

Fluorescein Yüklü Antikor Metodu ile Sığır ve Kobay İdrarından Leptospira Pomonanın Meydana Çıkarılması

Y a z a n :
F.H. White ve M. Rıstac (*)

Çeviren : Müth. Vet.
Necati Ünlüleblebici

Çeşitli atijenlerin lokalizasyon ve idantifikasyonları için Coons ve Kaplan'ın fluorescein yüklü antikor tekniği son zamanlarda üstün bir ehemmiyet kazanmıştır. Bu tekniğin diğer bir faydası da çeşitli mikroorganizm ve antijenler üzerindeki çalışmalara yardımcı bir metod olmasıdır. Bu konuda çalışmaların müsbet netice vermeleri laboratuvarları, mikropların husule getirdiği hastalıkların teşhis ve idantifikasyonlarında bu tekniği direkt bir metod olarak kabul etmelerine yol açmıştır.

Bu tekniğin leptospiraların teşhisinde kullanılması, Sheldon tarafından Weil's hastalığına yakalanmış bir hastanın adele lezyonlarında leptospira İcterohemorrhagiae tesbitinden sonra Moulton ve Howath tarafından bir Haemster'in böbreğinde Leptospira Canicola'nın mevcudiyetinin görülmesi ile olmuştur.

Taktim edilen rapor experimental olarak enfekte edilmiş kobay ve sığır idrarında L. Pomona'nın Fluorescein ile yüklü antikor tekniği ile teşhisini açıklamaktadır.

MATERYAL VE METOD

ANTİSERUM HAZIRLANMASI : Hiperimmun serum L. Pomona LC-5-71 ile tavşanların immunizasyonu sureti ile hazırlanmıştır. Kültürler 30°C de 4—6 gün Stuart vasatında üredikten sonra 0.3 % formalin ile öldürüldü. Müteakiben 10.000 devirde 20 dakika santrifüj edilerek leptospiralar vasattan çıkarıldı. Elde edilen bu leptospiraların, pH. 7,2 de Bufferd edilmiş 0.85 % NaCl solusyonunda tekrar suspansiyonu yapıldı. Bu suspansiyon 550 mili mikron dalga uzunluğu, 20 Colorimeter spektronik kullanarak ışığı % 40 nisbetinde geçirecek şekilde ayarlandı. Ayarlaması yapılan bu suspansiyondan normal tavşana intravenöz olarak 5—7 şer gün ara ile 1. ml, 4. ml, 4. ml, ve 6. ml inoküle edildi. Son inokülasyondan 7 gün sonra tavşanın kalbinden kan alındı ve titresi yapıldı. Bu titrenin 1/10.240 olduğu homolog antijen kullanarak modifiye makroskopik plate teknik ile tesbit edildi.

GLOBÜLİNLERİN MAHFAZALANMASI : Coons ve Kaplan'ın genel metodlarına göre globulinlerin ekstraktları yapıldı ve fluorescein isocyanate ile mahfazalandırıldı.

(*) The Journal of Infectious Diseases : Vol. 105 - 1959, 118 - 123.

Normal globulinler agglütininin ihtiva etmediği halde immünglobulinler'in agglütinasyon titresi 1/5120 idi. Son yüklü globulinler, yüklü leptospiral antikorların serolojik spesifiteleri için sadece kontrol boyası olarak hizmet gördüler.

KOBAYLARIN ENFEKTE EDİLMESİ : İki kobay, WICKARD suyu ile enfekte olmuş kobaylardan alınan % 10 luk böbrek doku suspansiyonundan 1ml intraperitoneal yolla enfekte edildi. Enfeksiyondan 5-6 gün sonra kobaylarda hararet yükselmesi görüldü. 30 gün bekledikten sonra kobaylar öldürüldü. Bu kobayların idrar ve böbrekleri aseptik olarak alındı ve fletcher vasatında kültürleri yapıldı. Fluorescent antikor boyaması için idrar ve böbrek frotileri hazırlandı. Böbrek numuneleri Levaditi'nin gümüş boyası için alındı. Normal kontrollardan geçen idrar ve böbrek numuneleri fluorescent mikroskopik yolu ile muayene edildiler.

SIĞIRLARIN ENFEKSİYONU : 8 aylık Splenektomi yapılmış 48 No. lu Holstein danası yukardaki kobayların idrarından izole edilen L. Pomona kültüründen 5. ml deri altı yolla inoküle edildi. İnokülasyondan 6 gün sonra ateş yükselmesi görüldü. Karanlık saha muayenesi ve fluorescent antikor boyaması için leptospiremik devre esnasında kan alındı ve heparinize edildi. Daha sonra canlı homolog antijen kullanarak mikroskopik agglütinasyon testi ile (aggl. lysis) serum agglutinlerini tesbit etmek için haftada iki defa kan alındı. İdrarda karanlık saha muayenesi ve fluorescent antikor boyaması için haftada iki defa toplandı. İdrarın, 0.3 ve 0.45 mikronluk milipore filtrelerinden süzülükten sonra periodik olarak kültürü yapıldı. Normal kontrol danalarından alınan kan ve idrar numuneleri fluorescein ile mahfazalı antikor tekniği ile muayene edildiler.

48 No: lu hayvan, idrarı ile fazla miktarda leptospira çıkarmağa başlayınca (karanlık saha muayeneleri ve fluorescent antikor boyama ile tesbit edildi) iki jersey danası (151 No: lu Splenektomili, 413 No: lu normal) pH. 7.5 da buffere edilmiş 0.85 % lik NaCl solusyonu ile 1/2 nisbetinde dilüe edilmiş bu idrardan 2,5 cc deri altı yolla inoküle edildiler. İnokülasyonlar, enfekte idrarı toplar toplamaz derhal yapılmıştır. İdrarın karanlık saha muayenesinde bir çok aktif leptospiralar görülmüştür. İzolasyonda bu 3 hayvan bir arada tutuldular. 151 No: lu dana inokülasyondan 4,5 hafta sonra, 413 No: lu ise 9 hafta sonra enfekte oldu. 151 ve 413 No: lu danaların kan ve idrar muayeneleri, 48 No: lu danada tarif edildiği gibi yapılmıştır.

NÜMUNELERİN HAZIRLANMASI : Kobayların otopsisı yapıldıktan sonra, idrar, idrar kesesinden alındı. Takriben 15 mm² lik bir saha kaplayacak tarzda lam üzerine bu idrardan bir damla koyarak yayıldı. Kurumaya bırakıldı ve preparat kuruduktan sonra 15 saniye saf etil alkolle tesbit edildi. Sonra fluorescein mahfazalı antileptospiral antikor ile boyandı. Bu boyama işi, hazırlanan frotili mahfazalı antikorla kaplayarak ve içinde nemli filtre kağıdı bulunan petri kutusunda 37°C de bir saat inkübe ederek başarıldı. Antikor mahfaza boyasının fazla gelenini çıkarmak için nümüne 0.85 % NaCl de 10 dakika yıkandı. Müteakiben 10 dakikada distile suda tutuldu. Preparat kurutuldu ve üzerine glyceril - Saline (9 kısım glycerol ve 1 kısım 0.85 % lik NaCl) damlatıldı. Muayene edilinceye kadar da ışıktan korundu.

Leptospiralar buffer-saline de toplanırsa siğir idrarında uzun zaman aktif olarak hareketli kaldıkları tesbit edilmiştir. Aynı zamanda Sigma 7-9 biyokimal buffer ve Sorensen'in fosfat bufferi pH. 7,4 de kullanıldı ve leptospi-

raların canlı kaldıkları görüldü. Her bir cc buffer için takriben 9 cc idrar toplandı. Toplanan idrarın 30 dakika içinde karanlık saha muayenesi yapıldı. Sonra formol nisbetini 0.8 % yapmak için idrara formol ilâve edildi ve bu Buffer'li, formollü idrar santrifügasyonla leptospiralar konsantre edilerek mahfazalı antikorla boyamak için hazırlandı. 15 ml idrar 1000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek iri parçaları giderildi. Üstteki kısım alındı ve 2°C de soğutulmuş santrifüjde tekrar 10.000 devirde 20 dakika daha santrifüj edildi. Üst kısım atıldı ve leptospiralı alt kısım, kobay idrarı için izah edildiği tarzda fluorescent muayeneleri için hazırlandı aynı ameliye normal sıgır idrarı ile de yapıldı.

Buffer'li, formollü idrardaki leptospiraların canlılıklarını göstermek için enfekte idrar nümuneleri oda derecesinde (takriben 28°C) ve çeşitli zaman aralarında fluorescent antikor tekniği ile muayene edildi.

Plazma, leptospiraların kanda en yüksek olduğu devir de toplandı ve aynı zamanda muayene edildi. Heparinize kandaki şekilli elementler çöktürüldü ve fluorescent antikor boyama için plazmadan frotiler yapıldı. Heparinize kan aynı zamanda 500 devirde santrifüj edildi ve plazma yukardaki teknikle muayene edildi. Normal sıgır kanında aynı şekilde muayene edildi.

FLUORESCENT MİKROSKOPİ VE FOTOGRAFİ : Fluoresceinle boyalı preparatlar (Sshott OG4, OG5) filtreleri ile mücehhez Zeiss aydınlık saha mikroskopi ile muayene edildiler. Aydınlatma için 200 W. maksimum basınçlı cıva buharlı lamba kullanıldı. Leptospiralar fluorescein mahfazalı antikor ile boyandı ve 5000-8000 A* dalga uzunluğundaki mavi-viole florışıl husule getirdi. Bu dalga uzunlukları Schott BG 12 filtreleri ile elde edildi. Fotoğraflar ise 35 mm Tri-X film ile 3 dakikalık bir poz verilerek alındı.

N E T İ C E : Kültürde leptospiraların meydana çıkarılması. Fluorescent mikroskopi ile de anlaşıldığı üzere L. Pomona (LC 5-71) nin mahfazalı antikoru, homolog L. Pomona hücrelerini serolojik olarak boyadı. Bundan başka fletcher'in yarı katı vasatında üretilmiş olan üç heterolog serotip olan L. Canicola, L. İcterohaemorrhagiae, L. Sejroe hücreleride yukarda mahfazalı antikor ile boyandı. Fluoresceinle mahfazalı normal tavşan globulinleri ile boyandıkları zaman leptospiral organizmlerde hiç bir fluorescence görülmedi.

KOBAY İDRAR VE BÖBREĞİNDEKİ LEPTOSPIRALARIN MEYDANA ÇIKARILMASI

Leptospiralar, enfekte kobaylardan yapılan idrar ve böbrek frotilerinin fluorescent antikor boyama tekniği ile meydana çıkarılmıştır. Aynı zamanda karanlık saha muayenesi ile de müşahade edilmiş olup, fletcher vasatında kültürünü yapmak suretiyle enfekte idrardan elde edilmiştir. Leptospiralar böbrek kültürlerinde tespit edilmemiştir. Seri halde böbrek kesitlerinin Levaditi'nin doku boyası ile boyanması ile de leptospiralar meydana çıkarılmadı. Normal kobay idrarından ve böbrek dokusundan yapılan preparasyonlarda ve fluorescent boyamalarda leptospiraya benzer hiçbir organizm görülmedi.

(Devamı gelecek sayıda)