

## HETEROLOG KUDUZ ANTİSERUM ÜRETİM ÇALIŞMASI

### *Production of heterolog Anti-rabies immune sera*

Özcan ÖZKAN\* Orhan AYLAN\*\* Cahit ATEŞ\* Bekir ÇELEBİ\*

#### ÖZET

*Kuduz tüm dünyada yaygın bir enfeksiyon olup özellikle geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde önemli mortalite nedenidir. Türkiye genelinde her yıl ortalama 82.000 şüpheli hayvan ısırığıyla karşılaşıldığı, yıllara göre üç ya da beş kişinin kuduzdan öldüğü bildirilmiştir. Şüpheli hayvan ısırıklarında özellikle yüz bölgesi ile geniş doku kaybının bulunduğu yaralanmalarda ve gecikmiş vakalarda kuduz antiserumu uygulanmaktadır. Kuduzun yaygın olduğu ülkelerde fix virüs içeren tavşan beyni süspansiyonuyla aşılardan kuduz antiserumu üretilmektedir. Bu çalışmada, PVC kuduz aşısı kullanarak kuduz antiserum üretiminin araştırılması amaçlandı.*

*300 - 400 kg. ağırlığında iki adet yerli ırk at kullanıldı. Atlar, inaktif Pürifiye Vero Cell (PVC) kuduz aşısı ile immunize edildi. Her immunizasyon sonrası atlardan alınan serumlardan antikor miktarları RFFIT ile saptandı. İmmunizasyonun 14. haftasından sonra atlardan kan alındı. Son üründe antikor miktarı 320 I.U/ml bulundu.*

*Sonuç olarak; fix virüs ile enfekte tavşan beyni süspansiyonu yerine pürifiye inaktif aşı ve / veya hücre kültürü süspansiyonlarının kuduz antiserum üretiminde kullanılabileceği görüldü.*

**Anahtar kelimeler:** Kuduz, PVC kuduz aşısı, heterolog antiserum

#### SUMMARY

*Rabies continues to occur in almost every parts of the world, especially in developing and underdeveloped countries, where it is an important cause of mortality. In Turkey, each year on average of 82.000 suspected cases of animal bites and 3 to 5 human rabies deaths are reported. Rabies anti-serum has been used in some suspected cases of animal bites, particularly for bites in the face, bites that result in large tissue cases and in case where appropriate treatment is delayed.*

*In countries where rabies is widespread, rabies anti-serum is produced injecting horses by fixed virus suspension obtained from rabbit brain. In this study, it was aimed to produce rabies anti-serum using purified vero-cell rabies vaccine.*

---

**Kabul Tarihi:** 23.12.2004

\* Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, Sıhhiye-ANKARA

\*\* Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Etlik-ANKARA

*Two indigenous horses weighing between 300 and 400 kg were used. In the study horses were immunized by an inactivated PVC rabies vaccine. Blood was collected 14 weeks after immunization. The levels of antibody in sera obtained from horses following each immunization were determined by RFFIT. The amount of antibody in the final product was found as to be 320 IU/ml*

*In conclusion, an inactivated and purified vaccine could be used in production of rabies antiserum, instead of using brain suspension of rabbit infected with fixed virus.*

*Key words: Rabies, PVC Rabies vaccine, heterolog immunsera*

## **GİRİŞ**

Kuduz, bütün sıcak kanlı hayvanlarda ve insanlarda, enzootik ve hatta epizootik olarak ortaya çıkan, akut seyirli, öldürücü ensefalomyelitik karakterde viral bir hastalıktır (7). Kuduz virüsü, Rhabdovirüsler grubunda yer alır (12). Orjinine ve patojenitesine göre sokak virüsü, fix virüs ve yarasa virüsü olarak adlandırılır (7).

İngiltere ve İskandinavya dışında dünyanın hemen tüm bölgelerinde endemik olarak kabul edilmektedir. Özellikle geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir mortalite nedenidir (6). Tüm sıcakkanlı hayvanlar kuduz ile enfekte olabilirler. Tilki, çakal, kurt en fazla duyarlı olan hayvanlardır. Primer olarak bir hayvan hastalığı olan kuduz, değişik yollarla insanlara geçebilmektedir. Klinik belirtiler başladıktan sonra tedavi şansı yoktur. Bu nedenle tedavi, enfeksiyöz virüsün sinir sistemine girmeden ortadan kaldırılması ve nötralize edilmesine yöneliktir (12).

Kuduzdan insan ölümleri aşılama ile etkili şekilde önlenebilir (16). Ancak temas sonrası yapılacak uygulamalar, kuduz hayvanla temas tipine bağlıdır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından tanımlanan temas tipleri; I. Kategori; hayvanları beslemek veya dokunmak, derinin yalanması, II. Kategori; deri ya-

pısını bozan ısırık, küçük çizik veya kanamasız sıyrık ve deri bütünlüğü bozulmuş yaraların yalanması, III. Kategori; tek ya da çok defa deriyi geçen ısırıklar, çizikler, mukoz membranın yalanması ile tükürükle kontamine olunması. I. Kategori için hiçbir uygulamanın gerekmediği, II. Kategori için hemen aşılama, III. Kategori için hemen aşılama ve kuduz antiserumu DSÖ tarafından önerilmiştir (9,16). Temas sonrası aşı ve antiserumun birlikte kullanımının etkili olduğu gözlenmiş ve antiserum uygulaması önerilmiştir (16).

Bu çalışmada, kuduz şüpheli temas olguları sonrasında kullanılacak hiperimmun serum elde edilmesi amacıyla rutin kullanılan fiks virüsle enfekte tavşan beynine alternatif olarak Pürifiye Vero Cell (PVC) kuduz aşısının kullanım olasılıklarının araştırılması amaçlandı.

## **GEREÇ VE YÖNTEM**

### **Hayvanlar**

Antiserum üretiminde, 300 - 400 kg. ağırlığında yaklaşık 10 yaşında sağlıklı iki adet yerli ırk at kullanıldı. Atlar immunizasyon süresince, arpa ve kuru çayır otu ile ad libitum olarak beslendi.



### **Atların İmmünizasyon Planı**

İmmünizasyonunda antijen olarak inaktif PVC kuduz aşısı ve adjuvant olarak da Freund's Complete Adjuvant (FCA) ile Freund's Incomplete Adjuvantı (FIA) kullanıldı.

İnokulasyon işlemi, Luekrajang (1996) tarafından tanımlanan yöntemle göre enjeksiyonlar, atların boyun kısımlarına deri altı yolla (11) olacak şekilde tablo 1'deki immünizasyon planı izlenerek gerçekleştirildi. İmmünizasyonun 108 – 111 – 114 günlerinde atlardan aseptik şartlarda % 10 sodyum sitrat içeren cam silindirlere kan alındı.

Tablo1. Atlara uygulanan immünizasyon planı

Günler (Hafta)	Antijen (ml)	Adjuvant
0.	0.5	FCA
3.	1.0	FIA
4.	1.0	-
5.	1.0	-
6.	1.0	-
9.	2.0	-
10.	2.0	-
11.	2.0	-
12.	2.0	-
13.	2.0	-
14.	2.0	-

### **Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT)**

Virüs nötralizasyon testi, kuduz antikorlarının saptanmasında en yaygın kullanılan testtir. Testlerin yürütülmesinde büyük farklılıklar olmamasına rağmen, tüm testlerde, ısı ile inaktive edilmiş, farklı dilusyonlardaki serumlar belirli miktardaki virüs ile 90 dakika süreyle 37 °C' de inkube edilmektedir. Rezidüel vi-

rüs enfektivitesi, daha sonra laboratuvar hayvanlarına inokule etmek veya hücre kültürü kullanmak suretiyle ortaya çıkarılmaktadır (15).

Farelerde virüs nötralizasyon testi, 1935 yılında geliştirilmiştir. Yaygın bir şekilde kullanılmış, standart bir test olarak belirlenmiş ve sonrasında diğer yeni testler de aynı şekilde değerlendirilmiştir. Hücre kültüründe kuduz virüsü nötralizan antikorlarını tespit etmek için birçok serolojik test geliştirilmiştir. Bunlar içinde Plak Test, Floresan Antikor Test ve Enzyme Immune Assay bulunmaktadır (15).

Bu çalışmada da immünizasyonun 21. gününden itibaren her enjeksiyon sonrası atlardan kan alındı. İmmünizasyon süresince kan serumlarında ve son üründeki antikor miktarı Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) ile uluslararası ünite (IU) olarak belirlendi.

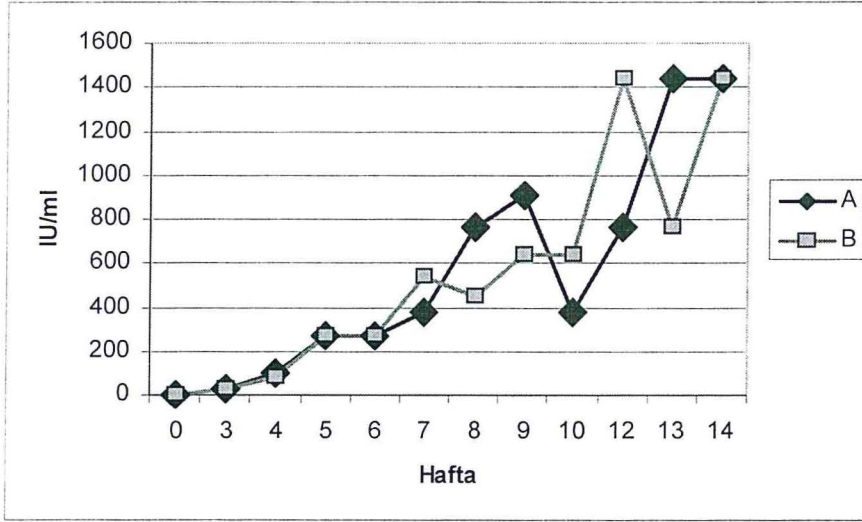
## **BULGULAR**

### **Atların sağlığı**

İmmünizasyon süresince atların boyun bölgesinde adjuvanta bağlı aseptik apse gelişti. Veteriner hekim kontrolünde, hayvanların her enjeksiyon öncesi genel muayeneleri ve lokal pansuman yapıldı.

### **İmmünizasyon sürecinde antikor değerlerinin belirlenmesi**

İmmünizasyon sürecinde iki attan elde edilen antikor miktarları şekil 1'de verilmiştir. Son üründen RFFIT, ile 320 IU/ml olarak tespit edildi.



Şekil 1. İmmünizasyon sürecinde atlardaki (A –B) antikor miktar artış profili

### TARTIŞMA ve SONUÇ

Kuduz tüm dünyada yaygın bir enfeksiyon olup özellikle geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde önemli mortalite nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (4).

Ülkemiz, hayvan kuduzunda % 98.5' le ilk sırayı köpek ve kedi gibi evcil hayvanlar olup ve halen köpek kuduzunun görüldüğü tek Avrupa ülkesidir (3).Türkiye genelinde her yıl ortalama 82 000 şüpheli hayvan ısırığıyla karşılaşıldığı, bunların % 95'ine aşı uygulandığı ve her yıl üç – beş kişinin kuduzdan öldüğü bildirilmiştir (12,14).

Şüpheli hayvan ısırıklarında özellikle yüz bölgesi ile geniş doku kaybının bulunduğu yaralanmalarda ve gecikmiş vakalarda kuduz antiserumu uygulanmaktadır (5,8). Ankara'da kuduz aşı istasyonunda yapılan çalışmada, 1530 ısırık vakasının % 99.5'ine (1524) aşı, 33 (%2.15) hastaya da kuduz antiserumu uygulandığı bildirilmiştir (14). Uygulanan antiserumun doz sayısının artmasıyla birlikte serum hastalığı ve alerjik reaksiyonlar gibi ters etkilerin meydana gelebileceği bilinmektedir

(4). Ancak, uluslar arası piyasada mevcut hücre kültürü aşlarıyla, yaralanmalardan hemen sonra gerektiğinde kuduz antiserumu ile birlikte dengeli kullanıldığında kuduzdan ölümü, % 100 koruduğu kabul edilmektedir (10).

Kuduzun yaygın olduğu ülkelerde fix virüs içeren tavşan beyni süspansiyonuyla aşılardan kuduz antiserumu üretilmektedir. Ancak hazırlanan antiserumda merkezi sinir sistemi komponentlerine karşı antikorların oluşabileceği ve elde edilen antiserumun, uygulanan hastalarda öldürücü güçlü nöroparalitik alerjik reaksiyonlarla sonuçlanabileceği de bildirilmiştir (4).

Ülkemizde de uzun yıllar fix virüs ile enfekte tavşan beyni süspansiyonuyla aşılardan elde edilen kuduz antiserumu kullanılmıştır (2,13). Consales ve ark. (1988) Pasteur virüs suşunu, bebek hamster böbrek hücresinde (BHK-21C13) kültürle çoğaltarak antiserum üretiminde kullanmıştır (4). Luekrajang ve ark. (1996) PVC kuduz aşısını kullanarak atlardan antiserum elde etmiştir (11). Bu çalışmada da, PVC kuduz aşısı ile aşı-



lanan atlarda aşılamayla birlikte, 3. haftadan itibaren antikor titreleri belirgin şekilde yükselmiştir. Kuduz antiserum üretiminde kullanılan fix virüsle enfekte tavşan beyni süspansiyonu yerine, hücre kültüründe üretilen kuduz virüs suş ve aşıları kullanılarak antiserumun üretilebileceği bu çalışma ile de desteklenmiştir.

Consales ve ark.(1988) BHK-21C13 kültür süspansiyonu ve tavşan beyni süspansiyonu ile elde ettiği kuduz antiserumda antikor miktarlarının karşılaştırmasında hücre kültürü ile elde edilen antiserumun antikor miktarının daha yüksek olduğunu göstermiştir (4).

RSHMB' da üç gün aralıklarla 28 defa aşılama sonrası 1/4, 1/2, 1/1 fix virüs ile enfekte tavşan beyni süspansiyonu ile 154 gün sonunda immunize edilen atlardan kuduz antiserum elde edilmiştir (1,13). Bu yöntemle üretilen bir seri kuduz antiserumun antikor miktarı, hücre kültürü teknikleri içerisinde en yaygın olarak kullanılan; virüsle enfekte alanların, floresan antikor boyama ile foci vermesi esasına dayanan RFFIT'la (15) 160 IU/ml olmasına rağmen, PVC suşu ile immunize edilen atlardan aynı yöntemle bu çalışmamızda 320 IU/ml değere sahip kuduz antiserum elde edilmiştir.

Sonuç olarak; hücre kültür süspansiyonu ve/veya aşılama kuduz antiserum üretiminde antijen olarak kullanılabilmesi, immunizasyon planının daha kısa sürdüğü ve son ürünün antikor miktarının daha büyük olduğu saptanmıştır.

Ülkemizde de geçmişte kullanılan fix virüs ile enfekte tavşan beyni süspansiyonu yerine pürifiye inaktif aşı ve / veya hücre kültürü süspansiyonların kuduz antiserum üretiminde kullanılabilmesi görülmüştür.

## KAYNAKLAR

1. **ARI A (1972).** *Kuduz monografi.* Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı, Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Ens. Yayınları No:32,
2. **AŞI VE SERUM UYGULAMA REHBERİ (1974).** *Serumlar.* Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı, Sağlık İşleri Genel Müdürlüğü. Bölüm VI-VII No:426, Sayfa: 68-86.
3. **AYLAN O, YÖRÜK İ, ÜN H (1998).** *Rabies in Turkey, 1987-1996;* Etlik Vet Mik Derg, 9:3-8.
4. **CONSALES CA, VALENTINI EJG, ALBAS A, MENDONCA RMZ, FUCHES RMM, SOARES MA & PEREIRA CA (1988).** *The preparation of cultured rabies virus and the production of antiserum for human use.* Journal of Biological Standardization, 16:27-32.
5. **FORNIER P, SIKES RK (1996).** Production of human rabies immunoglobulin. Meslin F.X, Kaplan M. M, Koprowski H (Eds). In: Laboratory Techniques in Rabies, Part VI: Antirabies serum and immunoglobulin, WHO, Genova, 411.
6. **HAZNEDAROĞLU T (1996).** Kuduz, In: Topçu Wilke A, Söyletir G, Doğanay M (Eds). İnfeksiyon hastalıkları. 1. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitapevi, 885-901
7. **İMREN HY, ŞAHAL M (1991).** Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Ders Kitabı, Merkezi Sinir Sistemi Hastalıkları, Kuduz. Ankara
8. **KUDUZ KORUMA VE TAKİP YÖNERGESİ (2001).** Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü.
9. **LANG J, SIMANJUNTAK GH, SOERJOSEBODO S, KOESHARYONO C (1998).** *Suppressat effect of human or equine rabies immunoglobulins on the immunogenicity of post-exposure rabies vaccination under the 2-1-1 regimen:*

*Heterolog Kuduz Antiserum Üretim Çalışması - ÖZKAN, AYLAN, ATEŞ, ÇELEBİ*

- a field trial in Indonesia.* Bulletin of the World Health Organization, , 75 (5), 491-495.
10. LANG J, ATTANATH P, QUIAMBAO B, ET AL (1998). *Evaluation of the safety, immunogenicity, and pharmacokinetic profile of a new, highly purified, heat-treated equine rabies immunoglobulin, administered either alone or in association with a purified, Vero-cell rabies vaccine.* Acta Tropica, 70, 317-33.
11. LUEKRAJANG T, WANGSAI J, PHANUPHAK P (1996). Production of equine rabies immunoglobulin, Meslin F.X, Kaplan M. M, Koprowski H (Eds). In: Laboratory Techniques in Rabies, Part VI: Antirabies serum and immunoglobulin, WHO. Genova, 399-403.
12. ÖZSOY M, YAKIŞTIRAN S, ÖZKAN E (2002). *2000 yılında Kuduz aşısı merkezine başvuran hastaların değerlendirilmesi.* Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, Cilt 59, Sayı 1,2,3, Sayfa 1-6.
13. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Merkez Hıfızssıhha Ens. Kuduz antiserum üretim protokolü.
14. SAĞLIK BAKANLIĞI TEMEL SAĞLIK HİZMETLERİ GENEL MÜDÜRLÜĞÜ ÇALIŞMA YILLIĞI (2001). 1996-1999, 108-9.
15. SMITH JS, YAGER PA, BAER GMA (1996). Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) Melsin F.X, Kaplan M.M, Koprowski H (Eds). In: Laboratory Techniques in Rabies, Part II: Routine laboratory procedures, Chapter 15. WHO. Genova, 181-193.
16. WHO (2002). *Rabies vaccines.* Weekly Epidemiological Record, No.14, 5 April, 77, 109-120.