

5. Elektrokemilüminesans immümlölçüm

- **Elektrokemilüminesans;** İşaretleyici olarak **rutenyum (II) tris (bipridil)** gibi elektrokemilüminesans molekülünün kullanıldığı immün ölçüm tipidir.
- Bu tip ölçümlerde rutenyum II tris (bipiridil) elektrot yüzeyindeki tripropilamin ile elektrokemilüminesans reaksiyona girer. (620 nm)
- Bu işaretleyici ile katı faz olarak manyetik bilyeler kullanılarak ölçüm hücresi içinde ölçüm yapılır.
- Bilyeler elektrot yüzeyinde tutulmuş ve bağı olmayan işaretleyici yıkama çözeltisi ile hücreden uzaklaştırılır.
- Bilyelere bağı işaretleyici elektrokemilüminesans reaksiyona girer ve ışık yayılımı ölçülür

