

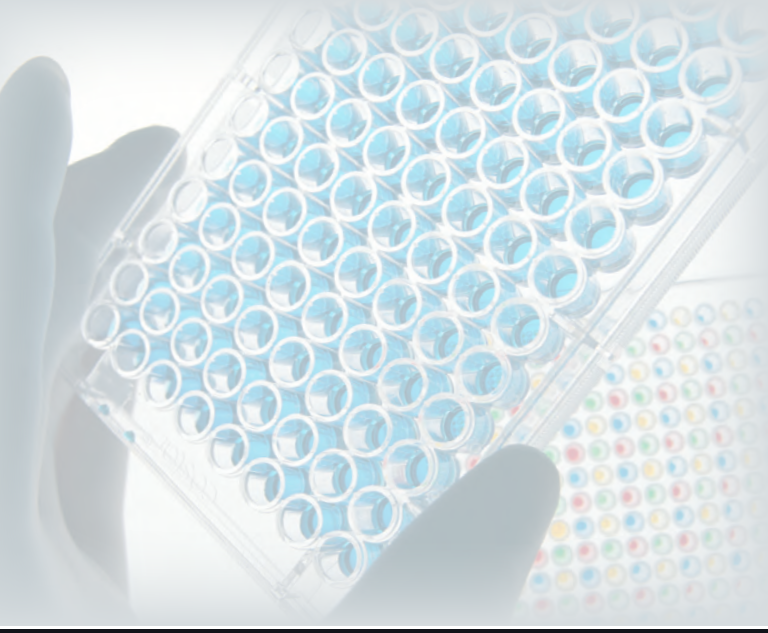
Üç Boyutlu Baskı Teknolojisi ile Medikal Testler Daha Ulaşılabilir

Dr. Tuncay Baydemir [*Bilim ve Teknik Dergisi*

Tıbbi tanılama için daha kolay uygulanabilir ve daha ucuza mal edilebilir laboratuvar testleri için sürekli araştırmalar yapılıyor.

Geliştirilen yeni teknolojilerle hastalık tanılmasında uygulanacak testler zaman ve maliyet bakımından tasarruf sağlayabildikleri için büyük önem arz ediyorlar. Böylece imkânların kısıtlı olduğu dezavantajlı bölgelerde hastalıkların daha kolay ve hızlı bir şekilde tanılanması hedefleniyor.





ELISA Testi Nedir?

ELISA testi tıpta tanı aracı olarak ve çeşitli endüstrilerde kalite kontrol amaçlarıyla yaygın olarak kullanılır. Ayrıca biyomedikal araştırmalarında örnekteki belirli antijenlerin veya antikorların tespiti ve miktar analizleri için analitik araç olarak da ELISA testlerinden yararlanır.

Bu test sayesinde sıvı numunelerde az miktarlarda bulunan proteinler, peptitler, hormonlar ya da antikorlar tayin edilebiliyor. Antijen içeren sıvı faz, genellikle 96 mikro kuyucuklu plakalarda sabitlenir ve antijenin belirli bir antikora bağlanması sağlanır. Bu antikora da enzim bağlı bir antikor eşlik eder. Daha sonra eklenen malzeme görünür bir renk değişikliğine neden olur. Renk yoğunluğuna bağlı olarak tayini amaçlanan maddenin varlığı ve miktarı uygun yöntemlerle ölçülür.

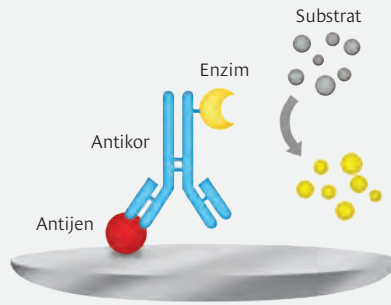
Araştırmacılar *Analytical Chemistry* dergisinde yayınladıkları makale ile uzun süredir karmaşık matrisler içerisinde bulunan protein, patojen, antikor ve diğer biyomoleküllerin saptanmasındaki standartları daha yukarı çektiklerini bildirdiler. Üç boyutlu baskı ile üretilen pipet uçlarıyla gerçekleştirilen testlerle başarıya ulaşan araştırmacılar, pipete dayalı teknolojiler sayesinde karmaşık geleneksel tanılama yöntemlerine gerek kalmayacağını belirtiyorlar. Böylelikle kırsal bölgelerde bazı tıbbi testlerin hızlı ve ucuz bir şekilde gerçekleştirilebileceğini ve hastalık tanılarının daha kolay şekilde yapılacağını vurguluyorlar.

ELISA'da, çeşitli antijen-antikor kombinasyonları kullanılır ve bunlara enzim işaretli antijen ve antikorlar eşlik eder. Daha sonra bu enzimlerin aktivitesi renk yoğunluğu bakımından analiz edilir. Enzim aktivitesi, kullanılan uygun substrat (enzim tepkimelerinde işlenen maddeler) ile oluşan renge göre ölçülür. Substrat ilave edildikten sonra oluşan renkli ürünün ışık emilimi analiz edilir ve sayısal değerlere dönüştürülür. Antijen-antikor kombinasyonuna ve analizi yapılacak maddeye göre farklı tür ELISA test yöntemleri uygulanabilir. Bunlar “Doğrudan ELISA”, “Dolaylı ELISA”, “Rekabetçi ELISA” ve “Sandviç ELISA” yöntemleridir.

ELISA testleri karmaşık matrislerdeki proteinleri, patojenleri, antikorları ve diğer biyomolekülleri tayin etmek için uzun zamandır yaygın olarak kullanılıyor. Yapılan son araştırmalarda ELISA testlerinin hassasiyetini artırmak, testlerin maliyetini ve süresini azaltmak hedefleniyor. Bu sayede yenilikçi ve kolay ulaşılabılır sistemler geliştirilmesi planlanıyor.

Yaklaşık otuz yıldan uzun süredir kan, hücre ve çeşitli biyolojik numunelerde HIV (insan bağışıklık yetmezliği virüsü), Hepatit B, Hepatit C, Lyme hastalığı (kene ısırması ile oluşan bir hastalık), bazı kanser türleri ve pernisiyöz anemi (B12 eksikliğine bağlı olarak alyuvar üretiminin yetersiz olması) başta olmak üzere birçok hastalığın tanısında kullanılan ELISA testi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) etkili ve kesin sonuçlar sağlıyor. Bununla birlikte, sağlıklı test sonuçları elde edilmesi için oldukça pahalı laboratuvar ve ekipmanlarla birlikte iyi eğitilmiş teknik elemanlar da gerekiyor. Ayrıca ekonomik açıdan bakıldığında kullanılan kimyasal malzemelerin pahalılığı da olumsuz bir etmen. Araştırmada uygulanan yöntemse ELISA testinin, temel prensipleri aynı kalmak koşuluyla, bilinenden daha hızlı ve ucuz bir şekilde gerçekleştirilmesini mümkün kılıyor.

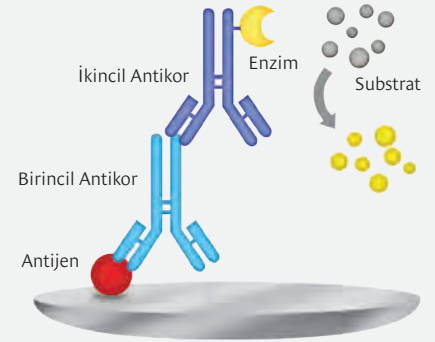
ELISA testi vücudun bakteri, virüs ve parazit gibi zararlı patojenlerle ve doğal olmayan kimyasallarla mücadele etmek için ürettiği antikor adı verilen protein bazlı bağışıklık birimlerini veya antijenleri (bağışıklık sistemini antikor üretmek için uyaran toksin ve yabancı maddeler) tespit etmekte kullanılıyor. Geleneksel testler kan numunesinin alınması ile başlıyor. Numune 96 adet mikro kuyucuğu olan plakalara konuyor. Her bir kuyucuğun farklı birer test odası işlevi gördüğü plakalara numuneyle farklı şekilde tepkime verecek maddeler ekleniyor. Tepkimeler sonucunda görülen renk değişiminin analizi sayesinde örneklerde ya antikorlar ya da bu antikorların bağlandığı proteinler tayin ediliyor. Uzman personel tepkimeler sonucunda ortaya çıkan renge ve bu rengin yoğunluğuna göre hastalık hakkında bilgi sahibi oluyor.



Doğrudan ELISA Yöntemi

Bu yöntemde antijen mikropılaka kuyucuklarının yüzeyi üzerinde tutulur, daha sonra bu antijene özgü enzim işaretli antikorla belirli sıcaklık ve koşullarda bir süre bekletilir. Yıkama işleminden sonra uygun substrat eklenir. Oluşan renklerden yararlanılarak sonuçlar hesaplanır.

Yüksek molekül ağırlıklı antijenlerin miktarını belirlemek için uygun bir yöntemdir. Daha az adımda gerçekleştirilebilir ve oldukça hızlı sonuç alınır. 1971 yılında geliştirilen bu yöntem, diğer ELISA türlerinin ortaya çıkmasına öncülük etmiştir.

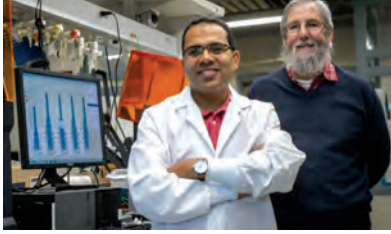


Dolaylı ELISA Yöntemi

1978 yılında doğrudan ELISA yönteminden esinlenerek geliştirilen dolaylı ELISA yöntemi iki aşamalı olarak değerlendirilebilir. Bu yöntemde antijen mikropılaka kuyucuklarının yüzeyi üzerinde tutulur ve önce birincil antikor proteine bağlanır. Ardından birincil antikora ikincil bir enzim işaretli antikor bağlanması için belirli sıcaklık ve koşullarda bir süre bekletilir. Yıkandıktan sonra uygun substrat eklenir. Oluşan renklerden yararlanılarak sonuçlar hesaplanır.

Dolaylı ELISA, doğrudan ELISA yönteminden daha fazla adım gerektirir ve genellikle bakteri, virüs ve parazit kaynaklı enfeksiyonları teşhis etmek için kullanılır. Daha hassas ve esnek bir analiz yöntemi olup endokrinoloji (vücutta hormon salgılayan birçok salgı bezini ve bu salgı bezleriyle ilgili hastalıkları inceleyen tıp dalı) alanında yaygın olarak kullanılır.

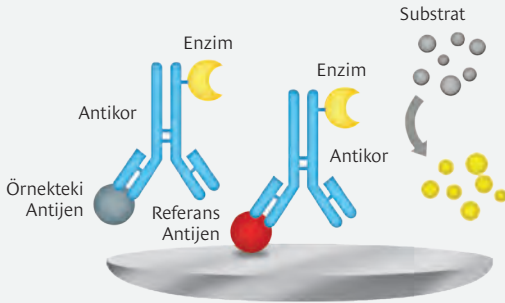
M. Sharafeldin ve arkadaşları, yaptıkları araştırmayla üç boyutlu baskı cihazında ürettikleri pipet uçları ile ELISA testlerini düşük maliyette ve oldukça hızlı bir şekilde gerçekleştirmeyi başardılar. Geliştirilen yöntem sayesinde üretilen pipet uçları standart cihazlarda kullanılmaya uygun. Uçların tasarımı sayesinde antikorlar iç yüzeye rahatlıkla tutunabiliyor. Pipet uçlarının küçük hacimlerine göre yüzey alanlarının büyük olması, standart ELISA testlerine göre tepkimelerin daha hızlı bir şekilde gerçekleşmesini ve dolayısıyla test sürelerinin kısalmasını sağlıyor. Tüm test adımları bu uçların içerisinde gerçekleşiyor. Test sonuçları kamera, cep telefonu veya plaka okuyucu cihazlar kullanılarak elde ediliyor.



M. Sharafeldin ve danışmanı J. Rusling

ELISA testlerinde kullanılan pipet uçlarının (numuneyi transfer etmekte kullanılan küçük uçlar) test plakalarındaki mikro kuyucukların görevini üstlenmesini öngören K. Kadimisetty ve arkadaşları, üç boyutlu baskı ile üretilen ve tüm pipetlere uyacak pipet ucu tasarımları sayesinde herhangi bir plakaya ve pahalı ekipmanlara gerek duymadan bu testlerin gerçekleştirilebilmesini sağladı. Ürettikleri tek kullanımlık her bir pipet ucu ELISA plakasındaki bir kuyucuğu temsil ediyor. Ayrıca çok uçlu tasarımlar ile aynı anda sekiz test gerçekleştirilebiliyor. Uçların pipetlerin çoğuna uyum göstermesi sayesinde, numunelerin transferini kontrol etmek de kolaylaşıyor.

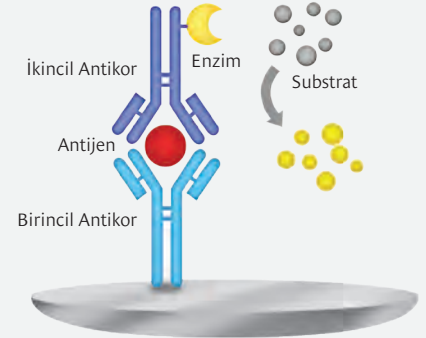
Araştırmacılar tasarımları sayesinde ELISA testinin temel ilkelerinde herhangi bir değişiklik yapmadıklarını, sadece aynı testi daha ucuz, daha hızlı ve daha ulaşılabilir hâle getirdiklerini vurguluyorlar. Nitekim, prostat kanserini tespit etmek üzere alınan numunelerin analizi geleneksel testlerde kullanılan malzemelerin onda biriyle gerçekleştirildi.



Rekabetçi ELISA Yöntemi

1976'da geliştirilen yöntemde temel olarak kuyucukların yüzeyi belirli bir referans antijenle kaplanır. Ölçüm yapılacak örnek ve antikor önceden belirli sıcaklık ve koşullarda bekletilir. Bu aşamada örnekteki antijenler antikorlara bağlanır. Daha sonra bu antijen-antikor karışımı kuyucuklara eklenir. Örnekte ne kadar çok antijen varsa boştaki antikorlar da o kadar az olur. Kalan boştaki antikorlar ise referans antijene bağlanır. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara birincil antikora özgü enzim işaretli ikincil antikor eklenir. Tekrar yapılan yıkama işleminden sonra kuyucuklara uygun substrat ilave edilir. Oluşan renklenmeden yararlanılarak sonuçlar hesaplanır.

Bu yöntemde analiz edilen örnekteki antijen miktarı ile oluşan renk yoğunluğu birbirleriyle ters orantılıdır. Bu yöntem, düşük molekül ağırlığa sahip antijen, peptit ve steroid analizleri için yaygın olarak kullanılır.



Sandviç ELISA Yöntemi

Bu ELISA yönteminde temel olarak iki farklı antikor kullanılır. Antijene özgü yakalama antikoru mikropılaka kuyucuklarının yüzeyi üzerinde tutulur ve bu antikora antijen bağlanır. Daha sonra antijene özgü enzim ile işaretlenmiş tespit antikoru eklenir. Belirli sıcaklık ve koşullarda bekletilen örneğe yıkama işleminden sonra uygun substrat eklenir. Oluşan renklenmeden yararlanılarak sonuçlar hesaplanır. İlgili antijenin iki antikor molekülü arasında sıkışmış olmasından dolayı yöntem sandviç ELISA denir. 1977 yılında geliştirilen bu yöntem diğer ELISA tekniklerinden 2 ila 5 kat daha hassas sonuçlar verebilir.

Üretilen pipet uçları üç ana bölümden oluşuyor: giriş silindiri, analiz bölgesi ve pipet muhafazası. Giriş silindiri 3 mm dış çapa ve 15 mm uzunluğa sahip. Böylece numune ve reaktif maddeler analiz bölgesine kolaylıkla çekilebiliyor. Analiz bölgesi ve giriş silindiri kısımları yaklaşık 50 µL (mikrolitre) sıvı alabiliyor. Pipet muhafazası bölümü ise çeşitli cihazlara takılmaya uygun ve kirlenmeyi önleyecek şekilde tasarlanıyor.

Sonuç olarak, bu araştırma sayesinde ELISA testlerinde uygulanan aşamaların sayısı en aza indirgeniyor. Kullanılan yüksek maliyetli malzemeler ve cihazlara ihtiyaç azaltılıyor. Uzman kişilerce yapılması gerekli olan klasik ELISA testleri temel eğitimler verilen kişilerce gerçekleştirilebilir hâle geliyor. Analizlerin hassasiyetinde ve tayin limitlerinde gelişmeler sağlanıyor. Test sonuçları cep telefonu entegrasyonu ile kolaylıkla paylaşılabilir. Geliştirilen yeni yöntem ile kısıtlı kaynaklara sahip herhangi bir laboratuvarında ELISA testlerinin daha hızlı ve daha ucuz bir şekilde gerçekleştirilebilmesi mümkün oluyor. ■

Üç boyutlu baskı teknolojileri sayesinde düşük maliyetli ve kolayca erişilebilir pipet uçları üretiliyor. Masaüstü üç boyutlu baskı makineleri kullanılarak üretilen uçlar yardımıyla protein, nükleik asit ve çeşitli biyomoleküllerin tayini kolaylıkla gerçekleştirilebiliyor.

Kaynaklar

Sharafeldin, M., Kadimisetty, K. Ve ark., "Accessible Telemedicine Diagnostics with ELISA in a 3D Printed Pipette Tip", *Analytical Chemistry*, Cilt 91, ss. 7394-7402, 2019.

Gan, D.S., Patel, K.R., "Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", *Journal of Investigative Dermatology*, Cilt 133, ss. 1-3, 2013.

Aydın, S., "A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA", *Peptides*, Cilt 72, ss. 4-15, 2015.

<https://today.uconn.edu/2019/05/new-3d-printed-technology-lowers-cost-decades-old-medical-testing/>

<http://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html>

<https://www.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa>

<http://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/april/what-are-the-differences-between-elisa-assay-types/>

Sandviç Elisa Yönteminin ayrıntılı aşamaları

