

Kuduz teşhisi için ulusal laboratuvarlar arası ring test (floresan antikor tekniği) - 2009

Hikmet ÜN, Selim TUNCER, Nil ÜNAL, Orhan AYLAN

Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Kuduz Teşhis Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 26.04.2010, Kabul Tarihi / Accepted: 16.06.2010

Özet: Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Kuduz Teşhis Laboratuvarı, kuduz hastalığı açısından ulusal referans laboratuvarıdır. Ulusal kuduz referans laboratuvarı tarafından her yıl düzenli olarak laboratuvarlar arası ring test düzenlenmektedir. Laboratuvarlar arası kuduz ring test örnekleri 2009 yılı içinde hazırlanmış, teşhis merkezlerine gönderilmiş ve detaylar/sonuçlar/değerlendirmeler burada açıklanmıştır. Kuduz teşhis kapasitesinin ortaya konulması açısından 2009 yılı Laboratuvarlar Arası Ulusal FAT Ring Test Programı başarılı olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Kuduz, teşhis, ring test.

National inter laboratory ring test (direct fluorescent antibody test) for rabies diagnosis - 2009

Summary: Etlik Central Veterinary Control and Research Institute, Rabies Diagnosis Laboratory is the national reference laboratory for rabies. Inter laboratory ring tests are organized regularly every year by national rabies reference laboratory. Inter laboratory ring test for rabies in 2009 samples were prepared, were submitted to diagnostic centers and details/results/evaluations are described here. To reveal the diagnostic capacity of National FAT Ring Inter Laboratory Test Program in year 2009 was considered successful.

Key words: Diagnosis, rabies, ring trial.

Giriş

Ülkemizde kuduz hastalığının teşhisinden Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na bağlı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü (KKGM) sorumludur. Ülke genelinde faaliyet gösteren 8 adet Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, kuduz teşhis laboratuvarında, kuduz hastalığının teşhisi Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Dünya Hayvan Sağlığı Organizasyonu (OIE) ve Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın direktiflerine göre yapılmaktadır.

Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü (EMVKAЕ), Kuduz Teşhis Laboratuvarı, kuduz hastalığı açısından ulusal referans laboratuvarıdır. Kuduz teşhis çalışmaları KKGM tarafından koordine edilmekte ve ulusal referans laboratuvarı her yıl düzenli olarak laboratuvarlar arası ring test düzenlenmektedir. Laboratuvarlar arası kuduz ring test (Kuduz FAT) örnekleri 2009 yılı içinde hazırlanmış, teşhis merkezlerine gönderilmiş ve detaylar/sonuçlar/değerlendirmeler burada açıklanmıştır.

Önceki yıllardan farklı olarak bu yıl her laboratuvara birer adet numara verilmiştir (LAB01-LAB08 arasında). Burada amaç, değerlendirme

açısından bir önyargı oluşmasını engellemek ve eşit değerlendirmektir.

Materyal ve Metot

Test örnekleri: Test paneli 10 adet numaralandırılmış tüpten oluşmuştur.

Negatif materyal: Negatif materyal olarak 2009 yılı içerisinde Ankara ilinden EMVKAЕ'ye kuduz şüphesi ile gönderilen ve hem direkt Floresan Antikor Tekniği (FAT) hem de deneme hayvanı inokulasyonu ile kuduz negatif tespit edilen koyun (*Ovis aries*) izolatu seçilmiştir. Bu beyin dokusu homojenize edilmek sureti ile her teşhis merkezi için üçer adet farklı numaralı tüplere dağıtılmış ve bu tüpler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Aynı zamanda bu beyin dokusu pozitif materyalin dilüsyonu amacı ile de kullanılmıştır.

Pozitif materyal: Pozitif materyal olarak 2009 yılı içerisinde Zonguldak ili, Çaycuma ilçesinden EMVKAЕ'ye kuduz şüphesi ile gönderilen ve FAT ile kuduz pozitif tespit edilen çakal (*Canis aureus*) izolatu kullanılmıştır. Pozitif materyal homojenize

edilerek, negatif koyun beyin homojenatı içerisinde log₂ tabanlı dilue edilmiştir (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 ve 1/128). Dolayısı ile materyallerin kuvvetli pozitiften zayıf pozitif ve negatife doğru sıralanması amaçlanmıştır.

Kullanılan test yöntemi: Teşhis merkezlerinden, ulusal ring test için gönderilen test panellerini, WHO'nun önerdiği metotlardan olan ve sürekli olarak her yıl hizmet içi eğitim çalışması düzenlenen FAT (1) ile test etmeleri istenilmiştir.

FAT test Prosedürü: Şüpheli hayvana ait beynin *cornu ammoni*'sinden alınan ince bir parça doku kurutma kağıdı üzerine konularak, işaretlendirilmiş temiz bir lamın sağ ve sol tarafına çok ince iki tuşe preparat yapılır.

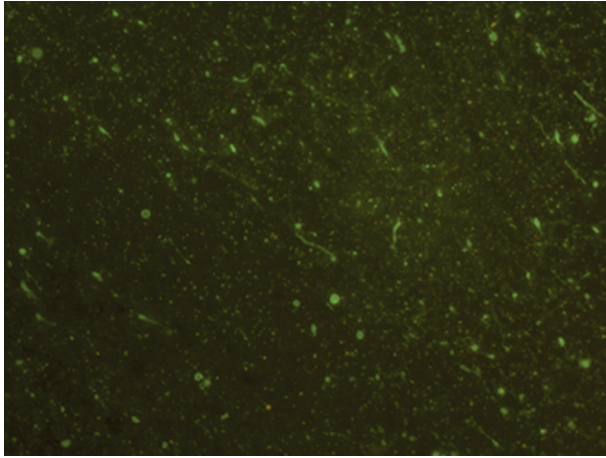
Oda ısısında kurutulan preparat -20°C'de bu-lundurulan ağzı kapaklı lam kabı (Coplin jar) içindeki asetona konulur. Preparat asetonda 4 saat tutulur. Asetondan çıkarılan preparat kuruması için oda ısısında 5-10 dakika bırakılır. Pozitif ve negatif kontrol preparatları da aynı şekilde hazırlanır. Kon-

jugat distile su ile üreticinin tavsiyesine göre stok dilüsyon ve çalışma dilüsyonu olarak dilue edilir ve testte kullanılır. Hazırlanan preparatların üzerlerine konjugatın çalışma dilüsyonundan birer damla damlatılır. Preparatlar alt tarafına ıslak kurutma kağıdı konularak rutubetlendirilmiş petri kutularında "U" şeklindeki baget üzerine yerleştirilir. Petrinin kapağı kapatılarak 37°C'lik etüvde 30 dakika bırakılır.

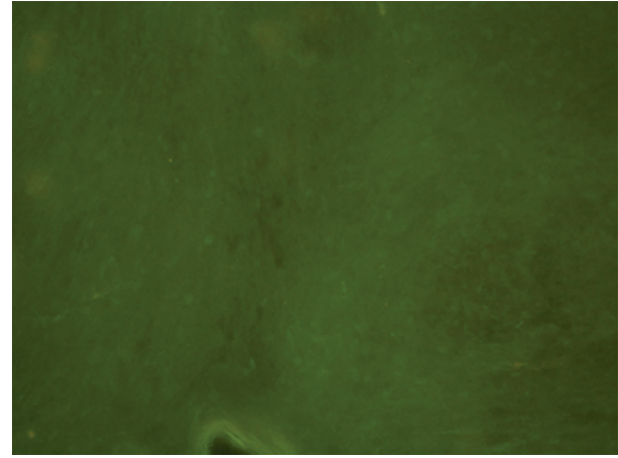
Petri kutusu etüvden çıkarılır. Preparat petri kutusunun kapağına konulur üzerine yavaşça pH 7.4 olan PBS (Phosphate Buffered Saline)'den konulur ve hemen boşaltılır. Tekrar üzerine PBS konulur ve 10 dakika bekletilir. Süre sonunda preparat bir defa distile su ile yıkanır. Meyilli bir yere konarak suyunun süzülmesi beklenir.

Preparatın sağ ve sol tarafındaki doku kısımlarına 1 damla gliserin/PBS (%90 gliserin + %10 PBS pH 7) damlatılır ve temiz birer lamelle üzerleri kapatılır. Preparatlar floresan mikroskopta incelenir. Pozitif ve negatif kontrol preparatlara göre sonuç değerlendirilir (Şekil 1).

Kuduz pozitif



Kuduz negatif



Şekil 1. FAT test prosedürüne göre hazırlanmış kuduz müspet ve menfi birer preparatın floresan mikroskop altındaki görünümü.

Test panellerinin saklanması ve nakliyesi: Prosedür olarak Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Kuduz Teşhis Laboratuvarında teşhis aşamasından sonra saklanması düşünülen beyin dokuları, -80°C'de muhafaza edilmektedir. Bu çalışmada da kullanılan beyin dokuları test panelleri, hazırlanmaya ve hazırlandıktan sonra gönderilmeye kadar -80°C'de muhafaza edilmişlerdir. Nakliye için strafor kutular seçilmiş ve -80°C'den çıkarılan paneller buz aküleri ile desteklenerek sızdır-

maz paketlenme yapılmak sureti ile kargo ile teşhis merkezlerine gönderilmiştir. Test panellerine kod numarası verilerek, laboratuvarlara gönderilmesinde esas alınan numaralandırma sistemi Tablo 1'de gösterilmiştir.

Kontrol testleri: Hazırlanan 10 tüpten oluşan test paneli (üç adet negatif ve yedi adet pozitif beyin dokusu dilüsyonu) teşhis merkezlerine gönderilmeden önce FAT testi (1) ile EMVKA, Kuduz Teşhis Laboratuvarında kontrol edilmiştir. FAT ile negatif

kontroller (3 adet) kuduz negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif beyin dokusunun log₂ tabanlı dilüsyonu ile hazırlanan 7 adet dilüe materyalden 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 dilüsyonlarına karşılık gelen tüpler FAT ile kuduz pozitif değerlendirilmiş olup

1/32, 1/64 ve 1/128 dilüsyonlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu şekilde FAT açısından kayıt altına alınan test panelleri 8 teşhis merkezine gönderilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi açısından bu kayıtlar esas alınmıştır (Tablo 2).

Tablo 1. Laboratuvarlar arası ulusal FAT ring test materyal gönderim şeması - 2009.

Laboratuvar Kodu	Tüp numarası									
	01/09	02/09	03/09	04/09	05/09	06/09	07/09	08/09	09/09	10/09
LAB01	nk	1:4	1:16	1:32	nk	1:64	1:128	nk	1:8	1:2
LAB02	1:2	nk	1:4	1:32	1:128	nk	1:64	1:16	nk	1:8
LAB03	1:32	1:2	nk	1:4	1:64	1:16	nk	1:128	1:8	nk
LAB04	nk	1:32	1:2	nk	1:4	1:128	1:8	nk	1:16	1:64
LAB05	1:32	1:64	1:8	1:2	nk	nk	nk	1:4	1:16	1:128
LAB06	1:16	1:128	nk	1:8	1:2	1:4	1:64	nk	nk	1:32
LAB07	1:16	nk	1:32	nk	1:8	nk	1:2	1:4	1:64	1:128
LAB08	nk	nk	nk	1:16	1:64	1:2	1:4	1:128	1:32	1:8

Tablo 2. EMVKA E'de FAT ile yapılan kontrol testi sonuçları.

Kullanılan Test	Pozitif beyin dokusunun log ₂ tabanlı dilüsyonu						Negatif beyin dokusu			
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	nk	nk	nk
FAT	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Programa katılan teşhis merkezleri: Programa Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Erzurum Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma

Enstitüsü, Samsun Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü katılmıştır.

Bulgular

Tablo 3'de test panellerine ilişkin olarak teşhis merkezlerinden bildirilen sonuçlar ve Tablo 4'te 2008, 2009 yılı sonuçlarının karşılaştırması verilmiştir.

Tablo 3. 2009 yılı laboratuvarlar arası ulusal FAT ring test sonuçları

Laboratuvar Kodu	Pozitif beyin dokusunun log2 tabanlı dilüsyonu ve negatif beyin dokusu.									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	nk	nk	nk
LAB01	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
LAB02	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
LAB03	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
LAB04	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
LAB05	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
LAB06	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
LAB07	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
LAB08	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Tablo 4. Laboratuvarlar arası ulusal FAT ring test 2008 ve 2009 sonuçlarının karşılaştırması.

	FAT 2008	FAT 2009
Laboratuvar sayısı	8	8
Negatif kontroller sonucu	%100 (64/64)	%100 (24/24)
Pozitif kontroller sonucu	%100 (16/16)	%81.25 (26/32)
Ulusal referans laboratuvar FAT sonucuna göre FAT ile negatif olması beklenenler (Tablo 2'ye göre)	-	%83.33 (20/24)

Tartışma ve Sonuç

Test panellerinin bu şekilde hazırlanması ile teşhis açısından hassas bir değerlendirme yapılabilmesi amaçlanmıştır. Hastalığın, Türkiye açısından önemli olması ve son yıllarda bölgeler bazında artma/yayılmaya eğilimi göstermesi nedeni ile teşhis merkezlerinin FAT'nin kullanımı açısından sürekli ve her an teşhise hazır halde bulunmasına, bu ring testin katkı sağlayacağı kanaatine varılmıştır.

Önceki yıllarda hazırlanan ring test panellerinde hazırlanan pozitif ve negatif örneklerde beyin dokuları direkt olarak kullanılmıştır. Hazırlanan test panelinde ise negatif materyal yine önceki yıllarda olduğu gibi dilüe edilmeden homojenize edilerek hazırlanan beyin dokusundan oluşturulmuştur. Pozitif materyal ise öncelikle homojenize edilip ve yine homojenize edilen negatif beyin dokusu içerisinde log2 tabanlı seri dilüsyonu yapılmıştır. Burada Dr.

Thomas Müller (National and OIE Reference Laboratory for Rabies, WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance and Research, Institute for Epidemiology, Friedrich-Loeffler-Institute, Seestr. 55, 16868, Wusterhausen, Germany) tarafından Almanya için hazırlanan 2002 ve 2006 Alman Ulusal Ring Test Programı esas alınmıştır (2, 3). Burada amaç, materyallerin kuvvetli pozitiften zayıf pozitif ve negatife doğru sıralanması ile test merkezlerinin elde edeceği sonuçlar açısından yüksek oranda sensitivite ve spesifite yakalanmasıdır. Tablo 2'de bildirilen sonuçlar sensitivite ve spesifite hesaplanmasında esas alınmıştır. Sensitivite %81.25 ([laboratuvarlar tarafından bildirilen doğru pozitif örnek sayısı/toplam pozitif örnek sayısı (doğru pozitif+yanlış negatif)]×100) ve spesifite %86.25 ([laboratuvarlar tarafından bildirilen doğru negatif örnek sayısı/toplam pozitif sayısı (doğru negatif+yanlış pozitif)]×100) olarak hesaplanmıştır (4).

Tablo 2’de belirtilen kontrol testi sonuçları ile teşhis merkezlerinin sonuçları kıyaslandığında, tüm merkezlerin negatif kontrol örneklerini %100 doğrulukla tespit ettikleri görülmüştür (Tablo 3 ve 4). Bu örnekler açısından yanlış pozitif sonuç tespit edilmemiş olması fevkalade başarılıdır. Karşılaştırmak açısından bakılırsa, 2008 ve 2009 yılı sonuçları negatif kontroller açısından aynı olmakla birlikte pozitif kontrollerde küçük bir düşme gözlenmiştir (Tablo 4).

Pozitif beyin dokusunun log₂ tabanlı dilüsyonu ile hazırlanan örnekleri; dört merkezin (LAB01, LAB02, LAB06 ve LAB08) FAT sonucunun, Tablo 2’de belirtilen sonuçlara göre tam uyumlu olduğu görülmüştür. LAB03 1/2, 1/4 ve 1/32 dilüsyonlarında, LAB04 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/64 dilüsyonlarında, LAB05 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 ve 1/128 dilüsyonlarında, LAB07 1/2 ve 1/8 pozitiflik tespit etmiş oldukları saptanmıştır.

Yanlış negatif sonuç 1/2 ve 1/4 dilüsyon basamaklarında LAB05 ve LAB07 tarafından tespit edilmiştir. Sensitivite ve spesifite açısından düşünüldüğünde olmaması gereken bu durum referans laboratuvarında hazırlık aşamasında, insan kaynaklı teknik bir hata yapılmış olunabileceği şeklinde değerlendirilmiştir. Yine 1/32, 1/64 ve 1/128 dilüsyonlarında tespit edilen pozitiflikler konusunda referans laboratuvar tarafından bunlarla ilgili başka bir test yapmadığı için yorum yapmakta zorluk çekilmiştir. Kargo ile gönderimi takiben referans laboratuvar tarafından materyallerin saklama koşulları ile ilgili bir uyarı yapılmamış olması dolayısıyla bu materyallerin teşhis merkezleri tarafından alınmalarını takiben +4°C’de muhafaza edilme olasılığını ortaya çıkarmıştır. Bu tür bir muhafaza ortamının sağlanmış olması, zaten dilüe edilmiş olan pozitif materyalden FAT ile teşhis zafiyetine yol açmıştır. Sonraki uygulamamızda bu hususun dikkate alınması gerekliliği ortaya konulmuştur.

Ayrıca test panelleri ile birlikte tüm teşhis merkezlerine bir sorgulama formu gönderilmiştir. Sorgulama formları teşhis laboratuvarlarınca doldurularak referans laboratuvara iletilmiştir. Formlar

incelendiğinde, kuduz hastalığının teşhisi açısından teşhis laboratuvarlarında bir eksikliğin olmadığı görülmüştür. İlk olarak 1999 yılında yapılan ve her yıl tekrarlanan “Kuduz Hastalığının Teşhisinde Metot Birliğinin Sağlanması” konulu hizmet içi eğitim programı ile tüm teşhis merkezlerinin hemen hemen aynı FAT test protokollerini uyguladığı ortaya konulmuştur. Bununla beraber ortak bir standart test prosedürünün (SOP) izlenmesi faydalı olacaktır. Bu açıdan FAT, SOP referans laboratuvar tarafından güncellenerek bürokratik işlemlerin tamamlanmasını takiben dağıtımını yapılacaktır.

Sonuçta teşhis kapasitesinin ortaya konulması açısından 2009 Yılı Laboratuvarlar Arası Ulusal FAT Ring Test Programı başarılı olarak değerlendirilmiştir. Alınan sonuçlara göre daha iyi bir hazırlıkla 2010 yılı için de benzer bir programın uygulanmasında fayda sağlanacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Referans laboratuvar, katılan tüm teşhis merkezlerine ve katkılarından ötürü Dr. Thomas Müller’e teşekkür eder.

Kaynaklar

1. Dean DJ, Abelseth MK, Athanasiu P, (1996), *The fluorescence antibody test*. In Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. (eds.) *Laboratory techniques in rabies*, 4th edition, World Health Organization, Geneva, Switzerland, p. 88-93.
2. Müller T, (2002), *Nationaler ringversuch zur tollwutdiagnostik 2002 and 2006*. National and OIE Referens Laboratory for Rabies, WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance and Research, Institute for Epidemiology, Friedrich-Loeffler-Institute, Seestr. 55, 16868, Wusterhausen, Germany.
3. Müller T, (2006), *Nationaler ringversuch zur tollwutdiagnostik 2002 and 2006*. National and OIE Referens Laboratory for Rabies, WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance and Research, Institute for Epidemiology, Friedrich-Loeffler-Institute, Seestr. 55, 16868, Wusterhausen, Germany.
4. Robardet E, Cliquet, F, (2010), *Interlaboratory trial 2009: FAT repor.*, Community reference Laboratory for Rabies, Laboratory for Studies and Research on Rabies and Wildlife Disease, AFSSA, Malzeville, France.