

Tiroid Hastalıklarının Tanısında Faydalanılan Bazı Modern Fonksiyon Testlerinin Uygulama Prensipleri (Isotopic ve Non-isotopic Yöntemler)

Kim. Y. Müh. Dr. Lütfiye Bilkay

KOLOĞLU*

Radyoizotop atomların kullanıldığı tüm immünolojik analiz yöntemleri "Radio-assay"ler (radio-ligand assay'ler) adı altında toplanmaktadır.

Son yıllarda, radyoizotopların klinik laboratuvarlarda çok yaygın olarak kullanılmaları ve çalışmaların büyük bir kısmının sağlığa zararlı "gamma" radyasyonu yayan izotoplarla yapılması, kullanılan, radyoizotoplarla işaretli (radio-label) antijenlerin kullanım sürelerinin (shelf-life) kısa oluşu, araştırmacıları radyasyonsuz metodlar geliştirmeye yöneltmiştir.

Bu yazımızda, radyoizotopların kullanıldığı (isotopic) yöntemlerin yanı sıra radyoaktif olmayan maddelerin kullanıldığı (non-isotopic) yöntemlerden kısaca bahsedilecektir.

"Isotopic" Yöntemlerin Klinik Laboratuvarlarda Kullanılan Tipleri:

1. Radioimmunoassay (RIA) - "competitive" bir yöntemdir.

2. Competitive protein binding (CPB) - "competitive" bir yöntemdir.

3. Immunoradiometric assay (IRMA) - "non-competitive" bir yöntemdir. Bu üç grup yöntemin çalışma prensipleri aynıdır. Farklılık, antijeni bağlayan ajanın değişik olmasıdır. Gerçekten,

– RIA yöntemlerinde antijeni bağlayan ajan spesifik antikordur.

– CPB yönteminde antijeni bağlayan ajan, söz konusu antijeni in-vivo olarak taşıyan protein fraksiyonudur.

– IRMA yönteminde ise antijeni bağlayan ajan işaretli ve işaretsiz spesifik antikordur.

"Non-isotopic" Yöntemlerin Başlıcaları:

*A.Ü. Tıp Fak. Endokrinoloji ve Metabolizma Hast. Lab. Şefi

1. Enzyme immunoassay'ler

2. Luminescent immunoassay'ler

3. Fluorescent immunoassay'lerdir.

Konuya girmeden önce metinde kullanılacak terminoloji ile ilgili bilgi vermeyi uygun buldum.

TERMİNOLOJİ

Isotopic: Radyasyonlu

Non-isotopic: Radyasyonsuz

Antigen (Antijen): Antikor oluşumuna sebep oları ve seçimli olarak sadece bu antikor ile reaksiyon veren madde

Antibody (Antikor): Canlılarda belli bir antijene cevap olarak husule gelen madde

Immunojen: Antigen

Antijenik determinant: Antijen molekülünün antikora bağlandığı kısım

İşaretleme: Antijen veya antikora uygun bir radyoizotop atomun, enzimin, flourcsan veya luminesan vs. gibi maddelerin bağlanması

Radio-label Antigen (veya Antibody): Radyoaktif bir atomla işaretli antijen (Radyoaktif bir atomla işaretli antikor)

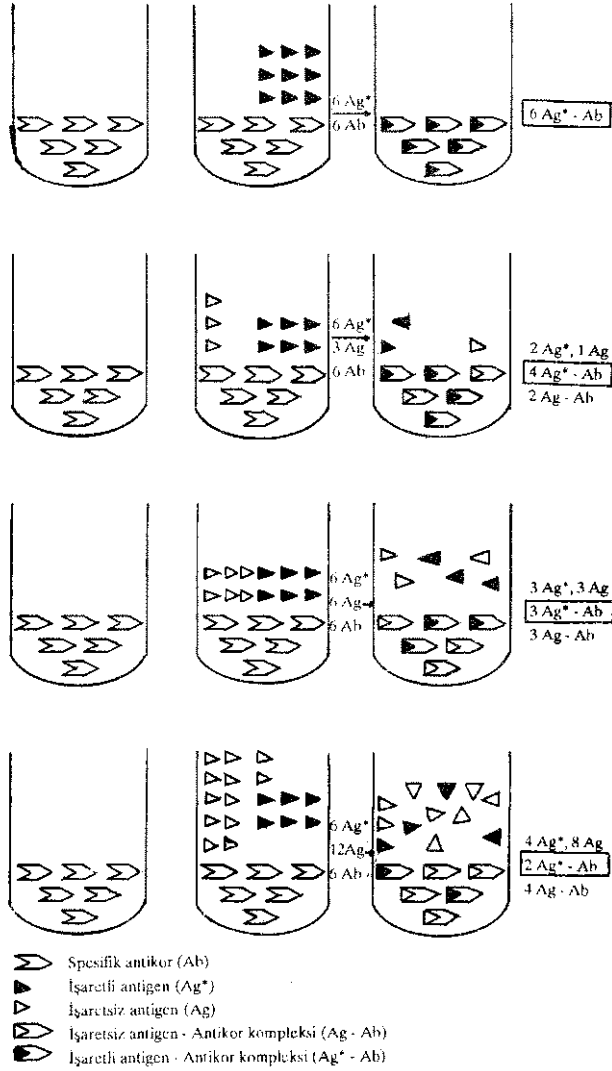
Enzyme-label: Spesifik bir enzim ile işaretli

Luminescent-label: Luminesan bir madde ile işaretli

Fluorescent-label: Fluoresan bir madde ile işaretli

İnkübasyon: İmmünolojik reaksiyonlarda serbest ve bağlı fraksiyonlar arasındaki dengenin teşekkülü için, reaksiyon karışımını özel şartlarda belli süre bekletmek

Separasyon: İmmünolojik reaksiyonlarda serbest ve bağlı fraksiyonların, özel yöntemlerle, birbirinden ayrılması



Şekil 1. Bir RIA çalışmasının şeması

Bir RIA çalışmasında gerekli malzeme:

- Çok saf olarak hazırlanmış antijen (Ag) (standard eğri çiziminde kullanılacaktır).
- Uygun bir radyoizotopla işaretli antijen (Ag*)
- Bağlama afinitesi yüksek olan ve spesifik antikor (Ab) içeren antiserum
- Test solüsyonu (hasta serumu veya diğer biyolojik sıvılar)

Bir RIA çalışması 4 aşamada gerçekleşir:

1. Komponentlerin karıştırılması (Ag, Ag, Ab ve Test solüsyonu)
2. İnkübasyon: Serbest ve bağlı fraksiyonlar arasında denge oluşması için uygun şartlarda belirli müddet bekletme.
3. Separasyon: Bağlı ve serbest fraksiyonların özel yöntemlerle birbirinden ayrılması

4. Bağlı fraksiyonun radyoaktivitesinin sayımı, standard eğrinin çizimi ve hasta serumundaki hormon konsantrasyonların standard eğriden okunması

Şekil 1.'de RIA çalışmasının şeması verilmiştir.

Bugün dünyanın her yerinde çok yaygın olarak kullanılmakta olan RIA yöntemlerinin,

- 4leri derecede spesifik olmaları,
- ng ve pg seviyelerindeki maddeleri dahi hassas olarak tesbit edilebilmeleri,
- Sonuçlarının tekrarlanabilir olması,
- Fazla sayıda çok küçük hacimlerdeki numunelerle çalışabilmesi gibi avantajlarının yanında bazı dezavantajları da vardır. Bunların başlıcaları:

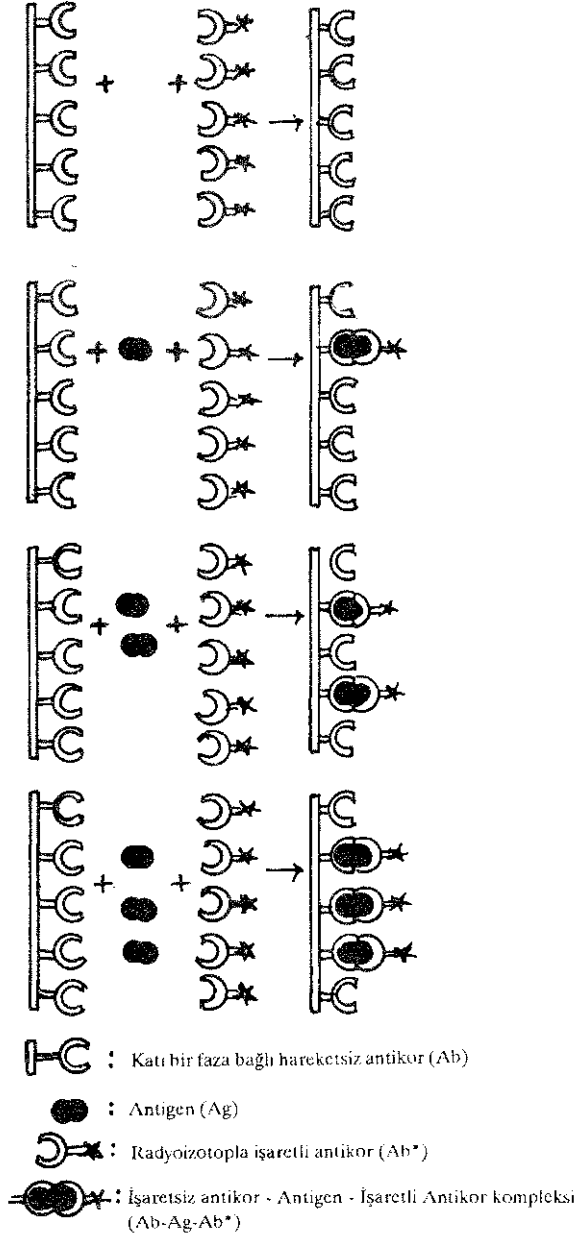
- Radyoizotopun parçalanması (decay),
- İşaretli antijenlerin hazırlanmasında ve çalışmalar esnasında, radyasyonun zararlı etkilerine maruz kalınması ve bu etkinin akümülatif olması,
- Değişik tarihlerde hazırlanan radyoaktif reaktiflerin farklılıklar göstermesi ve maliyetlerinin yüksek olması,
- Radyoaktif antijenin kullanım süresinin en fazla 2 ay ile sınırlı olması,
- RIA çalışmalarının çok özel ve pahalı cihazlara ve tecrübeli elemana ihtiyaç göstermesi,
- Bağlı ve serbest fraksiyonların ayrılmasında, bütün çalışmalara uygulanabilen bir ayırma yöntemi bulunmadığından, otomasyon yöntemlerinin geliştirilmesine imkan vermemesi,
- Küçük moleküllü maddelerin (Hapten'ler) tayini için RIA yöntemlerinin doğrudan kullanılmaması.

2. COMPETITIVE PROTEİN BINDING (CPB):

CPB yönteminin uygulama prensibi RIA'ninkinden farklıdır. Farklılık antijeni bağlayan ajanın değişik oluşudur. Bu yöntemde antijeni bağlayan ajan, bu antijeni in-vivo olarak taşıyan protein fraksiyonudur.

CPB yönteminde, RIA'dan farklı olarak çalışmaya başlamadan önce yapılması gereken bir numune hazırlama safhası vardır. Önce, hasta serumunda tayin edilecek antijen, kendisini in-vivo olarak taşıyan protein fraksiyonundan ayrılır, yani hormon-protein bağı çözülür. Serbest hale geçen antijen, ikinci bir deney tüpündeki, aynı cins proteine bağlanmada işaretli antijen ile rekabete sokulur. CPB yöntemi çok kullanılan bir yöntem olmadığından üzerinde daha fazla durmuyoruz.

abit Antikor Antigen İşareth Antikor Kompleks



Şekil 2. Bir IRMA çalışmasının şeması

3. IMMUNORADIOMETRIC ASSAYS (IRMA) (TWO-SITE IMMUNORADIOMETRIC ASSAY):

Immunoradiometric çalışmalarda, antijeni kantitatif olarak tayin etmek için 2 antikor kullanılır. Bu antikorlardan biri katı bir yüzeye bağlanmıştır ve radyoaktif değildir. Bu antikor, test solüsyonundaki antijenin ekstraksiyonunda etkindir. İkinci antikor ise radyoaktif bir atomla işaret-

lenmiştir ve katı matrix'teki antikora bağlanmış olan antijenin kantitatif olarak tayininde etkindir.

Immunoradiometric Yöntemin Tekniği:

İki taraflı (two-site) radioimmunometric assay olarak da ifade edilen IRMA yöntemi aşağıdaki çalışma aşamalarını içerir:

- Seyreltilmiş antiserum, uygun bir katı faza, örneğin test tüpünün iç duvarına veya selüloz partiküllerine vs.'ye bağlanarak sabit duruma getirilir. Katı faza bağlanmış olan antikorun fazlası yıkamak suretiyle uzaklaştırılır.

- Hareketsiz haldeki antikor, test solüsyonu ile inkübasyona bırakılır, (standard eğri çizimi için muhtelif konsantrasyonlardaki saf antijen çözeltileri kullanılır).

- İçindeki tayin edilecek antijenin tümü katı fazdaki antikora bağlanmış olan test solüsyonunun fazlası aspirasyon veya dekantasyon ile uzaklaştırılır ve tüp yıkanır.

- Tüpe radioizotopla işaretlenmiş olan ikinci antikor (Ab) ilave edilir.

- Tekrar inkübasyona bırakılır.

- Reaksiyona girmemiş olan materyal tüpten uzaklaştırılır. Tüp yıkanır.

- Hareketsiz antikor tarafından tutulmuş olan antijen ve bu antijene bağlanmış olan işaretli antikoru içeren tüpün radyoaktivitesi tesbit edilir ve çizilen standart eğri yardımı ile test solüsyonundaki antijen miktarı bulunur (Şekil 2).

IRMA yöntemi "non-competitive" yani, rekabet prensibine dayanmayan bir yöntemdir ve yukarıdaki şemada da görüldüğü gibi reaksiyon vasatına artan miktarlarda antijen ilave edildiğinde, bağlı fraksiyonda o oranda fazla radyoaktivite tesbit edilecektir.

IRMA yönteminin RIA'dan ayıran iki önemli faktör vardır:

a) IRMA yönteminde tayin edilecek olan test solüsyonundaki antijen (serbest antijen), işaretli antikor tarafından tesbit edilir.

b) IRMA çalışmalarında bir rekabet söz konusu değildir ve radyasyon sayımı, serbest antijen konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

IRMA yönteminin en önemli avantajı

- IRMA yönteminin RIA'dan daha hassas, doğru ve spesifik olduğu yönündeki düşünceler giderek artmaktadır.

- IRMA'da kullanılan işaretsiz ve işaretli antikorlar, antijene oranla aşın miktarlarda kullanıldıklarından, çalışmanın hassasiyeti pipetleme

hatalarından etkilenmez ve normal pipetleme ile çok iyi bir hassasiyet elde edilebilir. Burada sadece hasta serumlarını pipetlemede çok dikkatli olmak gerekir.

IRMA tekniği, iki antikorun aynı zamanda bağlayabilen antijenlere tatbik edilebilir. Bu antijenler, başlıca proteinler ve makro moleküllerdir.

Yöntemin hassasiyeti reaktiflerin aşırı miktarlarda kullanılmasına bağlıdır. Her iki antikor da aşırı miktarlarda kullanıldığında test solüsyonundaki antijenin tümü tesbit edilebilecektir. Test hassasiyetindeki tek limitasyon faktörü, işaretli antikor solüsyonunun radyoaktivitesidir. Çünkü, işaretli antikora bağlanmış olan antijene sadece işaretli antikor bağlanabildiğinden, spesifik aktivitesi çok yüksek işaretli antikor solüsyonları kullanmak mecruburiyeti vardır.

Teorik olarak IRMA tekniği ile antijenin tek bir molekülünü bile kantitatif olarak tayin etmek mümkündür; ancak, işaretli antikorun yeterli derecede spesifik aktivitesi olması şarttır. Pratikte radyoizotopun devamlı parçalanması sebebi ile bu hassasiyeti elde etmek zordur. Radyoaktif olmayan işaretleyiciler kullanıldığında bu hassasiyet teorik olarak kısmen mümkündür. RIA çalışmalarında ise bu hassasiyet kesinlikle mümkün değildir. RIA tekniği, antikorun bağlama uçlarının satüre edilmesine bağlı olduğundan, çalışmada en yüksek hassasiyet düşük antikor konsantrasyonlarında elde edilir.

IRMA'nın Dezavantajları:

IRMA sisteminde radyoizotop kullanımına bağlı olan bazı önemli dezavantajlar vardır.

Antikorların saflaştırılmaları, radioizotoplarla işaretlenmeleri ve saklanmaları için spesifik immunoabsorbentlere ihtiyaç vardır. Yeterli miktarda antikor elde edebilmek için fazla miktarda antijen kullanılması (hipofiz hormonlarında olduğu gibi) mecruburiyeti zorluklar arzeder. Bu zorlukların bir kısmı "monoclonal" antikor tekniği kullanılarak giderilebilir. Antiserumun saflaştırılması işaretlenmesi ve saklanması için immunoabsorbentlerin hazırlanması, zaman ve antijen açısından çok pahalıya mal olur.

"Monoclonal" antikorların kullanım alanına fazla miktarda girmeleri ile bu zorlukların önüne geçilmiştir. Radyoizotopla işaretli spesifik antikorlar, immunoabsorbente bağlamadan önce sık

aralıklarla hazırlanabilirlerki, bu antikorlar ön saflaştırmaya gerek göstermezler veya çok az gösterirler. Antikorların işaretlenmesinde, klasik radio-iodinasyon yöntemleri, örneğin "Chloraminc-T" metodu kullanılabilir. İşaretli antikorlar sık aralıklarla hazırlandıklarından, reaktiflerin bozulmasına bağlı olarak husule gelen problemler asgariye indirilmiş olur.

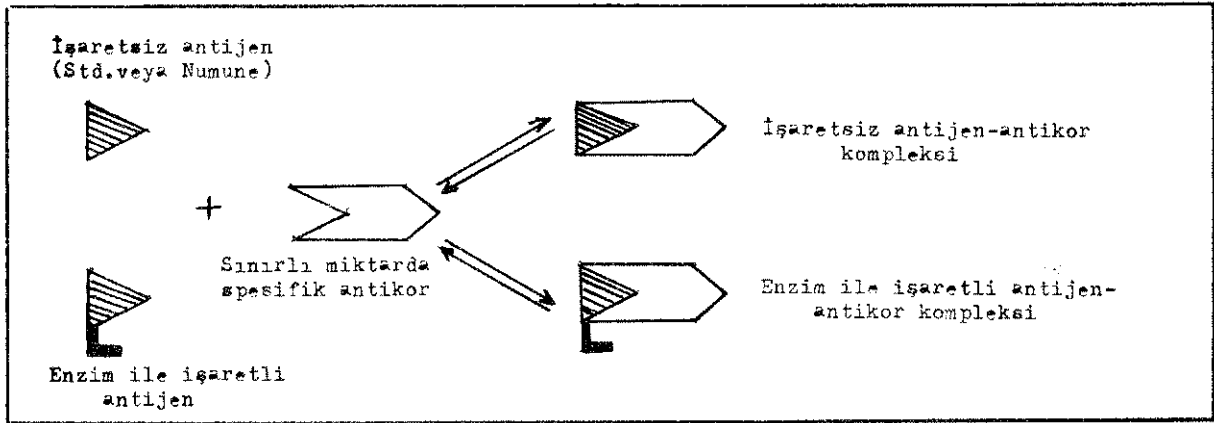
B-İZOTOPIK OLMAYAN (NON-ISOTOPIC) YÖNTEMLER:

25 yılı aşkın bir süredir "radioassay" yöntemleri, klinik kimyada hormonların, proteinlerin, vitaminlerin, ilaçların vs. tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, radioassay yöntemlerinde kullanılan radyoizotopla işaretli antijen (veya antikor) hazırlanması ve kullanımında ciddi riskler vardır. Bunların başında radyasyonun sağlığa zararlı etkisi ve bu etkinin birikici olması ve diğer dezavantajları sebebi ile 1970'11 yıllarda radioassay yöntemlerinin yerine radyasyonsuz yöntemlerin aranmasına başlanmıştır.

Radyoaktif izotopların yerini alacak pek çok alternatif madde üzerinde araştırma yapılmış ve radyasyonsuz işaretleyici olarak enzimler yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Daha sonra "luminescent" ve "fluorescent" maddeler de immunoassay'lerde işaretleyici olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Bir maddenin radyoaktif işaretleyici yerine, radyasyonsuz işaretleyici olarak kullanılabilmesi için bazı özellikleri olması gerekir. Bunlardan başlıcaları:

- Çalışmanın son noktasının (end point) oldukça sabit olması,
- İşaretli antijenin (veya antikorun) hazırlanmasının kolay olması,
- Maliyetinin pahalı olmaması,
- Sağlık için potansiyel bir risk taşımaması,
- Kullanılan radyasyonsuz işaretleyicilerin ölçümlerinin yeterli hassasiyette olması,
- Numunedeki diğer bileşiklerden etkilenmemesi,
- Çalışma süresinin çok uzun ve çalışmanın çok komplike olmaması,
- Çok sayıda numune ile çalışabilmesi,
- Ölçümler için gerekli cihazların pahalı olmaması ve kolay temin edilebilmeleri



Şekil 3. Bir EIA çalışmasının şeması

Radyasyonsuz çalışmalarda kullanılan işaretleyicinin cinsine göre bu immunoassay'ler 3 grupta toplanabilirler:

1. Enzim immunoassay'ler
2. "Luminescent" immunoassay'ler
3. "Fluorescent" immunoassay'ler

1. ENZİM IMMUNOASSAY'LER:

Enzim immunoassay (EIA) terimi, test solüsyonundaki ölçülecek madde miktarının tayininde, enzim aktivitelerinin ölçümüne dayanan bütün immunoassay'ler için kullanılır.

Klinik laboratuvarlarda en fazla kullanılan enzim immunoassay'ler

a) Klasik "Competitive" enzim immunoassay (EIA) rekabet prensibine dayanır. (RIA'ya tekabül eder)

b) Immunoenzymometric assay (ELISA, Sandwich assay). Rekabete dayanmayan bir yöntemdir (IRMA'ya tekabül eder).

a) "Competitive" Enzim Immunoassay (EIA):

EIA yöntemi, enzim ile işaretli antijenin, işaretli antijen ile (test solüsyonunda tayin edilecek madde), kendilerine spesifik antikora bağlanmada rekabete girdikleri immünolojik bir yöntemdir.

Enzim immunoassay çalışmalarında 3 komponente ihtiyaç vardır:

- Sabit miktarda enzim ile işaretli antijen
- Sınırlı ve sabit miktarda spesifik antikor,
- İşaretsiz antijen (standard eğri çiziminde kullanılır) ve test solüsyonu

Şekil 3.'de klasik "competitive" bir EIA çalışması gösterilmiştir.

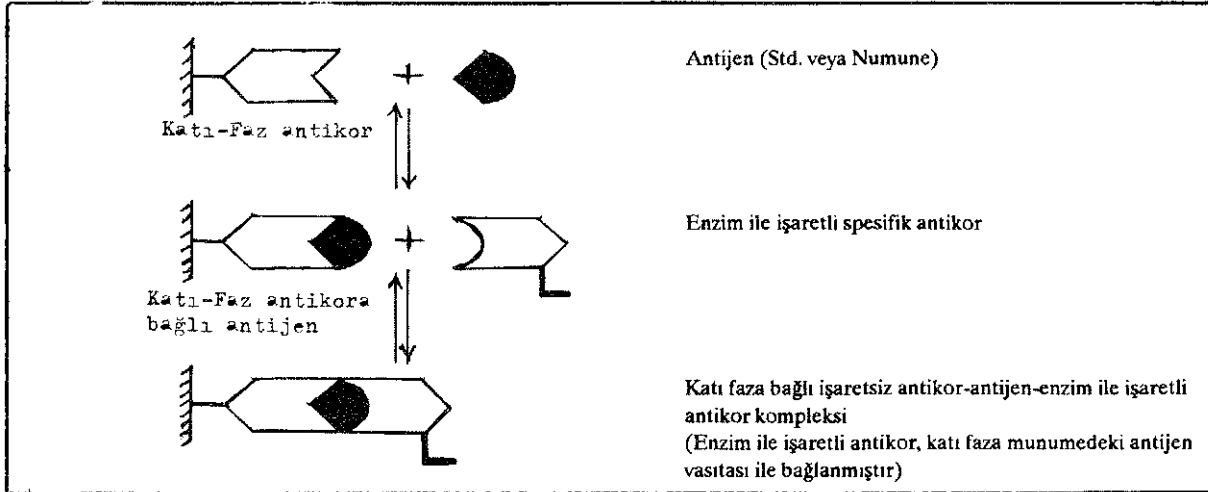
EIA ile antijen tayini 5 safhada gerçekleşir:

1. Bütün komponentlerin karıştırılması,
2. İnkübasyon,
3. Bağlı ve serbest fraksiyonların ayrılması,
4. Vasata enzim substratı ilave edilmesi,
5. Bağlı fraksiyondaki enzim aktivitesinin ölçülmesi, standard eğri çizimi ve numunedeki antijen miktarının, eğriden okunması.

RIA yöntemlerinde olduğu gibi, enzim immunoassay yöntemlerinde de kullanılan spesifik antikor miktarı, vasattaki tüm işaretli ve işaretli antijenleri bağlayabilecek miktardan daha az olmalıdır ki, antijenler arasında bir rekabet husule gelsin. Reaksiyon karışımında işaretli antijen miktarı (tayin edilecek madde) arttıkça, antikora bağlanmış olan enzim ile işaretli antijen miktarı azalmaktadır. Yani, serbest işaretli antijen ile, enzim ile işaretli bağli antijen arasında ters bir orantı vardır. Serbest fraksiyonun bağli fraksiyondan ayrılmasından sonra, tüpe enzim substratı ilave edilerek, bağli fraksiyondaki enzim aktivitesi ölçülür. Hazırlanmış olan standard eğri yardımı ile test solüsyonundaki antijen miktarı tesbit edilir. Bu tür çalışmalarda bağli ve serbest fraksiyonların birbirinden ayrılmasında en basit yol, antijen veya antikorun katı bir yüzeye bağlanmasıdır.

b) Immunoenzymometric Assay (ELISA):

Spesifik antikorun enzim ile işaretlendiği ve rekabet prensibine dayanmayan (non-competitive) immünolojik bir yöntemdir.



Şekil 4. Bir ELISA çalışmasının şeması

Son yıllarda bu grup yöntemlere olan ilgi git-tikçe artmaktadır. "Sandwich Assay", "Capture Assay" veya "Two-Site Assay" olarak da isimlendirilen bu yöntemlerin prensibi, aşırı miktarlarda reaktif kullanımına dayanır. Bu çalışmada kullanılan reaktifler arasında bir rekabet söz konusu olmadığından, bağılı fraksiyonda ölçülen enzim aktivitesi ile, test solüsyonundaki ölçülecek madde miktarı arasında doğru bir orantı vardır. Immunoenzymometric çalışmaların tümünde, kolay bir separasyonu temin için, katı faz reaktif olarak antikor veya antijen kullanılır. Bundan dolayı bu tip çalışmalara genellikle "Enzyme Linked Immune Sorbent Assays" (ELISA) denir.

Yukarıdaki şemada (Şekil 4.) immunoenzymometric assay ile antijen tayini gösterilmiştir.

Immunoenzymometric yöntem ile bir antijen tayini 5 kademede gerçekleşir:

1. Katı bir faza bağılı, aşırı miktardaki spesifik işaretli antikor test solüsyonu ile karıştırılır.
2. İnkübasyona bırakılır ve yıkanır.
3. Enzim ile işaretli spesifik antikor ilave edilir ve tekrar yıkanır.
4. Vasata enzim substratı ilave edilir.
5. Katı faza bağılı olarak bulunan enzimin aktivitesi ölçülür.

Bu çalışmada da, numunelerin yam sıra, içerisindeki antijen miktarı bilinen çözeltilerle çalışılarak bir standard eğri çizilir ve numunedeki antijen miktarı bu eğriden okunur.

Bir antijenin immunoenzymometric yöntem ile tayin edilebilmesi için, yeterince büyük olması ve iki tarafında reaktif antijenik bağlama yerleri (antijenik determinantı) bulunması gereklidir. Bundan dolayı "Hapten" dediğimiz küçük molekülü antijenler bu yöntem ile tayin edilemezler.

immunoenzymometric yöntemlerin diğer önemli bir kullanım alanı da antikor miktarı ölçümleridir. Şekil 5. böyle bir çalışma özetlenmiştir.

1. Tayin edilecek antikoru ihtiva eden numune, katı bir faza bağlanmış olan ve spesifik olduğu antijen ile karıştırılır. Yıkanır.

2. Enzim ile işaretli ikinci antikor, anti-immunoglobulin ilave edilir, yıkanır.

3. Vasata enzim substratı ilave edilir.

4. Bağılı fraksiyonun enzim aktivitesi ölçülür, hazırlanmış olan standard eğriden, numunedeki antikor miktarı okunur.

Enzim işaretleyicilerin kullanıldığı yöntemlerin avantajları:

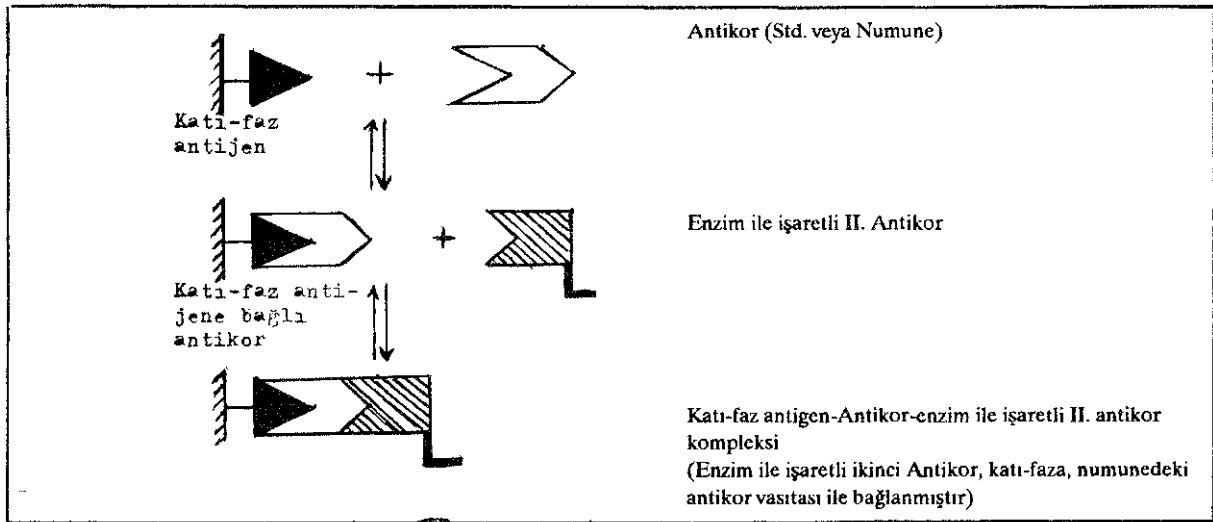
1. Enzim ile işaretli reaktiflerin kullanım sürelerinin uzun olması, (Enzim ile işaretli reaktifler liofilize halde iseler, steril şartlarda, oda ısısında veya 4°C da 1 yıldan fazla saklanabilirler).

2. Fazla miktarda numune ile çalışma imkanı vermesi,

3. Çalışmaların kısa süreli olması,

4. Sağlık için potansiyel bir risk taşıması,

5. Basit ve çok pahalı olmayan cihazlarla çalışabilmesi.



Şekil 5. İmmunoenzymometric yöntem ile antikor tayini

2. LUMINESCENCE IMMUNOASSAY'LER:

Antijen veya antikorun işaretlenmesinde luminescence özelliği olan maddelerin kullanıldığı immünolojik yöntemlerdir. İşaretlemede kullanılan maddenin cinsine göre:

- "Bioluminescent immunoassay",
- "Chemiluminescent immunoassay",
- "Chemiluminescent enzyme immunoassay"

olmak üzere 3 çeşittir.

a) Bioluminescent immunoassay:

Bu yöntemde, antijen veya antikor bir bioluminescent madde ile işaretlenir. En fazla kullanılan işaretleyiciler luciferon ve luciferase'dir.

Bioluminescent reaktiflerin teminlerindeki zorluk, fazla dayanıklı olmamaları ve ileri derecede saflaştırılmamaları gibi dezavantajları sebebi ile RIA yöntemleri gibi yaygın olarak kullanılmazlar. Bu yöntemlerin en büyük avantajı, çalışmalar esnasında husule gelen ışığın, yüksek enerjili ve dayanıklı olmasıdır.

b) Chemiluminescent Immunoassay:

Bu tür çalışmalarda antijen veya antikor oksitlendiğinde ışık neşreden bir chemiluminescent molekül ile işaretlenir. Işık neşredilmesi çok hızlı olduğundan (0-10 sn), oksidasyon zamanlamasının

çok iyi ayarlanması ve numuneler ölçüm cihazında iken oksitleyici reaktifin ilavesi gerekmektedir.

Bu çalışmanın dezavantajı, ışık neşri esnasında çok çabuk ve dikkatli bir şekilde okumaların yapılması mecruridir. Çünkü, kritik okuma zamanı geçirildikten sonra okuma yapmak veya okumaları kontrol etmek imkanı yoktur.

c) Chemiluminescent Enzyme Immunoassay: Bu çalışmalarda immünolojik reaktif bir enzim ile işaretlenir. En fazla kullanılan enzim "horseradish peroxidase" dir.

Vasata hidrojen peroksit beraberliğinde luminol/isoluminol substratı ilave edilerek enzim aktivitesi ölçülür.

3. FLUORESCENT IMMUNOASSAY'LER (FIA):

Fluoresan immunoassay yöntemlerinde muhtelif tip fluoresan moleküller işaretleyici olarak kullanılırlar. Bu grupta kullanılan işaretli reaktifler ileri derecede dayanıklı olup, elde edilmeleri pahalı değildir. Çalışmanın son noktasının tesbiti, pek çok laboratuvarında mevcut olan cihazlar yardımı ile yapılabilmektedir.

En yaygın olarak kullanılan fluoresan işaretleyiciler, fluorescein, rhodamin ve umbelliferon'lardır. Fluoresan işaretleyici RIA'daki radyoizotopun karşıtıdır ve onun yerine kullanılır.

Separasyonu takiben bağlı veya serbest fraksiyonun floresansı ölçülür.

Katı-faz yöntemleri kolayca fluoroimmunoassay'lere tatbik edilebilir. Katı-faz sistemlerindeki yıkamalar, FIA çalışmalarında, kullanılan plastik tüplerden veya ortamdaki gelebilecek fluoresan et-

kiyi minimuma indirirler. Faz ayırımalarında magnetize edilmiş partiküllerin kullanımı da FIA'da yaygın olarak uygulanmaktadır. Çünkü partiküller tüpün dibinde toplanacağından, sıvı fazın floresansı aynı tüpte doğrudan okunabilmektedir.

REFERANSLAR

1. Aherne GW: Non-isotopic immunoassay. Luminescence and fluorescence, in Principles of Clinical Biochemistry. Ed DL Williams, V Marks Heinemann Med Books 2 Ed. s: 523,1988.
2. Bounaud MF et al: Chemiluminescence assay immunoassay of TSH with acridium ester-labelled antibody evaluated and compared with two other immunoassays. Clin Chem 33:20%, 1987.
3. Goodburn R: Immunometric assays, in Principles of Clinical Biochemistry, Ed DL Williams, V Marks Heinemann Med Books 2 Ed. s: 502,1988
4. Hubbard R, Gould BJ: Enzyme immunoassay. in Principles of Clinical Biochemistry, Ed DL Williams, V Marks Heinemann Med Books 2 Ed. s: 508,1988
5. Koloğlu S, Koloğlu LB: Radioimmunoassay ve Türkiye'de Tiroid Hastalıklarının tanısında ve tedavilerinin izlenmesinde Radioimmunoassay ile yapılan tiroid fonksiyon testlerinin önemi. A.Ü.Tıp Fak.Endok.ve Meta Hast.Kürsüsü Yayını. Ankara X977.
6. Pekary AE et al: New immunoenzymetric assay for human TSH compared with two radioimmunoassays. Clin Chem 32:511,1986.
7. Roitt I, Jonathan B, Male D: Monoclonal antibodies, in Immunology The CV Mosby Comp St Louis Toronto 25/7, 1986.
8. Spencer CA et al: TSH secretion in thyrotoxic and T4-treated patient. Assesment by a sensitive immunoenzymometric assay. JCEM 63:349,1986.
9. Voller A, Bidwell D: The enzym linked immuno-sorbent assay "ELISA" Micro-System Ltd. Summerfield House, Wale, Guernsey GB vol: 2 s: 10,1980.
10. Voller A: Ehsa A vidly applicable diagnostic tool. Medicine Digest 10/6:5,1984.
11. Weeks I et al: Acridium esters as high specific activity labels in immunoassay. Clin Chem 29:1474,1983.
12. Weeks I et al: A high sensitivity immuno-chemiluminometric assay for human TSH. Clin Endocrinol 20:489,1984.