

## **KONJUGET ÜRETİMİNDE KULLANILMAK ÜZERE HAMSTER - TAVŞAN VE MERKEPLERDEN KUDUZ İMMUN SERUMUNUN ELDE EDİLMESİ**

Orhan AYLAN (\*)

### **GİRİŞ**

Kuduz, inkubasyon periyodu oldukça uzun olan viral bir hastalıktır. Kuduz şüpheli materyalin hızlı ve spesifik teşhisinin yapılması aşı uygulaması için gereklidir.

Bu önemli hastalığın tedavi ve kontrol altına alınması fikri ile ilk defa Pasteur zamanında başlar. Daha sonraları 1940 yılına kadar dünyanın her tarafında ya Pasteur aşısı veya Pasteur aşısının modifikasyonları kullanılmıştır. Sonraları çeşitli kuduz aşıları geliştirilmiştir. Günümüzde ise doku kültürü aşıları başarıyla tatbik edilmektedir (3).

Kuduzun biyolojik teşhisi için ilk defa 1950'de Coons ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen Floresan Antikor tekniğinin uygulanması 1958 yılında Goldwasser ve Kissling tarafından olmuştur.

F.A. tekniği özgünlüğü ve hızlılığı bakımından mevcut tekniklerin en iyisidir. Bu teknik hayvan inokulasyonu ile yapılan teşhisin yerini büyük ölçüde almıştır. F.A. tekniği direkt ve indirekt metod olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır. İndirekt metod biraz daha uzun olmakla beraber her iki metod da aynı duyarlılıkla kullanılabilir (9).

---

(\*) Etlik Hay. Hast. Araşt. Enst. Kuduz Teşhis Lab. Asistanı

Floresan Antikor tekniği Floresans boya maddesi işaretli antikorlar yardımıyla doku kesitlerinde, hücre kültürlerinde ve yayma preparatlarda bulunabilen özel antijen ve antikor komplekslerinin araştırılmasında kullanılan doku ve hücre kimyası ile immunolojik yöntemlerin karışmasından oluşmuş bir laboratuvar yöntemidir. Bu olay özde spesifik bir antijen + antikor reaksiyonudur (4).

İçinde özel bir antijen bulunduran doku veya hücreler ya da antijenik yapıya sahip mikroorganizmalar, bunlara karşı hazırlanmış olan ve floresan boyalarla işaretli özel antikorlarla reaksiyona girdiklerinde ve floresan mikroskopta incelendiklerinde bu antijen + antikor reaksiyona has özel bir renk ışıdaması gösterirler (4).

F.A. tekniğinin uygulamadaki başarısı belirli faktörlere bağlıdır. Öncelik konjugasyon işleminde kullanılacak antiserum seçimindeki özendir. Bu antiserum;

- 1 — İlgili antijenle mutlaka kross reaksiyon vermelidir,
- 2 — Absorbsiyon özelliği yüksek olmalıdır,
- 3 — Yüksek düzeyde antikor titresine sahip olmalıdır,
- 4 — Konjuge edilinceye kadar —20 C° veya liyofilize halde saklanabilmelidir.

Ayrıca konjuge edilmiş antikor ile antijenin birleşebilmesi için şartların uygunluğu da önemlidir.

Antiserum hazırlanışındaki başarı immunglobulinlerin elde edileceği deneme hayvanının seçimi ile başlar. Daha sonra immunizasyon yolu, yöntemi, adjuvant kullanılıp kullanılmadığı ve süresi de immunizasyonda rol oynar (4).

Sonuçta F.A. tekniğinin teşhisindeki başarısı belirtildiği şekilde iyi seçilmiş bir immun serum ve tam olarak uygulanan konjugasyon işlemleri ile ilgilidir.

## MATERYAL VE METOT

Üç ayrı hayvandan elde edilecek hyperimmun serumlar için ayrı immunizasyon yöntemleri kullanıldı.

1 — **MERKEP** : Bu amaç için üç merkep Pasteur metodu ile immunizasyona tabi tutuldu. Hayvanların üçüne de aynı gün başlamak üzere;

1. günden 60. güne kadar gün aşırı 20 ml Semple tipi aşı,

61. günden 72. güne kadar 3'er gün ara ile 4 enjeksiyon, her enjeksiyonda Fix kuduz virusu ile enfekte 1/4 tavşan beyni süspansiyonu,

73. günden 88. güne kadar 4'er gün ara ile 4 enjeksiyon her seferinde Fix kuduz virusu ile enfekte 1/2 tavşan beyni süspansiyonu,

89. günden 98. güne kadar 5'er gün ara ile 2 enjeksiyon, her seferinde bütün bir tavşan beyni,

106. gün birinci kan alma,

136. gün 1 enjeksiyon, bütün bir tavşan beyni, (Virus Fix ile enfekte)

144. gün ikinci kan alma (3).

Merkeplerden 144. gün ikinci kan almadan sonra alınan kanın serumu ayrıldı ve serum virus nötralizasyon testi ile Atanasiu metoduna göre titresi yapıldı. Serum önce 56°C'de 30 dakika inaktive edildi, serumun 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000 dilasyonları hazırlandı. Daha önce titresi yapılarak bilinen Standart Eprüve Virus (CVS)'in 300 LD'si ile serum dilasyonları eşit miktarda karıştırıldı (1, 7).

Serum virus karışımı 1,5 saat 37°C'de etüve kaldırıldı. Sonra her dilusyondan 0,03 ml 5'er fareye intra cerebral olarak inokule edildi. Aynı gün CVS tekrar titre edildi. Aşılınmış fareler 14 gün gözetimde tutuldu, ölen ve hastalananlar kaydedildi, sonuçlar Reed ve Muench metoduna göre hesaplandı. Sonuçta MICLD<sub>50</sub>10<sup>3,855</sup> titrede hyperimmun serum elde edildi. Bu serumdan konjuget hazırlandı.

2 — **TAVŞAN** : Bu amaç için dört adet tavşan enstitü elevajından temin edildi. Bir tanesi kontrol bırakılarak diğer üç tanesine immunizasyon programı uygulandı. Enstitümüzde üretilmekte olan Semple aşısı burada yine immunizasyon için kullanıldı. Dört hafta süreyle tavşanların intra peritoneal enjeksiyonları ile immunizasyonları sağlandı, (1'er ml). 5. hafta ve 6. hafta Fix virusun % 10'luk süspansiyonundan 1'er ml intra peritoneal enjeksiyon yapıldı. Son enjeksiyondan 10 gün sonra hayvanlardan kan alındı. Serum ayrıldıktan sonra 56°C'de 30 dakika tutarak inaktive edildi, (5, 7, 9, 12).

Merkeplerde olduğu gibi serum virus nötralizasyon testi yapıldı. Sonuçta MICLD<sub>50</sub>10<sup>3,756</sup> titrede hyperimmun serum elde edildi.

3 — **HAMSTER** : İlk olarak enstitü elavajından temin edilen 4 haftalık bir grup hamstere (30 civarında) intra cerebral olarak stok CVS kuduz virusunun % 1'lik süspansiyonundan 0,05 ml inokule edildi. 5. ve 6. günlerde ataxie, paralyse ve benzeri semptom gösterenlerin beyinleri toplandı, beyin ve spinal cord dokuları % 0,85 NaCl ile % 20'lik süspansiyon oluncaya kadar ezildi. Bu doku süspansiyonu santrifüj tüplerine aktarılarak 600 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant sıvı alınıp bir dizi işleme β-propiolactonla inaktive edildi (Hamster kuduz virusunun belirli miktarı ki, denemede 100 ml alındı). 9 kısım White Mineral Oil ve 1 kısım Arlecal A karıştırılıp adjuvant hazırlandı. Sonuçta 100 ml virus süspansiyonu tedricen artan miktarda 100 ml civarındaki adjuvanta ilave edildi (magnetik karıştırıcı üzerinde). İmmunize edici antijen hazırlandıktan sonra immunizasyon programı uygulandı. Buna göre :

25 adet Hamstere 4 hafta süreyle (haftada 1 enj.) immunize edici antijenden 2,0 ml intra peritoneal enjeksiyonlar yapıldı.

5. hafta bir enjeksiyon % 5'lik Aktif hamster CVS kuduz virusu 1,0 ml verildi. 7. hafta bir enj. % 10'luk Aktif hamster CVS kuduz virusu 1,0 ml verildi. Bu son enjeksiyondan 14 gün sonra kan alındı ve serum ayrıldı, inaktive edildi. Serum virus nötralizasyon testi yapıldı, MICLD<sub>50</sub>10<sup>3,548</sup> titrede hyperimmun serum elde edildi (5).

Her üç ayrı serumdan hazırlanacak konjugat için Batty, Marshall ve Riggs metodlarından yararlanıldı (5).

### Konjugatın Hazırlanma İşlemleri :

1 — Serumların pH'ları N/10 NaOH ile 8,5'a ayarlandı.

a — Merkep Serumu	100 ml
b — Taşvan »	50 ml
c — Hamster »	15 ml idi.

2 — % 0,4 oranında distile su ile hazırlanmış Rivanol serumu manyetik bir karıştırıcıda kendi hacminin 3,5 misli oranında yavaş yavaş ilave edildi. Bu işlem her üç serum içinde uygulandı.

3 — Bu karışımlar 2500 - 3000 devirde 20 dakika santrifüj edildi. Dipte biriken tortu atıldı (bunda albumin, alfa ve beta globulinler vardır).

4 — Gamma globulin içeren sıvı kısım ölçüldü, her 100 ml için 1,2 gr active kömür ilave edilip manyetik karıştırıcıda 5 dakika karıştırıldı. Böylece solüsyondaki rivanol ayrılmış oldu.

5 — Bu karışım, içerisinde Whatman No 42 filtre kâğıdı yerleştirilmiş, Buchner hunisinden süzülme suretiyle aktif kömürden ayrıldı.

6 — Elde edilen berrak serum miktarı ölçüldü, eşit miktarda tam doymuş amonyum sülfatla yavaş yavaş karıştırıldı. Bu karıştırma işlemi manyetik karıştırıcı üzerinde 4°C'de 24 saat buzdolabında yapıldı. Böylece tam bir presipitasyon ile gamma globulin presipite edildi.

7 — Ertesi gün karışım 3000 devirde 15 dakika santrifüj edildi, dipte biriken çöküntü alındı. Bu çöküntü ilk volümünün 1/5 oranında pH: 7,5 olan PBS ile eritildi.

8 — Bu eritilen Gammaglobulin, deliklerinin çapı 25 amstrog olan dializ membranına kondu, membranın iki ucu sıkıca bağlanıp pH: 7,5 olan PBS içeren beherglasa konarak 24 saat buzdolabında dialize olması sağlandı. Bu sürede en az üç kez PBS değiştirildi.

9 — Bu süre sonunda saf olarak gamma globulin içeren bu sıvı alındı.

10 — Bu sıvının protein konsantrasyonun ayarlanması gerektiğinde protein tayini Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biokimya kürsüsünde yapıldı (Lawry Met.).

Sonuçlar şu şekilde belirlendi :

Merkep	:	61 mg/ml
Tavşan	:	14 mg/ml
Hamster	:	20 mg/ml

11 — 1 ml.'de 10 mg. protein konsantrasyonu elde etmek için de 1/10 nisbetinde karbonat buffer olacak şekilde tuzlu su ile sulandırıldı.

Merkep için :	50 ml PBS
	1 ml C.Buffer
	10 ml Serum
	<hr/>
	61 ml

Tavşan için :	3 ml PBS
	1 ml C.Buffer
	10 ml Serum
	<hr/>
	14 ml

Hamster için :	7,2 ml PBS
	8,0 ml C.Buffer
	8,0 ml Serum
	<hr/>
	16,0 ml

**Gamma Globulinin Fluorescein Isothiocyanate ile boyanması :**

1 mg. protein için 0.025  $\cong$  0,03 mg. fluorescein isothiocyanate hesap edilip manyetik karıştırıcıda ilave edildi ve bir gece buzdolabında bırakıldı. Gammaglobulindeki fazla boya sefadexden süzülme suretiyle uzaklaştırıldı (6, 7, 10, 11).

Bu süzme işlemi içinde süperphine G 25 Sephadex kullanıldı. 20 gr. kadar sephadex 200 ml. tuzlu su ile karıştırılıp çökmesi için yaklaşık 15 dak. beklendi. Sonra üzerindeki sıvı dökülüp yeniden 200 ml. tuzlu su kondu, bu işlem üç kez yapıldı. Son olarak tekrar 200 ml. tuzlu su kondu ve hemen çapı 3 cm. olan ve musluk kısmına yakın cam pamuğu yerleştirilmiş bir bürete aktarıldı. Musluğu açıldı, sefadexin fazla suyu dışarı alındı. Böylece yaklaşık 10-15 cm. kadar sefadex kalmış oldu. Bunun üzerine bûretin çapı kadar kesilen süzgeç kâğıdı kondu (Whatman No 42). Daha sonra F.I.T.C.'li gamma globulin pipetle yavaş yavaş bûretin içine kondu. Musluk açılıp akan renksiz kısımlar atıldı. Fluoresceinli kısım damlamaya başlayınca yeni bir beherglas konuldu ve toplama işlemine başlandı. Konjuget süzülerek sephadexden sonra cam pamuğuna geldiğinde bûretin üst kısmında PBS konulup konjugetin tümünün alınması sağlandı. Böylece üretim tamamlanmış oldu (7, 8, 11).

Bu işlemler sonunda Konjuget Sikes metodu ile titre edildi. Altışar adetlik iki seri tüp alındı. Üzerlerine 1/6, 1/8, 1/10, 1/12, 1/14, 1/16 yazıldı. Pasteur pipeti ile iki sıra altışar adetlik tüplere 1'er damla hazırladığımız konjugetten damlattık. Birinci sıradaki altı tüpe normal fare beyni süsp.dan birinci tüpe 5 damla ikinci tüpe, 7 damla ve son tüpe 15 damla damlatıldı. İkinci sıradaki altı tüpe ise enfekte fare beyni süsp. aynı şekilde damlatıldı. Tüpler oda sıcaklığında 10 dak. tutuldu. Daha önce bir müsbet materyalden hazırlanmış tuşe preparatlar asetondan çıkarıldı. Daha sonra bu preparatların sol tarafına Konjuget + N.F.B. süspansiyonunu 1/6'lık dilisyonundan 1 damla sağ tarafa ise Konjuget + E.F.B. süspansiyondan bir damla damlatılıp tekniğine göre boyama işlemi yapıldı. Bu işlem diğer dilisyonlar için de uygulandı. Sonuçta preparatlar Floresans mikroskopta incelemeye tabi tutuldu. Önce sol taraf (Konj. + NFB süsp.) daha sonra sağ taraf (Konj. + EFB süsp.) muayene edildi. Sol tarafta grimsi yeşil doku arasında filizi yeşil veya yeşil sarı yıldız gibi parlak floresans veren cisimcikler en iyi görüldüğü, sağ tarafta (Konj. + EFB) sadece grimsi yeşil dokunun görüldüğü fakat floresans cisimlerinin görülmediği dilusyon Konjugatın titresini verdi (7).

## B U L G U L A R

Bu çalışmada sırasıyla :

Merkep hyperimmune serumundan hazırlanan konjugetin titresi:  
1/10

Tavşan » » » » »  
1/14

Hamster » » » » »  
1/12 dir.

Konjugetin hazırlanmasında;

Tavşanların 1/2000 titre  
Hamsterlerin 1/500 »  
Merkeplerin 1/4000 » veren serumlar kullanıldı.

## T A R T I Ş M A

Kuduzun teşhisinde önemli bir yer tutan F.A. tekniğinin uygulanmasında iyi bir konjugetin varlığına ihtiyaç olduğu açıktır.

Bu tekniğin başarılı olmasında yüksek titreli bir serumdan elde edilen konjuget ve konjugatın üretiminde kullanılan floresan boya maddesinin kalitesi ve tecrübeli elemanın rolü de büyüktür.

Yaptığım bu çalışma ile üç ayrı hayvan türünden çeşitli titrelere de hyperimmun serumlar elde edilerek konjugatlar hazırlanmıştır. Tavşanlardan elde edilen serumdan hazırlanan konjugat 1/14 olarak en yüksek titreyi vermiştir. Ayrıca diğer iki konjugata nazaran daha iyi ve parlak bir görüntü vermiştir.



## Ö Z E T

Bu çalışmada farklı üç hayvan türünden kuduz hyperimmun serumunun elde edilmesi ve bu hyperimmun serumlardan konjugat hazırlanması amaç edinilmiştir.

Buna göre merkeplerden  $MICLD_{50}10^{3,855}$  hamsterlerden  $MICLD_{50}10^{3,548}$  ve tavşanlardan ise  $MICLD_{50}10^{3,755}$  titrede hyperimmun serumlar elde edilmiştir. Buna bağlı olarak bu üç ayrı serumdan hazırlanan konjugatların titreleri ise;

Merkep	1/10
Tavşan	1/14
Hamster	1/12 olarak saptanmıştır.

## S U M M A R Y

To obtain rabies hyperimmune sera by using hamster, rabbit and donkey to produce conjugate.

In this study our aim was to obtain rabies hyperimmune sera by using three different animal species including donkey, rabbit and hamster and to prepare conjugate from them.

As a result of this study we obtained hyperimmune sera in  $MICLD_{50}10^{3,855}$  for donkeys,  $MICLD_{50}10^{3,548}$  for hamsters and  $MICLD_{50}10^{3,756}$  for rabbits.

The titers of conjugates prepared from these three hyperimmune sera were follows;

Donkey 1/10, Rabbit 1/14, Hamtser 1/12.

## L İ T E R A T Ü R

- 1 — ATANASIU, P. (1973) : Laboratory Techniques in Rabies (third edition) Quantative Assay and Potency Test of Antirabies Serum and Immunoglobulin. s. 314-318.
- 2 — ATANASIU, P., TSIANG, H. et VIRAT, J. (1974) : Obtention d'Ig G anti-nucleocapsides rabiques. Purification et conjugaison a la peroxydase ou a l'isothiocyanate de fluorescéine. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur 125 B, 85-98.
- 3 — ATANASIU, P., PERRIN, P., FAVRE, S., CHEVALLIER, G., TSIANG, H. (1983): Immunofluorescence and immunoperoxidase in the diagnosis of rabies. Symposium international sur l'immunodiagnostic comparé des infections virales, Montreal (Canada) Academic Press, New York, s. 141-155.
- 4 — BURGU, İ. (1988) : Doktora Programı Ders Notları.
- 5 — DEAN, D.J., ABELSETH, M.C. (1973) : The Fluorescent Antibody Test. Laboratory Techniques in Rabies (Third Edition) s. 73-84.
- 6 — GARDNER, P.S., MC QUILLIN, J. (1980) : Application of immunofluorescence. Rapid Virus Diagnosis, Second Edition. s. 40-85.
- 7 — GÜLEY, M., TUNUS, M., TOKER, M., ŞENTÜRK, M. (1968) : Floresan Antikor Tekniği ile Kuduz Teşhisi. Etlik Vet. Bakt. Enst. Dergisi. Sayı 5-6 s. 104-118.
- 8 — HIJMANS, W. (1975) : Proceedings of the fifth International Conference on immunofluorescence and Related Techniques. Annals New York Academy Science 254.
- 9 — KUHLMANN, D. (1984) : Preparation of Immune Sera and Antibodies. Immuno Enzyme Techniques in Cytochemistry Verlag Chemie s. 31-41.
- 10 — LEPINE, P., ATANASIU, P. (1966) : Production of Therapeutic Antirabies Serum Laboratory Techniques in Rabies WHO Monograph Series No 23, Geneva.
- 11 — NAIRN, R.C. (1976) : Fluorescent Protein Tracing, 4 th Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York.
- 12 — TRIMARCHI, C.V. and DEBBIE, J. (1974) : Production of rabies fluorescent conjugate by immunization of rabbits with purified rabies antigen. Bull. World Health Organ. 51, s. 447-449.