

Fluorescent Yüklü Antikor ile Kuduz'un Teşhisi

Ahmet SİPAHIOĞLU

Tavuk Hast. Lâb. Şefi

Ö N S Ö Z

Son birkaç yıl esnasında birçok bakteriyel ve virusi hastalıkları teşhis için uygulanmaya başlanan bu metod, henüz yeni olmakla beraber, Birleşik Amerika ve Avrupa devletlerinin birçok lâboratuvarlarında önemli bir yer işgal etmeye başlamıştır.

Bu konuya, Enstitümüzün yayın organı olan derginin 1963 Aralık tarihli sayısında sayın meslektaşlarımdan M. Şentürk ve N. Ünlüleblebici birer yazı ile değinmişlerdir.

Aynı yıl, Fransa'da bulunduğum esnada Pastör Enstitüsünün Kuduz Lâboratuvarında bu metodu görmüş ve bizzat lâboratuvar şefi Dr. Atanasiu ile birlikte Kuduz teşhisi üzerindeki çalışmalara katılmışım.

Bu yazımızda, tekniğin genel prensiplerini teşkil etmekte olan **antikor ve antijen** münasebetleri üzerinde durmadan, bu usulle çalışmak arzusunda bulunanlara faydalı olur kanısıyla, metodun uygulanması, lüzumlu materyal ve bunların hazırlanmasıyla ilgili hususlar incelenecektir.

T A R İ H Ç E

İmmunifluorescent metodu ile teşhis üzerinde en fazla açışan **Coons** olmuştur denebilir.

Coons ve **Kaplan** (1950) Fluorescent boya maddesi ile yüklü antikor teşhis metodunun kurucuları ve öncüleri olmuşlardır.

Fluorescent maddesinin giderilmesi için toz haline getirilmiş dokuya ve reçineye emdirme usullerini de **Coons** (1955) ve arkadaşlarının eseridir.

Cochrane, (1960) Arthus fenomeni ve metodun izahını yapmıştır.

Laurence (1963) ve arkadaşları boya maddesi olarak rivanöli denemişlerdir.

Thomas (1963) ve arkadaşları, fluorescent antikor yüklü metodu ile teşhiste, direk ve indirek teşhis arasındaki fark üzerinde durmuşlardır.

Şentürk (1963) memleketimizde ilk olarak bu metod ile teşhise değinmiş ve metodun faydalı ve mahzurlu taraflarını belirtmiştir.

M A T E R Y A L

Teşhisin uygulanmasında bilhassa şu materyallere ihtiyaç vardır :

- A) Hiperimmün serum elde etmek için at.
- B) Antijen karakterinde olan, hastalıktan şüpheli beyin.
- C) Çeşitli solüsyonlardan :

1 — Tampon serum fizyolojik (T.S.F.)

NaCl 80 gr.

NaH₂PO₄ 13,8 gr.

NaOH (% 40 sol.) 7,0 ml.

(On litre distile suya iblâ edilir ve Ph-sı daima 7,0 - ye ayarlanmış olmalıdır.)

2 — Tampon karbonat solüsyonu :

Sol. a) Na₂CO₃ 13,25 gr. 250 ml. distile su.

Sol. b) NaHCO₃ 10,50 gr. 250 ml. distile su.

3 — Amonyum sulfat solüsyonu.

4 — Baryum klorür solüsyonu.

D) Mikroskop ve filtreleri :

1 — Mikroskop, karanlık saha ve achromatik veya apochromatik objektifli olabilir.

2 — Mikroskop ultraviole lâmbası : HBO - 200 Osram veya AH - 6 General Electric.

3 — Filtreler; İki çeşit olup, birincisinin işareti Corning No CS-5,58 veya UG-2 Zeiss, ikinci filtre ise OG-4 Zeiss marka Vraton 2B sinonimli filtrelerdir.

E) Diğer çeşitli materyaller :

1 — Celophane kese.

2 — Manyetik karıştırıcı.

3 — Aseton veya aynı maksat için saf alkol ile eter karışımı.

4 — Üçbin devirlik santrifüj.

M E T O D

A) FLUORESCENT YÜKLÜ ANTİKORUN HAZIRLANMASI İLE İLGİLİ HUSUSLAR :

1 — Hiperimmün serumun elde edilmesi :

Hiperimmün serum elde etmek için at, virus fiks ile immunizasyona tabi tutulur. Hayvandan elde edilecek serum'un mümkün nispette yüksek antikor taşıması istenir.

2 — Serumdaki globülünlerin çöktürülmesi ve santrifüj :

Müspet antikor taşıyan serum, eşit miktarda (T.S.F.) ile karıştırılır. Bu karışımdaki globülünlerin çöktürülmesi 1/2 nisbetinde doymuş amonyum sulfat eriği ile sağlanır.

Birtaraftan manyetik çubuk ile serum'un karıştırılması yapılırken, diğer taraftan da, 10 - cu ml. den sonra aliminyum sulfat damla, damla ilâve edilir. Karıştırmaya 20 dakika süre ile devam olunur. Beyaz bir renk almış olan erlenmayerdeki karışımdan, santrüj tüplerine konarak, 15 dakika, 3000 devirde santrifüje edilir.

3 — Amonyum sulfat'ın giderilmesi :

Santrifüj tübündeki mainin üstteki berrak kısmı atıldıktan sonra, dipte kalan antikor tabiatındaki globülünler muayyen bir nispette (3 kısım globülün, 1 kısım T.S.F.) ile kesif antikor suspansiyonu haline getirilir. Bu durumdaki globülünler bir miktar amonyum sulfat taşıdıklarından, dializ metodu ile giderilmesi sağlanır. Bu maksat için, suspansiyon celophane'lı kese içerisine alınır, takriben beş litre T.S.F. ihtiva eden bir kap içerisindeki suya bırakılır. (Suyun Ph-sı 7,0; ısı derecesi (-4) C° olmalıdır). T.S.F. sık, sık değiştirilir ve her defasında amonyum sulfatın mevcudiyeti, baryum klorür solüsyonu ile kontrol edilir.

4 — Fluorescent yüklü antikor hazırlama :

Boya maddesi olarak birçok fluorescent maddeler mevcut ise de, en fazla Rodhamine tabiatında olanlar kullanılır, zira protein zerrelere nüfuz etme kabiliyetleri farklıdır.

Son zamanlarda isocyanate ve isotiocyanate gibi maddeler kullanılmaya başlanmıştır. Bilhassa isotiocyanate üstün vasıflarından dolayı, adı geçen Enstitü lâboratuvarında da tercihan kullanılır (*).

Isothiocyanate, boya maddesini istihsal eden firmalar :
«Prolabo», 12 Rue, Pelée Paris 11 e
«Dajac», 5000 London Street, Philadelphia, (U.S.A.)

Boya maddesinin ilâvesi aynı şekilde manyetik karıştırıcı işti-râkiyle ve azar, azar yapılır.

Kesif bir antikor suspansiyonunu iyi bir şekilde boyayabilmek için şu formüle göre hareket edilir :

- a) NaCl (0,15 M.) 28,2 ml.
- b) Tampon karbonat sol. 7,5 ml.
(Sol. a - dan 1 kısım)
(Sol. b - den 8 kısım)
- c) Kesif protein sol. dan 14,2 ml.
(1 ml. de 35 mg. globülin hesabıyla)
- d) İsothiocyanate 25,0 mg.

(Genellikle 100 mg. protein - globülin fraksiyonu için 5 mg. isothiocyante sarf olunur.)

Bu manipulasyon 0° ile 4 C° de yapılmalıdır ve bu şartlar altında manyetik karıştırıcı ile 18 saat müddetle karıştırılmaya devam olunur. Bunu müteakip fazlalık teşkil eden fluorescent maddesinin giderilmesi için, aynı amonyum sulfatta olduğu gibi, ikinci bir dializ uygulanır. Bu dializ, (-4) C° de 3 - 4 gün müddetle ve her 12 saatte bir, T.S.F. değiştirilmek şartıyla yapılır.

5 — Spesifik olmayan fluorescent'ten arıtma :

Dializden sonra spesifik olmayan, fluorescent yüklü protein zerrelere dahi kalabilir. Bunlar, teşhiste yanıltmalara sebep olabileceğinden, bunların mümkün derece giderilmesi için şu usuller düşünülmüştür :

- a) Toz haline getirilmiş doku hülâsasına emdirme,
- b) Reçine kolonlarına emdirme,
- c) COHN metoduna göre alkol ile globülinleri çöktürme.

(Bunlardan en kullanışlı olanı, toz haline getirilmiş doku hülâsasına fluorescent yüklü antikorların emdirilmesidir.)

B) MUAYENE EDİLECEK OLAN MATERYAL İLE İLGİLİ HUSUSLAR :

1 — Frotinin hazırlanması ve tespiti :

Muayene edilecek şüpheli beyin parçasının, antijenik vasfını muhafaza edebilmesi ve kolaylıkla kesilebilmesi için dondurulması elzemdir. -15C° veya diğer metodlarla dondurulan beyin parçasından, mikroton ile 5 mikron kalınlığında ince bir parça kesilir. Gayet ince uçlu bir pens vasıtasıyla tutularak, temiz bir lâm üzerine kapatılır. Tespit için saf alkol ile eter karışımı veya asetondan istifade edilir. Bu maksatla kullanılan aseton, 3 - 5 lâmı alabilecek ağız ge-

niş ve kapanabilen bir kap içerisinde ve daimî surette -20 veya 30 C° dip frizde muhafaza edilir. Lüzumu halinde, tespit edilecek olan froti 5 dakika müddetle bu aseton içerisinde bırakılır. Çıkarıldıktan sonra T.S.F. ile yıkanır ve F. yüklü antikor ile muameleye hazır edilmiş olur.

2 — Frotinin Fluorescent yüklü antikor ile muamelesi :

Tespit edilmiş olan frotinin fluorescent yüklü antikor ile muamelesi esnasında, antikorun buharlaşmasını önlemek için büyükçe bir petriden istifade edilir. Evvelâ bu petri içerisine T.S.F. emdirilmiş kurutma kâğıdı yerleştirilir. Lâmin biraz yüksekte kalmasını sağlamak maksadiyle de cam bagetten yapılmış özel bir sehpa konur. Froti bu sehpa üzerine bırakılır, üzerine birkaç damla F. yüklü antikor damlatılır. Petrinin kapağı kapatılır ve 37 C° etüvde 30 dakika müddetle **conjugation**'a terk edilir. Çıkarıldıktan sonra T.S.F. ile güzelce yıkanır ve kurutulur.

3 — Frotinin mikroskobik muayenesi :

Froti, tekniğe uygun boyandıktan sonra muayeneye hazır hale getirilmiştir. Yalnız, lâmel üzerine Ph-sı 7,0 olan 9 kısım gliserin ile 1 kısım T.S.F. karışımından bir damla damlatılır ve bunun üzerine de lâm kapatılır.

Mikroskobik muayene achromatik ve apochromatik objektifli mikroskop ile karanlık yerde yapılır. Burada, mikroskoptan ziyade ışık kaynağı ve filtreler özellik taşımaktadır. Işık kaynağı olarak çeşitli birçok lâmbalar mevcut isede, bu lâboratuvarın kullanmakta olduğu lâmbanın markası yukarıda zikredilmiştir. Filtrelerden birincisine «Exiteure», ikincisine ise «Barrière» denir. Birincisi ışık kaynağı ile kondensatör arasına yerleştirilmiştir. İkincisi ise, lâm ile okuler arasındadır. Bu sonuncu filtre ultraviyole ışınları emer, buna mukabil fluorescent ışınları geçirir. (Her ikisininde markaları materyal bölümünde belirtilmiştir.)

Ayrıca iki filtre arasında husule gelecek olan harareti hafifletmek için % 25 kesafetinde bakır sulfat solusyonundan istifade olunur.

Mikroskopda, karanlık sahada görülecek olan, fluorescent yüklü antikor ile muayenesi istenilen maddedeki antijenin birleşmesi sonucu, antijen olan yerlerde antikor kümelenmeleri husule geleceğinden, parlayan fluorescent maddesi bunları meydana çıkaracaktır.

Muayene esnasında yanımları önlemek için, menfi serum ile de mukayeseli muayeneler yapılır. Böylece spesifik antikor ile anti-

jen birleşmesinden husule ge'len müspet mavi - yeşil pırıltılar ile, aspesifik antikor ve antijen birleşmesinden doğması muhtemel benzeri yanıtıcı pırıltılardan tefrik edilmiş olur.

Ö Z E T

Bu yazıda, kuduz'un teşhisi için, immunofluorescent metodu ve metodun uygulanmasında lüzumlu materyal ile bunların hazırlanması incelenmiştir.

Bu metodun bazı güçlükleri ve elverişsizlikleri olup, bunların arasında en mühimleri; fluorescent yüklemek suretiyle antikor hazırlanması ve bu hazırlık için, zorunlu kıldığı uzun süredir. Ameliyenin geri kalan kısmı güçlük arzemediği gibi, fazla zaman da istemez. Diğer bir deyimle, eğer gerekli antikor bir defaya mahsus olmak üzere yeter miktarda hazırlanmış olursa, bundan sonraki işlem ve zaman etkin olarak azaltılmış olur.

Bugün için, özellikle sonuçların kesinliği bakımından denilebilirki, yukarıda adı geçen metodla, diğer metodlara nazaran daha güvenilir neticeler elde edilebilir.

R é s ü m é

Dans cette article, on a expliquée la méthode immunofluorescente et les matériaux concernant le diagnostic de la Rage.

Cette méthode contient quelques difficultés et inconvénients parmi les quelles les plus impotans sont; la préparation de l'anticorps en le chargeant de fluoresceine et la longue durée exigé dans l'opération. Le reste de la manipulation ne présente plus de difficultés et ne demande pas beaucoup de temps. Ou bien, quand une fois l'anticorps nécessaire est en quantité suffisante, le temps de l'opération des diagnoses ultérieurs est alors raccourci.

Pour le moment, au point de vue de l'exactitude des résultats, on peut prétendre que, la méthode susmentionnée est plus sûre que les autres.

L I T E R A T Ü R

- Coons, A. H. ve M. H. Kaplan. (1950) J. Exp. Med., 91, 1 - 13.
Coons, A. H., ve arkadaşları. (1955), J. Exp. Med., 49, 102.
Cochrance, C. G. (1960), Ann. de l'Inst. Pasteur, 99, 229 - 230.
Laurence, H. (1963), J. of Imm., 90, 116 - 120.
Şentürk, M. (1963) Etlik Vet. Bakt. Enst. Dergisi, 2, 112 - 115.
Thomas, J. B. ve arkadaşları. (1963), J. of Imm., 91, 721 - 723.