

VİRAL HASTALIKLARDA TEŞHİS METODLARI

(*) Arife ERTÜRK

İnfeksiyöz hastalıkların tanısında, uzun yıllar etkenlerin duyarlı kültür sistemlerinde izolasyonu ve identifikasyonu yoluna gidilmiştir. Çoğu mikroorganizmalar özellikle viruslar ve yavaş çoğalan bakterilerin kültürlerde üretilmeleri için uzun zamana ihtiyaç duyulduğundan, bu yöntem hastalıkların hızlı teşhisi bakımından bir dezavantaj olmuştur. Bazı virusların identifikasyonu yapılmış olduğu halde, kültür sistemlerinde üretilmele. i mümkün olmamıştır. Örneğin insanlarda Hepatitis A ve B virusları gibi.

Bu nedenle infeksiyöz hastalıkların tanısında direkt etken izolasyonu ve identifikasyonu yanısıra, hemaglutinasyon inhibisyon (HI), indirekt hemaglutinasyon (IHA), komplement fikzasyon (CF), serum nötralizasyon (SN), Agar-Jell prensipitasyon (AGF) gibi değişik serolojik testler geliştirilmiştir. Bunlardan başka dokulardaki ve hücrelerdeki antijeni görülür hale getirebilen birçok metotta uygulamaya konmuştur. Örneğin FAT, RIA gibi.

Virolojik teşhislerde virus önemli bir yer tutmaktadır. Usulüne uygun olarak gelen materyallerden virus elde edilerek teşhise gidilebildiği gibi etken üretmeksizinde teşhise gidilebilir.

Virusun direkt olarak tanısı:

Lezyondan alınan örneklerde virusun mikroskopik olarak tanısı, ışık mikroskobu ile yapılmaktadır. Bu yöntemlerle dokularda, bazı patolojik ve patognomik değişikliklerin, boyanmış, fikse edilmiş preparatlarda, viral antijenlerin, inklüzyon cisimciklerinin ve etkeninde elektron mikroskop ile doğrudan doğruya görülmesi ile tanı konur. Diğer tanı yöntemlerine oranla daha süratli ve basit olmasına rağmen kullanma sahası sınırlıdır.

1-Ekteni üretmeksizin, morfolojik olarak yapılan tanı:

Bu tanıda elektronmikroskop önemli bir yer tutar.

Virusların tanısında, bir yandan elektron mikroskopinin geliştirilmesi ve diğer yandan çeşitli boyama ve özellikle çeşitli x ışınlarının difraksiyon teknikleri ile yapılan incelemeler, değerli bilgilerin ortaya çıkması neden olmuştur.

(*) Etlik Hay. Hast. Araşt. Enst. Vet. Hek.

Virüs incelemelerinde gerek klinik örneklerden, gerekse virüs inokule edilmiş doku kültürü ve embriyolu yumurta sıvılarında elektron mikroskopik incelemelerinde virüs partikülleri saptanmakta ve aynı zamanda resimleri çekilmektedir.

Elektron mikroskopda hayvansal virüslerin görünüşleri oldukça değişik şekillerdedir. Bunlar, yuvarlak görünümde olanlar örneğin Myxovirüs, adenovirüs, herpesvirüs, picorna virüsler, tuğla biçiminde olanlar pox virüsler mermi görünümünde olanlar kuduz virüsü ve şekilsiz olanlar paramyxovirüslerdir.

2- Histolojik Olarak Tanı:

Bazı viral enfeksiyonlarda, bizleri tanıya götüren spesifik inklüzyonlar şekillenmektedir. Bu inklüzyonlar ya hücrenin çekirdeğinde veya sitoplazmasında yahutta her ikisinde oluşmaktadır.

Yalnız bazı hayvanlarda belirli dokularda nonspesifik inklüzyonlarda görülebilmektedir. Onun için histopatolojik tanıda, lezyonlar kompozisyonu ile intrastoplazmik, intranükleer veya her ikisinde bulunabilecek inklüzyon cisimciklemi beraberce ele almak gerekir. Inklüzyon cisimcikleri HxE boyamalarında ya asidofilik veya bazofilik karakter gösterirler. Örneğin asidofilik intrastoplazmik inklüzyonlara kuduzda, hem intrastoplazmik hem intranükleer asidofilik inklüzyonlara distemper'de rastlanır.

Histolojik tanıda (IPS) immunoperoxidase boyama yönteminde kullanılmaktadır. IF metoduna benzer ve temelde, enzimle işaretlenmiş immunoglobulinler kullanılarak viral antijenin hücrelerde tesbitine dayanır. Bu tekniğin avantajı normal ışık mikroskobu ile görülebilen kalıcı bir boyama sağlanmasıdır.

3- Bilinen İmmün Serum Kullanarak Antijen Tesbiti:

Bunun için çeşitli metodlar vardır.

A- Hücre Kültürlerinde İmmunofloresans:

Birçok virüslerin antijenlerinin ya da antikorlarının araştırılmasında, tümör antijenlerinin aranmasında, gittikçe artan çapta ve önemde kullanılmaktadır. Süratli sonuç vermesi bakımından iyi bir tanı yöntemidir. İmmunolojik yöntemlerdeki, antijen antikor reaksiyonlarının aynıdır. Antikor molekülü florokrom ile bağlanır.

Böylece floresan veren boya ile işaretlenmiş olan antikor molekülü, hücrelerdeki antijenle birleştiğinde verdiği renk floresan mikrostopta izlenir. Bu maksat için kullanılan florokromlar, I. dimetik amino naftalin, floressein isotiyosiyanat, Lissamin ve rodamin'dir.

Floresan antikor tekniği iki yöntemle yapılmaktadır.

a) Direkt Yöntem :

Bu yöntemde antiviral antikorlar doğrudan doğruya floresan boya ile birleştirilir ve sonra antijenle birleştirilerek mikroskopta izlenir.

b) İndirek Yöntem :

Önce antikor antijenle birleştirilip ve sonra bu antijen antikor kompleksi, floresan boya ile konjuge edilmiş antiglobulin ile karşı karşıya getirilerek antikor görünür hale getirilir.

B- Komplement Bağlantısı ile Virusların Tanısı :

Komplement fikzasyon reaksiyonu iki temel sistem halinde bulunur.

a) Antijen - antikor sistemi

b) Hemolitik sistem

Bu iki sistem arasında komplement birini tercih eder. Bu tercihte asıl önemli konu antijenle antikorun birbirinin homoloğu veya heteroloğu olmasıdır. Birbirinin homoloğu ise komplement antijen - antikor sistemi tercih eder, eğer heteroloğu ise bu defa komplement hemolitik sistemi tercih eder.

Amboceptörün koyun eritrositlerini hemolize edebilmesi için komplemente ihtiyaç vardır. Oysaki komplement entijen - antikor sistemi tercih eder, eğer heteroloğu ise bu defa komplement hemolitik sistemi tercih eder.

Amboceptörün koyun eritrositlerini hemolize edilebilmesi için komplemente ihtiyaç vardır. Oysaki komplement antijen - antikor bağlama sistemi içinde harcanmış olduğundan ortamda serbest komplement mevcut olmadığı için, amboceptörün koyun eritrositlerini lize etmesi mümkün olmayacaktır. Bu durumda komplement fikzasyon (+) demektir. Diğer durumda komplement amboceptörle birleşip, koyun eritrositlerini lize edecek ve CF (-) olacaktır.

C- Passive Hemaglutination Test (PHA) :

İndirekt hemaglutinasyon olarakta adlandırılır. Antijen yada antikorun eritrositlerle kimyasal bağlantısıyla ilgili klasik immunolojik bir testtir. Bu test presipitasyon teste göre daha hızlı ve duyarlıdır. Bu yüzden yaygın kullanılmaktadır.

D- Counterimmuno Elektrophoresis (CIEP) :

CIEP - AGİD ve elektrophorezisin birleştirilmesiyle geliştirilmiş bir teşhis metodudur ve bu teknik jelle elektrik akımı verilerek pek çok antijen preparatında bulunan elektroforetik akımın jel aracılığı ile anot'a (+) antikorların counterelektro endosmotik akımın etkisiyle katot'a (-) doğru yönlendirilmesi esasına dayanır. Bu teknik AGİD'den daha hassastır ve 50° C sıcaklığa kadar hassasiyet gösterir. Laboratuvar şartlarında uygulanması kolay bir metodur.

E- Hemaglutinasyon ve Hemaglutinosyon İnhibisyon

Testiyle Tanı:

Birçok canlı virus türleri ve çoğunlukla zarlı viruslar, influenza, toga, Arbo viruslar ve Rabdo viruslar gibi, bunun yanında zarsız Adenoviruslar, picorna viruslar, hemaglutinasyon özelliğine sahiptirler. İnsan ve hayvan eritrositlerini aglutine ederler. Bu özelliklerinden faydalanılarak lamda ve tüplerde hemaglutinasyon testiyle teşhis edilebilirler.

Eritrocyt olarak en çok % 0,5 lik tavuk eritrocytleri kullanılır ve antijen varlığı saptanır.

Hemaglutinasyon inhibisyon testinde, spesifik serum virus ile birleşerek onun hemaglutine etme yeteneğini ortadan kaldırır. Bu reaksiyon ile bilinen bir serum yardımıyla, şüpheli bir antijen veya bilinen bir virus antijeni aracılığı ile şüpheli bir serum teşhis edilebilir. Eritrositlerin aglutine olması serumun negatif olduğunu gösterir.

F-Presipitasyon Testiyle Tanı (AGİD)

Agar jel presipitasyon ve immindiffüzyon testi ile de anılır. Presipitasyon reaksiyonu ile bilinmeyen bir virus, bilinen bir immun serum yardımı ile teşhis

edilebildiği gibi, şüpheli serum, bilinen bir virus antijeni aracılığı ile, teşhis edilebilir.

Virolojide presipitasyon metodu pH derecesi 7.0 - 8.0 olan yarı .katı vasatlar içinde çoğunlukta % 1 lik Noble agarda uygulanır.

Agar jel presipitasyon reaksiyonu agar içerisinde antijen ve antikorun birbirlerine doğru hareket ederek optimal miktarlarının karşılaştığı noktada bir çöküntü oluşturması esasına dayanır. Bu reaksiyonlarda antijene precipitogen, Antikora precipitin ve çöküntüye de precipitat adları verilir.

Presipitasyon reaksiyonu komplemant fiksasyon reaksiyonundan 10-20 defa az hassas çalışır, çünkü antijen antikor çöküntüsünün gözle görülebilmesi için yoğun miktarlarda olması gerekir. Reaksiyonda antijen olarak yüksek titrelili virus materyalleri kullanılmalıdır.

ETKENİ ÜRETEREK TEŞHİS

1- Virus elde edilmesi (İzolasyon)

Virus izolasyonu doku kültüründe, embriyolu tavuk yumurtasında deney hayvanlarında yapılabilir. Virus izolasyonunda her zaman başarılı olunamaz. Materyalin alınma zamanı, alınan materyalin türü materyalin paketlenme ve yollanma biçimi virus izolasyonunda önemli rol oynar.

Virus izolasyonunda muayene sisteminin seçimi de önemlidir. Muayene sisteminin seçimi, ön hazırlık ve klinik teşhis ile ilgili olduğu gibi, uygulanacak test sisteminin duyarlılığı ile de ilişkilidir.

Virus izolasyonu için laboratuvara gönderilen materyaller çok çeşitli olup, bunların doku kültürlerine ekimlerinden önce bazı işlemlere tabi tutulmaları gereklidir. Genellikle materyallerin parçalanması için fiziksel, kimyasal işlemler yapılır.

VİRUS İZOLASYONU İÇİN ORGANLARIN HAZIRLANMASI

Virus izolasyonu için kullanılacak organlar (böbrek, karaciğer, akciğer, beyin, embriyo) mümkün olduğu kadar taze ve steril şartlarda alınmış olması gerekir. Bu gibi organların iç kısmından küçük bir parça alınır ve 1 / 10 oranında PBS veya virus üretme vasatı içine konur ve üzerine her cm² için 300-500 ünite penicillin, 300-500 mikrogram streptomycin ve 50 mikrogram mycostatin ilave edilir. Materyalin parçalanması havanda veya homogenizatörde yapılır. Porselen havanlarda materyal parçalanırken, havan içine bir miktar ince steril kum konur ve antibiyotikli PBS içindeki, makasla küçük parçalara bölünmüş olan materyalden konduktan sonra üzerine PBS veya virus üretme vasatı ilave edilir. Ezilme ve karıştırma ile koyu kıvamda bir süspansiyon meydana geldikten sonra geri kalan PBS veya virus üretme vasatı bu süspansiyon üzerine ilave edilir. Homogenizasyondan sonra organ süspansiyonları 20-30 dakika 2000-2200 devirde santrifüj edilir. Antibiyotikle muamele edilmiş doku süspansiyonu 1 saat + 4 ° C de tutulur ve sonra üst kısım doku kültürüne, embriyolu tavuk yumurtasına inokule veya deney hay-

vanlarını enjekte edilir.

İnokulasyonlar materyalin hazırlanmasından hemen sonra yapılmalıdır. Lüzumu halinde - 70 ° C de de saklanabilir.

HASTALIKLA BULAŞIK SWABLARIN HAZIRLANMASI

Göz veya burun akıntısı veya vajen akıntısı steril swablarla alınır. Alınır alınmaz içinde transport vasatı bulunan steril tüplere konur. Sekretlerinden daha iyi süspansiyon yapılabilmesi için swab sıkılarak sıvı çıkarılır. 2 milimetre sıvıya 5000 ünite penicilin ve 5000 mikrogram streptomycinde 50 mikrogram fungizon ilave edilir. + 4 ° C'de 1 saat bekletildikten sonra inokule edilir. Bogaz ve tracheal çalkantı materyalleride swab süspansiyonları gibi işlem görür.

SU HAVA ve DİĞER ANORGANİK MATERYALLERİN HAZIRLANMASI

Hayvansal virus türleri çok defa doğal sularda ve kirli sularda bulunduğu için sudan virus izolasyonu her geçen gün daha da önem kazanmaktadır. Sulardan virus izolasyonu güç olmaktadır. Bunun nedeni izolasyon için sulardaki virus miktarının konsantre edilmesi gereğidir. Ayrıca virus sularda çok çabuk inaktive olur.

Havadan inokulasyon materyali şu şekilde hazırlanır. Fazla miktarda havanın yavaş yavaş PBS veya virus üretme vasatı içine pompalanmasıyla ve pompalamadan sonra materyalin sudaki gibi muamele edilerek konsantre edilmesiyle elde edilir. Demir (III) klorid virusların konsantre edilmesinde kullanılan önemli bir çöktürme maddesidir.

İkinci basamak, olarak hazırlanan bu inokulum materyalinde, virusun bulunup bulunmadığını ortaya koymak için aşağıdaki inokulasyonlar yapılır.

- a) Çeşitli hücre kültürlerine ekilir.
- b) Embriyolu yumurta inokule edilir.
- c) Deney hayvanlarına inokule edilir.

a) DOKU KÜLTÜRÜNE EKİM TEKNİĞİ

Doku kültürlerine iki şekilde ekim yapılır.

- 1) Adsorbsiyon tekniği ile ekim
- 2) Adsorbsiyon tekniğine bağlı kalmadan, viruslu materyalin hücre üretimi ile birlikte yapıldığı ekim;

- 1) Adsorbsiyon tekniği ile ekim;

Monolayer hücreler iki kez PBS ile yıkanır. Tekniğine göre hazırlanmış inokulum materyalinden her bir tüpe 0. 1ml. inokule edilir. Bir saat adsorbsiyon için etüvde tutulur. Her 15 dakidada- bir inokulum hücrelere yayılır. Bir saat sonra inokulum maddesi dökülür. Hücreler iki defa PBS ile yıkanır. % 3 fötal calf serumlu vasat konur. Hücre her gün mikroskop altında incelenerek CPE aranır.

2- Adsorbsiyon tekniğine bağlı kalmadan, viruslu materyalin hücre ile birlikte yapıldığı dönem.

İnokulum maddesi hazırlanır, hücre kültürü ile karıştırılıp tüp veya şişelere taksim edilir. Etüve konur, her gün mikroskop altında CPE kontrol edilir. CPE oluşturan virüslerde, CPE oluşması hazırlanan inokulum maddesinde virusun varlığının delilidir.

Birçok virus türleride doku kültürlerinde üredikleri zaman hücre içinde kalırlar. Virusun hücrelerden ayırılması için hücrenin parçalanması veya virusun çıkarılması gerekir. Bunun için çeşitli fiziksel ve kimyasal metodlar uygulanır. Hücrelerin parçalanması için en çok kullanılan metod dondurma-çözdürme işlemidir. Belirli bir virus üretme zamanından sonra, kültürler - 20° de veya - 70°C de dondurulur ve oda derecesinde arasıra çalkalanmakla tekrar çözündürülür. Materyal 10 dakika 2200 devirde santrifüj edilerek hücre parçaları ayırılır ve üst kısım inokulasyon materyali olarak kullanılır. Sonikeyt cihazı ile de hücreler parçalanarak virüsler dışarı çıkarılır.

Bazı virüslerde hücre kültürlerinde üredikleri halde CPE oluşturmazlar. Örneğin BVD nin bazı suşları gibi. Bu durumda virusun varlığını ortaya koymak için özel testler uygulanır.

b) EBRİYOLU TAVUK YUMURTASINDA İZOLASYON

Embriyolu tavuk yumurtası virüslerin, üretilmesi için uygun bir ortamdır.

Değişik inokulasyon yollarının olması, aşı veya antijen hazırlanması için gerekli virusun üretilmesinde kullanılan önemli yöntemlerden biri olmuştur.

Embriyolu tavuk yumurtasına ekim, allantoik boşluğa, koriyoallantoik membrana, amniotik boşluğa ve yumurta sarısına olmak üzere dört şekilde yapılır.

1) Amniotik boşluğa ekim :

12-14 günlük embriyolu yumurtalara 0,1-0,2ml. miktarda kızamık, influenza veya mumps (kabakulak) virüsleri ekilir.

2) Koriyoallantoik membrana ekim :

10-12 günlük embriyolu yumurtalara 0.05ml. miktarda ekim yapılır. Çiçek grubu virüslerin izolasyonlarında bu yöntemden faydalanılır.

3- Allantoik boşluğuna ekim :

Genellikle 9-11 günlük embriyolu yumurtalar kullanılır. 0-2, 0,3ml. miktarda ekim yapılır.

4- Sarı keseye ekim :

6-8 günlük embriyolar tercih edilir. 0.2-04 ml. miktarda, mavi dil ve kuduz virüsleri için ekim yapılabilir. Ayrıca embriyoya intravenöz ve intrase-rebral enjeksiyonlar da yapılabilir. İntrase-rebral enjeksiyonlar, beyinde patolojik değişiklik yapan hastalıklarla ilgili çalışmalarda kullanılır. Herpes simplex ve kuduz virüsleri bu yolla enjeksiyon suretiyle üretilir. 6-12 günlük yumurtalar daha uygundur. İnokulasyon yolu, çalışmanın amacına ve virusun türüne bağlıdır. Ekimden sonra, inokulasyon şekline göre yumurtalar, dikey ya da yatay olarak kuluçka makinalarına konularak belli bir süre üremeye bırakılır. Yumurtalar embriyo ölünceye kadar veya optimal bir virus çoğalması oluşuncaya kadar bekletilir. Bazı virüsler düşük ısıda ürerler, bu gibi durumlarda 35°C veya daha düşük derecelerde üremeye bırakılır. Mavidil gibi bir kısım virüsler embriyoyu öldürür, çiçek gibi bir kısım virüslerde embriyoyu öldürmez.

Enfekte, embriyolu tavuk yumurtasında virüslü materyal, amnion sıvısından, allantoik sıvısından, korioallantoik membrandan elde edilir.

c) DENEY HAYVANLARINDA VİRUS İZOLASYONU

Burada şüphe edilen virüsa göre, hassas hayvanın seçimi önemlidir. Yaşında büyük önemi vardır. Çünkü süt emen yavrular virüslara yetişkinlerden daha duyarlıdır. İnokulasyon yolu da önemli bir faktördür. Laboratuvarda bu gaye için beyaz fare, hamster, kobay, rat, kedi ve tavşan kullanılır. Laboratuvardaki deney hayvanlarına genellikle intracerebral, intranasal, ve intraperitoneal intravenöz yollardan inokulasyonlar yapılır.

1- Intracerebral inokulasyon :

Neurotropic virüslerin izolasyonu için uygulanır. Bu maksatla hem yeni doğmuş yavrular hem de 3-4 haftalık yavru fareler kullanılır. 0.03ml. İnokulum materyali keskin iğneyle enjekte edilir. İnokulasyondan sonra bütün fareler kontrollere birlikte 30 gün gözlem altında tutulur.

2- Intranasal inokulasyonlar, pneumotropic virüslerin izolasyonu için uygundur. Hayvan eterle hafifce bayıltılarak 0,05ml. inokulum materyali solunum havasıyla burundan emdirilir. Solunum yolu virüslerinde 14 gün gözlem altında tutmak gerekir.

3- Intraperitoneal inokulasyon için daha çok kobaylar kullanılır. Psittakoid ve Rickettsial organizmleri izole etmek için uygundur. 0,5ml. inokulum materyali enjekte edilip, her gün hayvanların derecesi bir deftere kaydedilir.

Deneye alınan hayvanlar her gün mauiene edilir. Ölen hayvanlardan histopatolojik yoklamalar yapılır, gerekli dokular sonraki pasajlar için toplanır.

2- İDENTİFİKASYON (Virus Tiplendirme)

Tüm bu izolasyon yöntemleriyle çeşitli organlarda izole edilen virüs türlerinin tiplendirilmeleri gerekir. bu maksat için çeşitli yöntemler kullanılır.

a) Morfolojik olarak :

İzole edilen bir virüsün morfolojisi, elektron mikroskopunda tetkik edilerek identifikasyonu sağlanır.

b) Histolojik olarak :

İzole edilen virüs çeşitli boyalarla boyandıktan sonra, inklüzyon cisimciğinin özelliğine göre, identifiye edilir.

c) Serolojik olarak :

Bilinen immum serumlar kullanarak bir etkenin hangi virüs grubuna dahil olduğu saptanabilir.

Nötralizasyon testi, hemadsorbsiyon testi ve doku kültüründe plak redüksiyon testi, ön planda kabul edilen serolojik identifikasyon reaksiyonlarıdır.

d) BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNDEN FAYDALANILARAK YAPILAN VİRUS İDENTİFİKASYONU

1) HEMADSORBSİYON

Genellikle myxo ve paramyxo virüs grupları için kullanılır. Bu virüsler bazen belirgin bir CPE oluşturmazlar ve bu durumlarda virüs partikülünde bulunan hemaglutinin, hemadsorbsiyon testiyle saptanır.

Hemadsorbsiyon, kobay ve fare eritrocitlerinin, üreyen virüslerle birleşerek (adsorbe olarak) üzerinde bulunduğu konakçı sistem hücrelerinde

kümelere teşkil etmesi prensibine dayanır. Virusla doğrudan doğruya eritrosit karşı karşıya gelir. Yanlız burada birleşme mutlaka bir invitro sistem yani hücre sistemi içinde yapılmalıdır. Genellikle %0,5 lik eritrocit süspansiyon kullanılır.

Pozitif testlerde, mikroskopik muayene de eritrocitlerin doku kültürü üzerinde küçük topakçıklar (kümelere) oluşturduğu görülür.

İNDİREKT TEŞHİS

Antikor tesbiti

1) Hemaglutinasyon-Hemaglutinasyon İnhibisyon :

Direkt teşhis metodlarında anlatıldığı gibi, serumda mevcut antikorun ortaya çıkarılması için yapılır.

2) Nötralizasyon :

Daha çok viral daha az bazı bakteriyel antijenlerin ve antikorların saptanması için kullanılan bir metoddur.

Nötralizasyon reaksiyonu öncelikle kontrol edilmek istenilen bir serum içinde, herhangi bir virusa karşı, özel nötralizan antikorların bulunup bulunmadığını tesbit etmeye yarar. Nötralizasyon testinin temeli, içinde nötralizan antikorlar bulunan serumların, virus süspansiyonu ile karıştırıldığında virusun enfeksiyon yapma yeteneği önlemesine dayanır. Nötralizasyon testi, deney hayvanlarında embriyolu yumurtalarda ve hücre kültürlerinde yapılabilir.

Nötralizasyon testinin her yapılışında, virusun kontrol titrasyonları gereklidir, bu işlem serum-virus, karışımında en yüksek yoğunluktaki virus dozundan başlayarak (100 TCID₅₀) yapılır.

Eğer CPE görülmezse, gönderilen şüpheli serumda, bilinen virusa karşı nötralizan antikor vardır ve bu durumda bu antikorlar virusun homoloğu olduğu için virusu nötralize etmiştir.

CPE görülürse, gönderilen serumda virusa karşı nötralizan antikor yoktur. Buda hayvanın bilinen virusa karşı antikor taşımadığını gösterir.

Bir tek serum numunesinde tesbit edilen pozitif bir bulgunun, hali hazırdaki enfeksiyonu teşhiste değeri yoktur; çünkü nötralizan antikorlar yıllarca devam edebilirler ve bunların bulunması, geçirilmiş bir enfeksiyona bağlı olabilir. Bu bakımdan, nötralizasyon testi, epidemiyoloji çalışmaları için faydalı bir testtir; bir toplumda daha önce belirli viruslarla enfeksiyon olup olmadığını ortaya koymada faydalanılır bir testtir.

3- Komplement Fiksasyon :

İndirekt teşhis metodlarında anlatıldığı gibidir.

4- Komplement Absorbsiyon Testi :

Bu test komplement fiksasyon testinin duyarlılığını artırıcı yönde geliştirilmiş bir testtir.

5- Plak Testi :

Plak testten bir virusun enfeksiyözite gücünün saptanmasında, virusların saf olarak elde edilmesinde, virusların antijenik karakterlerinin saptanmasında yararlanır. Plak testi doku kültürlerine ekilen virusun ekildiği yerde bloke edilmesi esasına dayanır. Plak redüksiyon testiyle de, interferon varlığı ve

virus varlığı tesbit edilir.

6- İmmunofloresan Durdurma Testi :

Bu test floresan inhibisyon metod, nötralizan immunofloresan adlarıyla anılır. Bu metod direkt metoddaki bazı boyamaların spesifik olup olmadığını kontrol için uygulanır. Preparat önce konjuge edilmemiş immün serumla sonradan konjuge immün serumla karşılaştırılır. Eğer birinci aşamada antijen konjuge edilmemiş antikörlerle birleşmiş ise ikinci aşamada konjuge edilmiş antikörlerle birleşme olmayacağından pozitif reaksiyonlarda floresans görülmeyecektir.

Bu metodun ekonomik ve geniş rutin çalışmalar için adaptasyonu kolaydır. Ayrıca CPE oluşturmayan viruslar için yardımcıdır.

7- İndirekt İmmunofloresan Metod :

Viral antijenlerin tesbiti ve identifikasyonu için kullanılabilir gibi şüpheli serumların incelenmesi içinde kullanılabilir. Direkt metoddan daha hassas fakat spesifikasyonu daha zordur. Bilindiği gibi direkt boyamadada bilinmeyen bir antijenin tesbiti için kullanılacak bütün serumların ayrı ayrı konjuge edilmesi ve her biri ile ayrı ayrı boyama yapılması gerekir. İndirekt boyama ise aynı hayvan cinsine ait sadece bir konjuge antglobulin ve bilinen bir antijen yardımıyla antikörlerin araştırılması mümkündür.

Araştırılacak materyal önce immün serumun uygun dilusyonu ile karıştırılır. Nemli ortamda 30-45 dakika 37° C de reaksiyona bırakılır. Direkt metoddaki gibi PBS ile yıkanır. Daha sonra materyal konjuge antglobulinin optimal dilusyonları ile reaksiyona sokulur. 30-45 dakika 37° C de reaksiyona bırakılır.

Direkt metoddaki gibi PBS ile yıkanır. Daha sonra materyal konjuge antglobulinin optimal dilusyonları ile reaksiyona sokulur. 30-45 dakika 37° C de nemli ortamda bekletilir. Yıkandıktan sonra muayene edilir.

İlk aşamada spesifik antijen antikör birleşmesi olmuşsa ikinci aşamada antijen-antikör kompleksi konjuge antglobulinle birleşir ve kompleks, floresans verir. Direkt teşhisde belirtildiği üzere, bu test şüpheli kan serumlarından antikör tesbit etmek amacıyla kullanılır.

8- İmmunodiffzyon (Agar-gel presipitasyon)

Direkt teşhisde belirtildiği üzere bu test, şüpheli kan serumlarından antikör tesbit amacıyla kullanılır.

9- Single Radial hemoliz testi (tek yönlü hemoliz test)

Virolojide kullanılan indirekt teşhis metodlarında biriside single radial hemoliz testidir. Şüpheli serumda bilinen virusa karşı antikörlerin mevcut olup olmadığını tesbit etmede kullanılan hassas bir testtir. Testin esası antijene karşı hassaslaştırılmış eritrositin spesifik antikör ve komplementlerle birleşerek agarlı vasatta hemoliz oluşturmalarıdır. Bu test hemagglutinasyon oluşturan viruslarla yapılabilir. Bu reaksiyonun en iyi özelliği çok az miktarda serumun ihtiyaç göstermesi ve serolojik yönden yapılan taramalarda fazla sayıda serumun kısa zamanda kontrol edilebilmesidir. Şüpheli serumda bilinen virusa karşı antikör varsa, serum sensibillize eritrosyt ve komplement birleşerek agarlı vasatta hemoliz meydana gelir.

Şüpheli serumda bilinen virusa karşı antikor yoksa, serum sensibilize eritrocyt ve komplement birleşmez ve agarlı vasatta hemoliz meydana gelmez.

10- Enzim Immuno Assay Sistemleri (EIA) :

Antijen ve antikorların işaretlenme metodları 3 kısma ayrılır.

1- Immuno floresan tekniği (IFA) :

Floresans veren maddelerle yapılan bir metoddur.

2- Radio immuno assay (RIA) :

Radyo izotop maddelerle işaretleme tekniğidir.

3- Enzim immuno assay (EIA)

Antijen-antikor ilişkisini, antikorlara bağlanmış bir enzimin aktivitesini izlemekle araştırma temelini dayanır. Ençok kullanılan şekli ELISA-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay adı ile anılır.

Antijen-antikor bağlantısının enzim-substrat ilişkisinden yararlanarak ortaya çıkarılmasıdır.

Reaksiyonda oluşan rengin kolorimetrik olarak ölçülmesiyle, bağlanmış enzimli antikor, dolayısıyla varsa mevcut antijenin varlığı hakkında bilgi edinilir. Burada aranacak her antijen için ayrı ve enzim ile bağlanmış bir antikorun elde bulunması zorunluluğu vardır. Enzim işaretli immün deneylerde kullanılan başlıca enzimler ve substratlar, peroksidaz, alkalen fosfat ve beta galaktosidaz enzimleri ve bunların substratlarıdır. Aynı şekilde materyaldeki, antikorlarda tesbit edilebilir.

11- Radioimmuno Assay- RIA

Bu deney kolayca radyoaktif hale getirilebilen antijenlerin araştırılması ve miktarlarının ölçülmesi için kullanılan çok duyarlı bir deneydir.

Serumda, viral Hepatit B antijenlerinin ve bazı virus antijenlerinin araştırılmasında önem taşır. Bugün RIA için uygulanan yöntemler arasında en pratik olanı antijen ya da antikorların Elisa'daki gibi polivinil veya polysteren yüzeylere kaplanmaları ile uygulanan yöntemdir. Antikor aramak için elde uygun antijen ile kaplanmış plastik tüp yada plateler bulunmalıdır. Şüpheli serum bu kaplara konur. Eğer serumda uygun antikor varsa o da yüzeye yapışacaktır. Yıkama ile antikorun fazlası atılır. Bu kez radyoizotopla işaretlenmiş bir antiglobulin eklenir. Tekrar yıkama ile fazlası uzaklaştırılır. Test olumlu ise yani belirli antijene uygun antikor bulunuyor ise yüzey radyoaktivite kazanır. Buda dedektör ile saptanır.

Antijen aramak için bu kez uygun antikor kaplı yüzeyler kullanılır. Antijen olduğundan kuşku edilen sıvı bir yüzeye konur. Varsa antijende yüzeydeki antikora yapışacaktır. Yıkama işleminden sonra bu kez radyoizotopla işaretlenmiş bilinen antikor eklenir. O da yüzeye yapıştıktan ve yıkandıktan sonra dedektör ile radyoaktivite ölçülür.

Poliovirus ve çiçek virusunun çözümleri antijenlerinin tayininde kullanılmaktadır.

12- İmmunoelektroforez Metodu :

Bu metotta agaroz eritilir, cam lamalar üzerine dökülür ve donmaya bırakılır. Agaroz üzerinde paralel oyuklar açılır ve bilinen antijen veya bilinmeyen numuneler katoda en yakın oyuklara, antikor ise anoda yakın oyuklara konur. Sonra lam, elektroforez kutusuna yerleştirilip, özel kağıtlarla tamponla

temas ettirilir ve sabit bir akım verilir. Buradaki temel ilke, antijenin menfi elektrik yükü taşıması ve elektroforez aletinde anoda doğru hareket etmesidir. Bunun aksine, antikor katoda gider. Elektrik alanında aksi yönlere doğru hareketi doğuran bu zıt güçler, agaroz içinde antijenle antikorun birbirine doğru hızla yaklaşmasını sağlar. Böylece antijenle antikor yoğunlaşır ve presipitasyon çizgisi çabuk meydana çıkar. Bu deney virus antijenlerinin negatif elektrik yüklü olduğu diğer sistemlerde de uygulanabilir. Ayrıca bu metod kompleman birleşmesi ve radyo immuno assay tekniklere oranla daha basittir. 1-2 saat içinde sonuç alınır ve komplement rekasyonu kadar duyarlı sonuç verir.

13- Immunoelektron Mikroskopi :

Bazı küçük virusların identifikasyonunda, içinde çok az virus bulunan materyallerden elektronmikroskop preparatları yapılmak istendiğinde immunolojik şekillerinden yararlanılmaktadır. Immuno elektron mikroskopi tekniği çok duyarlı ve çabuk sonuç vermektedir. Başlıca iki metod kullanılır.

1- Solid faz immuno elektron mikroskopi

2- İmmunogold labelling.

İki metodda ayrıca ikiye ayrılmaktadır. Direkt ve indirekt olarak.

1- Solid faz immuno elektron mikroskopi :

a- Direkt Metod :

Testin ana prensibi kontrol edilecek virusun, hyperimmun serum ile virusu grid üzerinde karşılaştırarak belirli süre bekletmek ve böylece daha çok virus görülebilmektedir. Çünkü varsa virus homologu antikor ile birleşecektir.

b- İndirekt Metod :

Bir önceki yöntemden farkı virus ile hyperimmun serum karışımına gammaglobulin ilave edilmesidir. Bu şekilde direkt metoda göre 4-32 defa duyarlı hale getirilmiş olur.

2- Immunogold Labelling Metodu :

a- Direkt Metod :

Bu testte kullanılan önemli madde altın ile işaretlenmiş antiviral immünoglobulin G'lerdir. Bir tüpte bir virus ile altın ile işaretlenmiş antiviral immünoglobulin G'si karşılaştırılır. Tüp oda ısısında 60 dakika bekletilir. Grid üzerinde preparat hazırlanır.

b) İndirekt Metod :

Bu metod çok duyarlıdır. Burada serbest halde bulunan antijenlerde immünogold ile bağlanabilme şansına sahiptir.

14- Immuno Peroksidaz :

Testin yapılış ve prensibi immunofluorosana benzerdir. Yalnız sonuçlar normal ışık mikroskopunda da okunabilir. Immuno peroksidad boyamada belirli enzimler bir antikora bağlıdır ve fikse edilmiş dokuda viral antijenin tesbiti için, bir immuno enzimatik sistemde kullanılır.

Deney için çeşitli enzimler kullanılır ise de Horseradish peroxidase yaygın olarak kullanılmaktadır.

Viral antijenin ortaya çıkarılması için direkt immuna peroksidad testi; viral enfeksiyonların çabuk teşhisi için üstün bir methoddur. Enzimle işaretlenmiş antikor kullanarak enfekte hücrelerdeki yani intracellüler viral antijen tesbit

edilmektedir. Basittir, boyama prosedürü güvenilirdir ve sonuçlar kısa sürede elde edilmektedir.

Viral izolatların identifikasyonu için, hücre örnekleri nasofarengial örnekler, doku kesitleri, vesikül gibi klinik örnekler bir mikroskop lamı üzerine asetonla fikse edilir. Örneğe peroksidad ile işaretlenmiş viral antikor ilave edilir. Uygun bir inkübasyondan sonra reaksiyona girmeyen konjugate uzaklaştırılır ve bunlar yıkanır. Sonra bir petri kutusu içinde substrat solusyonundan geçirilir. 10-15 dakika sonra görülebilir bir renk oluşur ve enzimatik reaksiyon durdurulur. Lamalar mikroskopik incelemeye alınır.

Hücre Kültürü ile Testin Yapılışı

İmmun peroksidoz testi, CPE oluşturmayan virusları saptamak amacı için kullanılabilir. Bu amaç için steril mikrotitrasyon plateleri kullanılır. Virus log 10a göre sulandırılıp her sulandırma için 4 göz kullanılır. Her göze 10 µl %5 fetal dana serumlu vasat içinde sulandırılmış virusdan konur. Fetal dana böbrek hücresinden 3×10^5 hücre / ml. olacak konsantrasyonda hücre 50 µl her göze ilave edilir. Kontrol gözlere virus konmaz. Plate'ler 48 saat 37° C %5 CO2 li etüvde inkübe edilir. Sonra hücre kültürü sıvıları, dökülür ve distile su içinde 1/3 sulandırılmış PBS ile yıkanır. Plateler kurutulur ve 30° C de 1 saat ısıtma ile fikse edilir. PBS-Tween 20 ile ıslatılır daha sonra sıvılar dökülür. Ve her göze peroksidad ile işaretlenmiş viral antikor 50 µl ilave edilir. 1 saat sonra konjugate yıkama ile uzaklaştırılır. 50 µl substrate solusyonundan gözlere ilave edilir. Oda derecesinde 15-30 dakika inkübasyondan sonra substrate yıkanır ve 1/3 sulandırılmış PBS konur. Plateler ışık mikroskopunda kontrol edilir. Virus ile enfekte hücreler boyanacaktır, kontrol hücreler boyanmamış olarak kalacaktır.

İndirekt Metod :

Fikse edilen antijen önce serum sulandırması ile reaksiyona konur. Uygun inkübasyondan sonra reaksiyona girmeyen serum uzaklaştırılır. Peroksidad ile işaretlenmiş, türe karşı hazırlanmış gama globulin ilave edilir. Belli süre sonra reaksiyon durdurulur. Her aşamada yıkama işlemleri yapılır. Bu testte bir konjugate kullanarak değişik viral antijenlerin ortaya çıkarılması mümkündür.

15 Nötralizan Peroksidad-Linked Antibody Assay (NPLA)

Mikroplatelerde şüpheli serumun Log 2 tabanına göre sulandırmaları hazırlanır. Üzerine 100 DKID oranında sulandırılmış virus ilave edilir 1 saat 37° C inkube edilir. Sonra gözlere hücre süspansiyonu konulup 37° C 48 saat inkube edilir. Daha sonra mikroplateler boşaltılır. PBS Tween 20 ile 3 kez yıkanır. 80° C 1 saat fikse edilir. Peroksidad ile işaretli konjugate ilave edilir. 37° C de 1 saat inkube edilir. Konjugate dökülür yıkama işleminin ardından sonra substrate ilave edilir. Bir süre sonra reaksiyon su ile durdurulur ve sonuç doku kültürü mikroskopunda okunur. Başlangıçta şüpheli serum ile bilinen virus arasında nötralizasyon oldu ise sonradan ilave edilen konjugate ile birleşme olmayacak ve renkli ürünler meydana gelmeyecektir ve olay (+) kabul edilecektir.

Gelişen teknolojiye bağlı olarak yeni teşhis metodları uygulamaya konmaktadır.

LİTERATÜR BİLGİSİ

- 1- AKMAN, M., GÜLMEZOĞLU, E. : Tıbbi Mikrobiyoloji Veteriner Fakültesi Yayınları 107, (1976).
- 2- BERKOĞLU, A. : Flouresans Antikor Tekniği ve Anaerobik. Bakteriyojideki önemi. Pendik Vet. Mikr. Enst. Derg. (1984).
- 3- BİLGEHAN, H. : Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi (1984).
- 4- BUXTON, A., FRASER, G.: Animal Microbiology Volume 2 (1977).
- 5- CROWLE, A.J.: Immunodiffusion Second Edition (1973).
- 6- GARDNER, P.S., MV QUILLIN J. : Rapid Virus Diagnosis Application (1980).
- 7- GILLESPIE, J.H., TIMONEY, J.F. : Hagon and Bruner's Infectious Diseases of Domestic Animals Seventh Edition (1981).
- 8- GÜRTÜRK, S. : Genel Viroloji. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, 329, (1976).
- 9- KÖLBL, S., SCHULLER, W. : Die Indirekte Immuno Fluoreszens-Eine Methode Zum Nachweis von Antikor pen gegen virale Erkrankungen beil Hund. Deutsche Tierarsztliche Wochen Sevhrift 95 (1988).
- 10- LENNETTE, H., SCHMIDT, N.J.: Diagnostic Procedures for viral, rickettsial and Chlamydial Infections. Fifth Edition (1979).
- 11- ONNO, M., MACED, F., KAISER, C., GOUREUA, M., JESTIN, A.: Rerevalence in epidemiology of infeotions disease of a rapid immunofluorescence, technique for diagnosis, preliminary works about acute viral, respiratory problems in fattening pigs. Acta Veterinaria Scdinaviva Suppl. 84 (1988).
- 12- PAUL, J.: Cell and Tissue Cullute. Fifth Edition. (1975).
- 13- SCOTT G.R., TAYLOR W.P., ROSSITER P.B.: Manual on the diagnosis of rinderpest (1986).
- 14- JEGGO, M.H. WRİGHT, P.F., : Rinderpest Competitive Elisa (1991) .
- 15- GIBBS, E.P.J., SMALE, C.J., VOYLE, C.A. : Electron microscopy as an ait to the rapid diagnosis of virus diseases of Veterinary importance, The Veterinary Record (1980).