

# FLUORESCENT ANTİKOR METODU

## Ö N S Ö Z

Mediha Şentürk (\*)

1961 - 1962 yıllarında A. B. Devletlerinde bulunduğum esnada Ohio State Üniversitesinde Mikrobiyoloji department'ında genel Bakteriyoloji ve Viroloji ile ilgili ders ve laboratuvar tatbikatlarına devam ederken, yaz döneminde özel olarak açılan ve 11 - 12, Haziran 1962 tarihleri arasında devam eden Fluorescent Antikor tekniği ile ilgili öğretici kursa iştirak etmeğe, memleketimizin geleceği bakımından faydalı gördüğüm için karar verdim.

Son zamanlarda çok revaçta olan bu Fluorescent Antikor (FA) tekniği antijen ve antikor arasında husule gelen her reaksiyon sistemine kabili tatbiktir. Teşhis noktai nazarından ise İmmunofluorescent boyama metodu, bilinmeyen antijen veya antikoru son derece hassasiyet ve özellikle meydana çıkardığı için önem kazanmaktadır.

Teknik, direkt olarak patolojik numunelere veya böyle materialde üreyen virus, bakteri, mantar ve protozoalar gibi ajanlara tatbik edilebilmektedir.

Bu metod, gündün güne antijen ve antikorların çabuk ve özel olarak mikroskopik idantifikasyonları sayesinde; izolasyon, üretme ve karakterizasyonda birçok uzun fizyolojik, serolojik ve buna benzer diğer testleri icabettiren yavaş metodların yerini almaktadır.

Hastalık etkeni hayatini kaybettiği veya kontaminantlarla karıştığı ahvalde dahi FA testi çok kıymetli bir idantifikasyon vasıtasıdır. Hastalıklı dokulardaki mikroorganizmler saf veya miks kültürlerden yapılan frotilerle idantifiye edilebilirler.

Bu tekniğin en büyük faydası da teşhis materyalinin alınış ve neticeyi bildiriş tarihleri arasındaki zamanı kısaltmak olacaktır.

Antikorlar fluorescent'le yüklenerek antijen ve antikor reaksiyonları fluorescence mikroskopi metodu ile müşahede edilebilirler.

(\*) : Veteriner Bakteriyoloji ve Seroloji Enstitüsünde Doku Kültürü ve Şap Araştırma Laboratuvarı Mütchassısı

Antijen ihtiva eden froti veya doku kesitleri fluorescein'le yüklü antikorların muayyen solüsyonlariyle muameleye tabi tutulduktan sonra fluorescence mikroskopta muayene edilirler.

Bu methodda fluorescent olmayan boyaların yerine florescent boyalar kullanılır. Çünkü karanlık bir zeminde az bir ışığın meydana getirilmesi, aydınlık bir sahadaki hafif bir boyanın meydana çıkarılmasından daha kolaydır.

FA tekniği bulaşıcı hastalıkların teşhis ve kontrolunda daha pek az kullanılmakta ve inkişafının ilk kademelerindedir. Fakat şüphesiz ki, zaman ilerledikçe insan sağlığı ile ilgili teşhis lâboratuvarlarında daha çok önem kazanacaktır.

Dünya mikrobiyoloji lâboratuvarlarının titizlikle üzerinde durduğu bu kıymetli ve hassas metodun yakın zamanlarda yurdumuzda da uygulandığını görmek beni büyük ölçüde sevindirecektir.

#### BİBLİYOGRAFYA BİLGİSİ

İlk kullanılan renkli örtü maddesi, diazo bağı yardımıyla benzidinin bir tuzunu yumurta albüminine vererek değişik yeni bir tip protein hazırlayan HEİDELBERGER ve arkadaşlarınınki idi. Bu mahsul spektrofotometrik metodlarla çalışılmış ve kantitatif olarak ölçülebilmıştır.

Fluorescent bileşiklerinin yüklenilebilen bir madde olarak kullanılması keyfiyeti Hopkins ve Wormal'in mesaileri ile başlar. Bunlar phenyl isocyanate'ı protein molekülleri ile birleştirdiler ve bunların immunolojik reaksiyonlarını tetkik ettiler.

Bunlardan kısa bir müddet sonra Coons ve arkadaşları Fluorescent gurubu ihtiva eden bir antikor proteininin immunolojik özelliklerini gösterdiler. Kimyasal moleküller muvacehesinde antikor proteininin değişmesi ile ilgili çalışmalara ait ilk literatürler pek fazla olmamakla beraber bugün antikor proteinlerinin modifikasyonunda kullanılan düzinelerle kimyevi bileşik mevcuttur.

Mikrobiyolojide FA tekniğinin ilk tatbikatı 1942 de Coons ve arkadaşlarının enfekte edilmiş fareden alınan doku kesitlerindeki eriyebilen pneumococ polisakkaritlerinin boyanabildiğini göstermeleri ile başlar. II. Dünya harbi esnasında ve onu takibeden yıllarda FA tekniği sahasında pek az çalışma vardır. Fakat 1950 den itibaren bilhassa Coons'un Harvarddaki lâboratuvarında yapılan mesailerle bu hususdaki nesriyatın sayısı artmağa başladı. Coons'un daha sonraki araştırmaları FA tekniği ile doku hücrelerindeki antijenin meydana çıkarılmasına ait metodların ıslah edilmesi esa-

sına dayanır. En son mesaisinde de FA tekniği ile ilgili esas malûmat ve metod açıklanmıştır. Tekniđe ait teferruata Coons ve Kaplan'ın müşterek yaptıkları en son neşriyatta rastlanabilir. (3)

FA tekniğine ait ilk çalışmalar daha ziyade hayvansal dokulardaki yabancı proteinlerin, polisakkaritlerin, hormonların, virusların ve riketsia'ların durumları ile alâkalı idi. Bunun neticesi olarak ilk çalışmaların bir çoğu pratik teşhis problemlerini halletmek yönünde değildi. 1950 - 1954 yıllarında Klebsiella'nın kapsüler polisakkaridinin ve Streptokokların grup A polisakkaritlerinin farelerin doku hücrelerindeki lokalizasyonu incelendi.

Sheldon FA teknikle insan adele lezyonlarındaki leptospiral antijeni demonstre etti. Bunlar istisna edilirse 1956 ya kadar bakteriyel antijenlerin meydana çıkarılmasına fazla önem verilmiyordu.

FA teknikle Entamoeba histolytica ve Entamoeba coli'yi bir birinden tefrik eden Goldman diagnostik sahada FA'nın ilk tatbikatını yapmış sayılır. Bundan sonra bakteriyolojik teşhis sahasında Fluorescent antikor çalışmaları başladı ve Moody ve arkadaşları ile Thomason ve arkadaşları 1956 da ilk neşriyatlarını yaptılar.

İmmunofluorescence muhakkak ki, bir çok bulaşıcı hastalıkların ve ajanlarının idantifikasyonunda tatbik edilebilir.

Şimdiye kadar bakteriyoloji sahasında Streptokoklar, Malleomyces, Pasteurella pestis, Pasteurella tularensis, Enterobacteriaceae'lerden Salmonellae, Shigellae ve Escherichia coli; Treponema pallidum, Bacillus anthracis, leptospira, listeria monocytogenes, Brucella, Corynebacterium diphtheriae, Neisseria gonorrhoeae üzerinde yapılan çalışmalarda FA teknikle iyi neticeler alınmıştır.

Viroloji sahasında ise İnfluenza, Poliomyelitis, köpeklerin gençlik, hastalığı, Herpes simpex, tavuk vebası, Varicella ve sığırcı çiçeği üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

Bu teknik bilhassa hücre kültürlerinde cytopatolojik bozukluk husule getirmeyen virus çalışmalarında çok büyük önem arz etmektedir.

FA metodu halihazırda virüs çoğalmalarda birbirini takibeden inkişaf durumunu, enfekte edilmiş hücredeki nukleik asid değişikliklerini, virüs antijenlerin inclusion cisimleri ile olan münasebetlerini ve hücre enfeksiyonunun potogenesisini incelemekte kullanılmaktadır.

Parazitoloji sahasında ise şimdiye kadar FA tekniği ile boyanan protozoanlar şunlardır : Entamoeba histolytica, Entamoeba coli, Toxoplasma gondii, Trichomonas vaginalis, Tripanosoma cruzi, Plasmodium beghei ve Anaplasma marginale, Trichinella spiralis larvası müstesna helmentlerden hiç birisinde bu metod denenmemiştir.

Mycology alanında mantarların FA usulleri ile teşhisi bakımından ciddi herhangi bir teşebbüs olmamıştır. Bu gecikme daha ziyade bazı mantarların sporlarının ve mycelium'larının autofluorescent olmasından ileri gelmektedir. Buna rağmen Vogel ve Padula indirekt FA metodu ile sistemik mycosis'li hastanın serumundaki antikorları demonstre etmeğe muvaffak olmuşlardır. Gordon ise Candida albicans'ı Candida tropicalis hariç diğer bütün Candida nevilerinden ayırmıştır.

#### FA TEKNİĞİ İÇİN LÜZUMLU ALET VE MATERYAL

Bu tekniğin kısaca izahına geçmeden evvel Fluorescence Microscopy hakkında birkaç noktaya temas etmenin, lüzumlu âlet ve malzemedeki bahsetmenin faydalı olacağı kanaatındayım.

Bazı kimyevi maddelerin ultraviole dalgalarını absorbe edip daha uzun visible dalgaları neşretme özellikleri mevcuttur. Böyle bir madde adi ışılda bir renkte görüldüğü halde ultraviole ışığında tamamen değişik renkte olabilir. Böyle maddelere Fluorescent ve bu olaya da Fluorescence denir. Bunun neticesi olarak eğer bir bakteri karışımı Fluorescent boyanın bir solusyonu ile muamele edilirse, bu boya ile birleşen veya bunu üzerine alan organizmler fluorescent olurlar ve ultraviole ışığı ile aydınlatılan bir mikroskopik sahada görülebilirler. Organizmler fluorescent boyalarla boyanınca karanlık sahada parlak olarak müşahade olunabilirler.

Fluorescent ışığın dalga uzunluğu absorbe edilen ışığın dalga uzunluğuna bağlı değildir. Neşredilen ışığın dalga uzunluğu eksite eden ışıktan daha uzundur. Meselâ, fluorescein ister ultraviole veya isterse mavi ışıkla aydınlatılsın daima sarı-yeşil renkte görülür. Fluorescence mikroskopta görülen renk, kullanılan okuler filtresine göre değişir. Meselâ sarı bir filtre neşredilen ışığın yeşil unsurunu azaltır.

Fluorescence neşri fluorescent moleküllerin fizikal ve kimyasal ortamına göre değişir. Meselâ, fluorescein, suda asetondakinden, asit solusyonunda alkalidekiden daha fluorescent'tir. Bundan başka

fluorescein şeklinde olduğu zaman amino flurescein'den daha kuvvetli fluorescent özelliğini taşır.

Fluorescence mikroskopi, adi mikroskopiye nazaran, hayal son derece donuk olduğu zaman mekanik ve optik diziden dolayı çok kritik bir durum arzedebileceğinden fazla dikkati icabettirir. En parlak fluorescent sahası bile gün ışığı ile aydınlatılan adi mikroskop sahasından birçok defa daha az parlaktır. Kuars yerine camdan yapılmış optik cihaz ile mücehhez mikroskoplar FA çalışmalarında kullanılmaya çok uygundur.

Achromatik objektifler bu iş için daha münasiptir. Bunlarla daha parlak görüntü elde edilebilir. Birçok araştırmacılar bu iş için karanlık saha kondansatörlerini kullanırlar. Tek veya çift okuler kullanmak ise, şahsi gayelere göre değişebilir.

FA tekniğinde ışık kaynakları ve filtreler bu iş için kullanılan aletlerin en önemli kısmını teşkil ederler. Bu reaksiyonlarda kullanılan fluorescein'in çok az miktarı ile görülebilir fluorescence hasil edebilmek için çok parlak ışık kaynaklarına ihtiyaç vardır. En iyi ışık kaynakları kuvars bir mahfaza ile çevrilmiş yüksek basınçlı mercury lambalarıdır. Bunların da daha ziyade hakiki yüksek parlaklıkları olan küçük cinsleri maksada uygundur. Zira tayfın fluorescein için lüzumlu olan kısmında (Ultraviole ve mavi ışık gibi) enerjilerinin önemli kısımlarını nesrederler. Birçok hallerde bu lâmbalar karbon lâmbalarından üstündürler. Son zamanlarda Moody Goldman ve Thomason, ışık kaynağı olarak kullanılan Leitz fluorescence lâmbalarına, 150 - Watt yüksek basınçlı Mercury vapor ampullerini yerleştirmekle iyi neticeler almışlardır. Aksettiren karanlık saha kondansatörü eksite eden ışığı muayene edilen maddeye geçirir ve husule gelen fluorescence sarı filtrelili 10X okuler kullanarak 4 mm. kuru ve 2 mm. immersion objektifleri ile müşahede edilir. Bazı araştırmacılar bu ışık kaynağını temin etme bakımından kendi hünerlerini gösterirler. Ultraviole'li fluorescent mikroskoba benzer bir sistem meydana getirebilirler. Bu iş bir karanlık saha kondansatörü, filtre ve karbon lâmbası ışığı veya diğer ultraviole ışık kaynağı ile başarılabilir. Marshall FA tekniği için karanlık saha kondansatörünü muvaffakiyetle kullanmıştır. Ultraviole ışığı kaynakları Leitz, Zeiss ve Reichert gibi muhtelif firmalardan temin edilebilir.

Fluorescence çalışmalarda filtreleri kullanmaktaki gaye ise fluorescent görüntünün parlaklığının tenbih edici ışığa nazaran çok daha düşük olmasından ileri gelmektedir. Fluorescence neşrinin

maskelenmesinin önüne geçmek için tenbih edici ışığın muayene eden kimsenin gözüne gelinceye kadar hareket ettirilmesi yani ayarlanması icabeder. Bu da lâmba ile muayene edilen materyel arasına yalnız fluorescence'ı eksite eden dalga uzunluklarının geçmesine yardım edecek olan birinci filtreyi ve obje ile muayene eden kimse arasına da yalnız visible fluorescence dalga uzunluklarını geçirmeğe yarayan ikinci bir filtreyi yerleştirmekle başarılabilir.

Fluorescence mikroskopi henüz daha yeni bir saha olduğu için kullanılan aletlerde süratle değişiklikler yapılmaktadır. Hangi aletin bu teknik için en uygun olabileceğine dair sorulan suallere henüz tatminkâr bir cevap yoktur. Bütün maksatlar için tek bir kombinasyon mevcut değildir. En iyisi istenen neticeyi veren sistemdir. Meselâ araştırmacı primer ve sekonder filtrelerden müteşekkil kombinasyonu tercih ettiği halde; bir diğeri maksadı için uygun olan değişik bir sistemi takibedebilir. Bu teknik Amerika Birleşik Devletlerinde tekâmül etmesine rağmen lâboratuvarlarda bu iş için Alman ve Avusturyalıların yaptıkları fluorescence ışık cihazları kullanılmaktadır. Avrupalı araştırmacıların fluorescence mikroskopi sahasında uzun yıllar tecrübeleri olduğu halde FA tekniğinde geç kalmışlardır.

Fluorescein için üç genel tip aydınlatma sistemi kullanılabilir :

1 — Ultraviole'ye benzeyen ve 350 - 400 milimikron arasındaki ışık (İkinci filtre renksiz fakat ultravioleyi geçirmez).

2 — 400 - 450 milimikron arasındaki mavi-viole'yi husule getiren ışık (İkinci filtre muhakkak sarıdır).

3 — 350 - 450 milimikron arasındaki ultraviole ve mavi-viole'yi beraberce husule getiren ışık (İkinci filtre muhakkak sarıdır).

Son zamanlarda FA çalışmalarının çoğunda kaplayıcı (Labeling agent) madde olarak fluorescein iso cyanate kullanılmaktadır. Bu madde rütubetli yerlerde tabiatını çabucak değiştirip bazı pratik güçlükleri doğurduğundan ilk önceleri kullanılmadan hemen önce, aminofluorescein'den phosgene gazı ile hazırlanıyordu veya nem çekmesini önlemek için asetonda saklanıyordu.

Son zamanlarda ticarete hazır olarak bulunabilen dayanıklı toz halinde bir madde hazırlanmıştır. Bu da fluorescein derivatlarından isothiocyanate'dır. Globulinler bugün hemen her lâboratuvarında bu madde ile sarılabilirler. Proteinleri kaplamakta aynı zamanda tayfin kırmızı kısmında fluorescence meydana getiren bo-

yalar da kullanılabilir. Bunlardan bazıları rhodamine B isothiocyanate, lissaminerhodamine B 200, tetramethyl rhodamine isocyanate ve tetraethyl rhodamine isocyanate A dır.

Alelâde maksatlar için fluorescein, kullanış kabiliyetiün yüksekliğinden ve gözün çok hassas olduğu bir renkle fluorescence husule getirdiğinden kaplayıcı maddeler içinde muhakkak ki en iyisidir. Aynı zamanda onun sarı-yeşil rengine normal dokularda nadiren autofluorescence şeklinde rastlanabilmesi de bunun kıymetini bir kat daha artırır.

### M E T O D

İsocyanate, üzeri kaplanacak hafif alkali antikor solüsyonuna ilâve edilir. Fluorescent mahfaza antikor proteinini tamamen kapladıktan sonra dializ hâdisesi sayesinde bağlanmamış olan fluorescein atılır. Böylece elde edilen mahfazalı antikor solüsyonu kendisine karşı antiserumun hazırlandığı homologous antijeni özel olarak boyamak için kullanılabilir. Bu metod direct veya indirect olarak tatbik edilebilir.

Direct metotta araştırmaya mevzu olan bakteriyel, viral veya protein sisteminde mahfazalı anti serum kullanmak lüzumludur. Meselâ, fluorescent anti - salmonella serumu Salmonella ihtiva eden mix kültürden yapılmış frotiye tatbik edildiği zaman homologous antijeni ile reaksiyona girer ve spesifik antijen - antikor reaksiyonu fluorescence ile demonstre edilebilir.

İndirect metotta anti serum mahfazalanmaz (Meselâ, tavşanlarda hazırlanmış anti - salmonella) fakat fluorescent anti globulin serumla bağlanırken birbirini takibeden iki usul tatbik edilir.

Muayene edilecek bakterileri ihtiva eden frotiye tavşan anti bakteriyel serumu dökülür. 10 - 30 dakika sonra reaksiyona girmeyen serum yıkama suretiyle giderilir ve sonra frotiye fluorescent anti-tavşan globulini ile muamele edilir. Anti serumla reaksiyona giren bakteri hücreleri tavşan antikorları (globulin) ile sarılacak ve bundan dolayı mahfazalı anti tavşan globulini ile reaksiyona girerek fluorescence ile idantifiye edilebilecektir. Görülüyor ki, birçok sayıda çeşitli antijenik sistemleri incelemek için bir veya iki adet mahfazalı anti globulin serumu kâfidir.

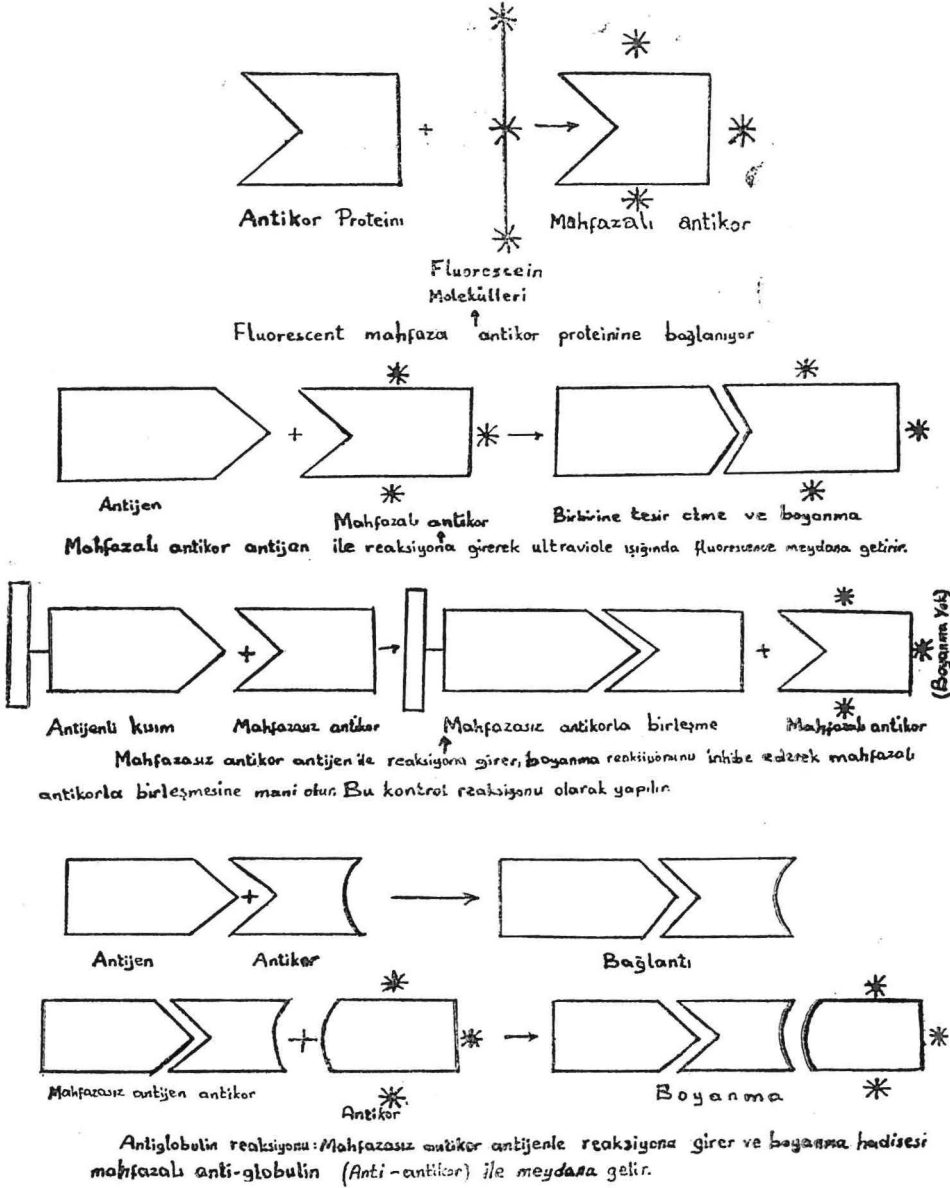
Patojen veya patojen olmayan bakterilerin idantifikasyonunda hali hazırda kullanılan diğer serolojik testlerle mukayese edilirse fluorescent antikor tekniğinin üstünlüğü derhal göze çarpar.



## FLUORESCENT ANTİKOR METODUN ŞEMATİK İZAHI

(Bu şemâ U.S.A. Ohio State Üniversitesi Microbiology 720 ders notlarından alınmıştır.

From the notes of Microbiology 720; Ohio State University U.S.A.)





## T A R T I Ő M A

Direkt metod, bir kaç kontrol ve manipülasyonu icap ettirdiğinden ve aynı serum ile bir çok testler yapılabilidiğinden indirekt metoda nazaran daha avantajlıdır.

İndirekt metodun direkt metoda göre üstün tarafları :

1 — Çok küçük miktardaki antikorların meydana çıkarılmasında fazla hassastır.

2 — Tek bir bağlanmış antiglobulin serumu çeşitli bağlanmış antiviral serum ve antijenlerle kullanılabilir ve bu da tek tek serumların mahfazalanması işini ortadan kaldırmış olur.

3 — Mahfazalanmamış antiserumlar antikor titrasyonları için dilue edilebilirler.

4 — Mahfazalanmamış (unlabeled) konvalesans antiserumlar, antijenin, spesifik antiserum meydana getirmek için kâfi miktarda olmadığı zamanlarda kullanılabilirler.

FA tekniğinin faydaları ve mahzurları:

A — Faydaları :

1 — Süratli oluşu - Eğer bütün malzeme ve materyal hazır ise frotileri hazırlamak, boyamak ve muayene etmek için bir saat kâfidir.

2 — Hassas oluşu - Mevcut olan organizmlerin sayısı ile ilgilidir.

3 — Kontaminantlar olduğu ahvalde dahi uygulanabilir.

4 — Canlı olmayan patojenlerin meydana çıkarılmasında kabili tatbiktir. Yabancı antijenler mevcut olduğu zaman spesifik antijen - Antikor bağlantısı müşahede edilebilir.

B — Mahzurları :

1 — FA tekniğini tamamen bilmek ve bu hususta yetişmek icabeder.

2 — Çok pahalı aletlere ihtiyaç gösterir.

3 — Spesifik olmayan reaksiyonlar husule gelebilir.

## Ö Z E T

Immunochemical boyama usullerinin tekâmülü hakkında kısa bir tarihçe ile bu metodun teşhisteki önemi takdim edilmiştir.

Fluorescent antikor testlerinin bulaşık hastalıkların teşhis ve kontrolü ile ilgili olarak mikrobiyoloji sahasında gelecekteki önemi münakaşa edildi.

Fluorescence'nin miktar ve tabiatı ile optik aletlerin seleksiyonundan bahsedildi.

Kullanılan fluorescent antikor testlerinin tipleri açıklandı ve FA metodunun daha yavaş ve fazla laboratuvar çalışmasını icabet-tiren standart testlere nazaran mikroorganizmlerin sür'atle idantifikasyonundaki büyük önemi belirtildi.

Bilinmeyen antijen ve antikorların FA metodu ile çabuk ve özel olarak idantifikasyonları münakaşa edildi.

### S U M M A R Y

A short history of the development of the Immunochemichal staining procedures and the importance of this method in diagnosis have been presented.

The future significance of the fluorescent antibody tests in microbiology in connection with the diagnosis and control of the contagious diseases was discussed.

The nature and quantity of fluorescence and the selection of the optical equipment have been discussed.

The types of fluorescent antibody tests which are in use have been explained. The importance of the FA method in the rapid identification of microorganisms was pointed out as opposed to the slow standard tests which require a great amount of laboratory work.

The rapid and spesific way of identifying unknown antigen and antibody through the FA method has been discussed.

### L I T E R A T Ü R

- 1 — Cherry, W. B., Goldman, M., and Carski, T. R., with the collaboration of Moody, M. (1960)

Fluorescent Antibody Techniques in the Diagnosis of communicable diseases. United States Government Printing office Washintong D. C. Public Health Service Publication No. 729.

- 2 --- Communicable Disease Center Laboratory Branch Atlanta, Georgia. Training Course in Fluorescent Antibody Technique for Grouping Beta Hemolytic Streptococci. Laboratory Manual. (1961).
- 3 --- Coons A. H., and Kaplan, M. H. : Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody J. Exper. Med. 91 : 1 - 13, 1950.
- 4 --- Cunningham, Charles H. (1960) A laboratory Guide in Virology.
- 5 --- Kaplan, M. H., Coons, A. H. and Deane, H. W. : Localization of Antigen in Tissue Cells. III - Cellular distribution of pneumococcal polysaccharides types II and III in the mouse. J. Exp. Med. 91 : 15 - 30, 1950.
- 6 --- Goldwasser R. A. and Shepard C .C. : Staining of complement and modifications of fluorescent antibody procedures. J. Immunol. 80 : 122 - 131, 1958.
- 7 --- Moody, Max D., Ellis, E. C. and Updyke, E. L. : Staining Bacterial Smears with Fluorescent antibody. VI - Identification of Salmonellae In Fecal Specimens (REPRINT)
- 8 --- Pelczar, M. J. Jr. ,Reid, R. D. (1958) Microbiology.