

Floresan Antikor Tekniği ile Kuduz Teşhisi

Mükerrem **GÜLEY** (*)
Mehmet **TOKER** (***)

Mehmet **TUNUS** (**)
Mediha **ŞENTÜRK** (****)

Floresan Antikor Tekniği (FA); bir antijen - antikor presipitasyon reaksiyonudur. Bu reaksiyon, floresan boyalarla kaplanmış olan gamma globulinin mikroskopta floresans vermesi ile anlaşılır.

İlk defa 1942 senesinde Coons ve arkadaşları (6) fluorescein ile muamele edilmiş antikor vasıtasıyla, dokular içindeki antijeni meydana çıkarmaya ve bunu bir teşhis metodu olarak kullanmaya muvaffak olmuşlar, aynı metod daha sonra Mumps ve Rickettsia antijenlerinin demonstrasyonunda (8) ve Pneumococ polisakkaritlerinin dokulardaki dağılışını tesbit maksadiyle kullanılmıştır (17). 1950 de Coons ve Kaplan (7) in yaptıkları daha geniş bir araştırma ile Floresan Antikor Tekniği büyük bir tatbik sahası bulmuş oldu.

FA Tekniki ilk defa Goldwasser ve Kissling (11, 12) in çalışmaları ile kuduz teşhisine adapte edildi. Bunlar araştırmalarında sokak kuduz virusu ve Fix kuduz virusu ile tecrübevi olarak enfekte edilmiş farelerin ve tabii olarak enfekte olmuş muhtelif cins hayvanın beyin ve tükruk guddelerinde kuduz virusunu tesbit etmeğe muvaffak olmuşlar ve Floresan Antikor tekniği ile, immünizasyona tâbi tutulan şahıslarda antikorun tesbit edilebileceğini, keza Negri cisimlerinin viral orijinli olduğunu bildirmişlerdir. Mc Queen ve Levis (20, 21) tabii olarak kuduza yakalanmış hayvanların beyin dokularında Floresan Antikor tekniği ile kuduz antijeninin tesbit edilebileceğini, testin çabuk, pratik ve fare inokülasyonuna paralel sonuç vermesi bakımından teşhis la-

(*) Kuduz Lab. Şefi
(**) Kuduz Lab. Müt.
(***) Kuduz Lab. Asistanı
(****) Şap Enst. Lab. Şefi

boratuvuarları için ideal olduğunu bildirmişlerdir. Bilhassa 1960 senesinden sonra pek çok araştırmacı bu metotla kuduz teşhisi üzerinde çalışmış ve Floresan Antikor tekniğinin biyolojik metotla paralel gittiğini bildirmişlerdi (3, 4, 9, 10, 24).

Elde edebildiğimiz literatüre göre bizde de Gülmezoğlu (14, 15) Floresan Antikor tekniğini E. Coli ve C. Diphtheriae'nin idantifikasyonunda kullanmıştır.

FA tekniğinin kuduzun bilhassa erken teşhisindeki rolünü nazarı itibara alarak biz de, 1966 yılındanberi bir araştırmaya başlamış bulunuyoruz. Bu mesaide, kuduz teşhisi ile meşgul olan laboratuvarlara faydalı olur kanaatiyle, FA tekniği için lüzumlu olan maddelerin istihsal ve titreleri ve boyama metodundan tafsilâtiyle bahsedilecektir.

MATERTAL VE METOD

Antiserum : Bu maksat için üç merkep Pasteur metodu (18) ile immünizasyona yatırıldı. Hayvanların üçüne de aynı gün başlamak üzere :

1 inci günden 60 ıncı güne kadar gün aşırı 20 ml Semple tipi aşısı.

61. günden 72. güne kadar 3 er gün ara ile, 4 enjeksiyon, her enjeksiyonda, Fix Kuduz virusu ile enfekte 1/4 tavşan beyni suspansiyonu.

73. günden 88. güne kadar 4 er gün ara ile 4 enjeksiyon her seferinde Fix Kuduz virusu ile enfekte 1/2 tavşan beyni suspansiyonu.

89. günden 98. güne kadar 5 er gün ara ile 2 enjeksiyon her seferinde bütün bir tavşan beyni.

106. gün birinci kan alma.

136. gün 1 enjeksiyon, bütün bir tavşan beyni,

144. gün ikinci kan alma.

Eğer serum elde etmeğe devam edilecekse 30 gün sonra hayvana tekrar bir tavşan beyni inoküle edilir ve 8 gün sonra kan alınır. Bu böylece devam eder.

Merkeplerden elde edilen serumların serum - virus neutraliza-

tion testi ile Atanası (1) metoduna göre kudretleri ölçüldü. Serumlar evvelâ 56°C. 30 dakika inaktive edildi. Herbirinden ayrı ayrı 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000 dilüsyonlar hazırlandı. Daha evvel titresi yapılarak bilinen standart eprüve virusu (CVS) nun 300 LD si ile serum dilüsyonları müsavi miktarda karıştırıldı. Serum - virus karışımı 1,5 saat 37°C. etüvde bırakıldı. Sonra her dilüsyondan 0,03 ml 5 er fareye intraserebral olarak inoküle edildi. Aynı gün CVS kuduz virusu tekrar titre edildi. Aşılanmış olan fareler 14 gün müşahede de tutuldu ölen ve hastalananlar kaydedildi netice Reed ve Muench (1) metoduna göre hesaplandı. Serumlardan biri zayıf titre verdiği için ekarte edildi. İkincisi 1/1800, üçüncüsü 1/4000 işledi. Biz konjugat hazırlanmasında 1/4000 titre veren serumu kullandık.

Konjugat (Conjugate) : Serumdaki antikoru yüklenmiş olan gamma globulinin floresan boyalarla kaplanmasına ve birleşmesine konjugasyon, bu maddeye de konjugat denmektedir. Konjugasyon esnasında antikorda biyolojik ve immünolojik herhangi bir değişiklik olmamaktadır.

(*) Konjugat, Batty (2), Marshall (19) ve Riggs (22) metodlarından faydalanılarak hazırlandı.

Gamma Globulinin İstihsalı :

1 — Serumun pH sı N/10 NAOH ile 8.5 a ayarlanır.

2 — Seruma manyetik bir karıştırıcıda kendi hacminin 3.5 misli %0.4 rivanol yavaş yavaş ilâve edilir. Rivanol %0.4 nisbetinde distile su ile hazırlanır.

3 — Meydana gelen çöküntü; albumin, alfa ve beta globulin ihtiva etmektedir. Bu 5000 devirde 15 dakika santrifüj edilir ve çöküntü atılır.

4 — Gamma globulin ihtiva eden mayi kısım ölçülür, her 100 ml için 1.2 gr. aktive kömür (activated charcoal) ilâve edilerek manyetik karıştırıcı ile 5 dakika karıştırılır bu suretle solüsyondaki rivanol ayrılmış olur.

5 — Bu karışım, içine Whatman No. 42 filtre kâğıdı yerleştirilmiş olan Buhner hunisinden süzülerek kömürden ayrılır. Süzme-yi kolaylaştırmak için su trompu kullanılabilir.

(*) Konjugatı, kendimiz istihsal edinceye kadar WHO ve İzmirde bulunan Tuslog 36. Müfreze Vet. Lab. temin edildi.

6 — Elde edilen berrak serum ölçülür, eşit miktarda tam doymuş ammonium sulfatla yavaş, yavaş karıştırılır. Bu karıştırma esnasında manyetik karıştırıcı kullanılır. Bu suretle gamma globulin presipite edilmiş olur.

7 — Tam bir presipitasyon elde etmek için bu karışım 24 saat 4°C. bırakılır. Ertesi gün 5000 devirde 20 dakika santrifüj edilerek dipte kalan çöküntü alınır.

8 — Bu çöküntü ilk volümünün 1/5 nisbetinde buffer tuzlu su pH 7.5 da eritilir.

9 — Eritilmiş olan gamma globulin deliklerinin çapı 25 armstrong olan dializ membranına konur, membranın her iki ucunun sızıntı yapmıyacak şekilde sıkıca düğümlenmesi lâzımdır. Membran içinde pH 7.5 buffer tuzlu su ihtiva eden beher glasa konarak 24 saat buz dolabında bırakılır. Bu müddet içinde tuzlu su en az üç defa değiştirilmelidir.

10 — 24 saat sonra membran içindeki mayi alınır, bu artık saf olarak gamma globulin ihtiva etmektedir. Protein konsantrasyonunu ayarlamak lâzımdır. Bir ml serumda 10 mgr. gamma globulin bulunması lâzımdır.

11 — Protein tayininde absorpsiyon metodu kullanıldı. Spektrofotometrede ultraviole ışınlarının 260 ve 280 dalga uzunluklarındaki rakamların birbirine nisbeti proteinin saf olduğunu göstermekte ve 1 ml serumda ne kadar protein mevcut olduğu hesaplanmaktadır. Elde ettiğimiz serumun 1 ml sinde 18 mgr. protein olduğu tesbit edildi.

12 — 1 ml de 10 mgr. protein konsantrasyonu elde etmek için, içinde 1/10 nisbetinde karbonat buffer olacak şekilde buffer tuzlu su ile sulandırıldı.

Karbonat bufferin hazırlanması :

Solusyon A. Na_2CO_3 5.3 gr. - 100 ml su

Solusyon B. NaHCO_3 4.2 gr. - 100 ml su

A solusyonundan B solusyonuna pH 9 olacak nisbette ilâve edilir.

Gamma Globulinin Fluorescein Isothiocyanate ile boyanması :

1 mgr. protein için 0.05 mgr. fluorescein izothiocyanate hesap edilerek manyetik karıştırıcıda ilâve edildi ve böylece

bir gece buz dolabında bırakıldı. İki ayrı firmanın fluorescein'i mukayese etmek maksadiyle, elde ettiğimiz gamma globulini iki müsavi kısma ayırarak bir kısmına, «Fluorescein İzothiocyante, Baltimor Biological Laboratory, USA No. 04-586» ilâve ettik. Diğer kısmına, «İsothiocyanato Fluorescein, Schuchardt München, No. IS 095» ilâve ettik.

Gamma globulindeki fazla boya sefadex'ten süzölmek suretiyle bertaraf edildi.

Sefadex'in Hazırlanması : Bu maksat için süperphine G 25 sefadex kullanıldı. 25 gr. kadar sefadex 250 ml tuzlu su ile karıştırılır. Çökmesi için bir müddet bırakılır. Sonra üzerindeki mayi dökülür. Bu muamele üç kere tekrar edilir. Son olarak yine 250 ml. tuzlu su ile karıştırılır, kutru 3 cm. ve altında musluğu bulunan cam bir boruya boşaltılır. Cam borunun en altına sefadex'den evvel az miktarda cam pamuğu yerleştirmek lâzımdır. Sefadex'in fazla suyu musluktan akıtılır, ve cam borudaki yüksekliği 15 cm. kadar olur, sefadex'in üzerine cam borunun kutru kadar kesilmiş olan bir süzgeç kâğıdı yerleştirilir. Konjuge olmuş gamma globulin bu süzgeç kâğıdı üzerine yavaş, yavaş boşaltılır. Konjugat süzölerek sefadex'i geçip cam pamuğa kadar geldiği zaman en üstteki süzgeç kâğıdına yavaş, yavaş tuzlu su dökülür, bu suretle konjugatın hepsini geri almak mümkün olur. Süzölen konjugat absorbsiyona ve titrasyona tabi tutulur. Bunun için doku pudrası ve fare beyni suspansiyonu lâzımdır.

Doku Pudrası : Cherry ve arkadaşları (5) metoduna göre hazırlandı. 100 adet beyaz farenin beyni ve karaciğeri alınarak ayrı, ayrı tartılır. Az miktarda distile su ile mixatörde iyice ezilir. 5000 devirde 30 dakika soğutucu santrifüjde çevrilir, sonra çöküntü alınır, hemoglobinden temizlemek maksadiyle distile su ile, en az üç defa, santrifüj edilmek suretiyle yıkanır. Tekrar tuzlu su ile sulandırılır ve sıkı bir tülbentten süzölerek konjektiv doku ve büyük parçalardan temizlenmiş olur. Sonra tekrar santrifüj edilir ve Buchner hunisine yerleştirilmiş olan süzgeç kâğıdına dökülür, üzerinden bolca aseton geçirilmek suretiyle dokuda bulunan sudan iyice arınmış olur. İçerisinde su kalmadığına emin olduktan sonra 37°C. etüve bırakılarak kurutulur. Bu kuru materyal havanda dövölmek suretiyle gayet ince, açık renk doku pudrası elde edildi. Pudra rutubet almayacak şekilde kapalı şişelerde buz dolabında muhafaza edilmektedir.

Fare Beyni Suspansiyonu (5) : a) Enfekte fare beyini ile.
b) Normal fare beyini ile hazırlanmaktadır. Her ikisi de boyama tekniğinde kontrol sistemi olarak kullanılmaktadır.

a) Steril bir petride toplanan enfekte fare beyinleri (fareler CVS kuduz virusu ile enfekte edildi) tartılır. Buna 4 volüm yumurta sarısı suspansiyonu ilâve edilir, yüksek devirli bir mixatörde, ısınmaması şartıyla bir dakika ezilir, 1000 devirde 10 dakika santrifüj edilir, üstteki kısım alınarak 1 - 2 ml olmak üzere küçük tüplere taksim edilir ve dondurulur.

b) Normal fare beyini suspansiyonu da aynı şekilde hazırlanmaktadır.

Yumurta Sarısı Suspansiyonu : 10 ml. 6-7 günlük embryonlu tavuk yumurtası sarısına 90 ml steril bufferli su pH 7.6-7.8 ilâve edilir ve buz dolabında muhafaza edilir.

pH 7.6 bufferli su :

Na₂HP₄ 1/10 molar 91.5 ml
NaH₂PO₄ H₂O 1/10 molar 8.5 ml

Distile su 900 ml.

20 dakika 120°C. otoklavize edilir.

Konjugatın Absorbsiyonu (5) : Konjugat, spesifik olmiyan boyamalara mani olmak için doku pudraları ile absorbsiyona tâbi tutulmaktadır. Konsantre konjugatın her ml si için 100 mgr. karaciğer pudrası hesaplanarak santrifüj tüpüne konur. Pudra evvelâ kendi ölçüsünün iki volümü kadar fosfat buffer tuzlu su pH 7.5 ile karıştırılarak santrifüj edilir, üstteki kısım atılır, ıslanmış olan pudra daha evvel ölçülmüş olan konjugat ile karıştırılır, çalkalanır ve bir saat buz dolabında bırakılır, her 15 dakikada bir çalkalanır, sonra 1000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek üstteki konjugat bir pipet vasıtasıyla bulandırılmadan alınır. Günlük çalışmalara yetecek miktarda ampullere taksim edilir, ağızları kapatılarak dondurulur.

Aynı işlem beyin pudrası ile tekrar edildi.

Konjugatın Titresi : Absorbsiyona tâbi tutulan konjugat Sikes (23) metodu ile titre edildi. Preparatların hazırlanması ve boyanmasından sonra bahsedilecektir. Altışar adetlik iki seri tüp hazır

lanır, üzerlerine, 1/4, 1/6, 1/8, 1/10, 1/12, 1/14 yazılır, birinci tüpe 1 damla konjugat + 3 damla normal fare beyni suspansiyonu (NFB); ikinci tüpe 1 damla konjugat + 5 damla NFB susp, ve böylece devam edilir. İkinci seri tüplerde de aynı dilüsyonlar enfekte fare beyni (EFB) suspansiyonu ile hazırlanır. Bu suspansiyonlar 10 dakika oda derecesinde bırakılır. Kuduzla enfekte fare beyninden hazırlanmış olan 6 adet preparatın sol taraflarına birinci tüpten başlamak üzere, Konj. + NFB, sağ tarafına ise Konj. + EFB suspansiyonu damlatılır ve usulüne göre boyanır. Birinci preparattan başlamak suretiyle mikroskopta ,evvelâ sol taraf sonra sağ tarafa tetkik edilir. Neticede, sol tarafta grimsi yeşil doku arasında filizi yeşil veya yeşil sarı, yıldız gibi parlak, floresans veren cisimlerin, en iyi görüldüğü, sağ tarafta ise, sadece grimsi yeşil veya mavimsi yeşil dokunun görüldüğü fakat floresans cisimlerinin görülmediği dilüsyon konjugat'ın titresini verir. Bu dilüsyon tesbit edilerek sonraki boyamalarda daima o titre kullanılır. İstihsal ettiğimiz konjugatta, yukarıda, izah edilen en iyi görünüşü, 1/10 dilüsyonunda elde ettik, boyamalarda daima bu had kullanıldı. Konjugat'ın titresini zaman zaman tekrarlandı.

Mikroskop : Binocular Jena mikroskobu, cardioid karanlık saha kondansörü, apochromatic objektif, ışık kaynağı olarak, tazyikli civa buharı ihtiva eden HBO 200 tip lamba, ultraviyole ışık filtresi UG1, ışık kaynağı ile bu filtre arasına harareti emici bir filtre, gözü kaçak ışıklardan korumak maksadiyle GG9 göz filtresi kullanıldı. Büyütme, 15 × 10, 15 × 20 dir.

Marazi Materyal : Kuduzdan şüpheli olarak laboratuvara gelen muhtelif cins hayvana (köpek, kedi, sığır, koyun, merkep, fare, sincap, kurt, tilki, manda, keçi, v.b.) ve 13 adedi insana ait 809 adet marazi madde üzerinde çalışıldı, bunların herbiri üç metodla mukayeseli olarak muayeneye tabi tutuldu.

1 — Beynin ammon boynuzu kısmından ince bir parça alınarak sürme ve dokundurma preparatı hazırlandı. Sellers metodu ile boyanarak Negri cisimcikleri arandı.

2 — Ammon boynuzu ve diğer kısımlarından alınan parçalar ezildi .Tuzlu su ile %10 suspansiyon yapılarak santrifüj edildi ve üstteki kısımdan intraserebral olarak 0.03 ml. 5 adet fareye inoküle edildi. Bu fareler 30 gün müşahedede tutuldu.

3 — Ammon boynuzu kısmından alınan ince kesitlerden hazırla-

nan preparatlar floresan antikor tekniği ile boyandı. Boyamada direkt metod (5) kullanıldı.

Preparatın Hazırlanması ve Boyanması :

1 — Ammon boynuzundan alınan ince bir parça tahta spatül veya birkaç parça katlanmış süzgeç kâğıdı üzerine konur. Daha evvel alkolden geçirilmiş ve silinerek temizlenmiş lâmin, sağ ve sol tarafına gayet ince olmak üzere iki dokundurma preparatı yapılır.

2 — Dreparat 30 dakika, oda derecesinde kurutulur.

3 — Daima frezerde bir lam kabında (coplin jar) muhafaza edilen aseton içine atılarak 4 saat fixasyona terkedilir.

4 — Asetondan çıkarılan preparat boyanıncaya kadar freezerde muhafaza edilir. Kontrol olarak kullanılan pozitif preparatlar daima freezerde muhafaza edilmek şartıyla, bozulmadan uzun zaman (1 ay) boyanma kapasitesinden birşey kaybetmeden kullanılabilir.

5 — Freezerden çıkarılan preparat, oda derecesinde, 5 - 10 dakika bırakılır.

6 — İki küçük tüp alınır. No. 1 tüpüne titresine göre 1 damla konjugat + 9 damla NFB susp. No.2 tüpüne 1 damla konj. + 9 damla EFB susp. damlatılır, karıştırılır. Bunlar 10 dakika oda derecesinde bırakılır.

7 — Preparatın sol tarafına 1 damla No. 1 suspansiyonundan sağ tarafına ise 1 damla No. 2 suspansiyonundan damlatılır. Bu damlaların birbirine karışmaması için azami dikkat ve itina gösterilmesi şarttır.

8 — Preparatlar, alt tarafına ıslak süzgeç kâğıdı konarak rutubetlenmiş, büyük petri kutularında, U şeklindeki baget üzerine yerleştirilir, petrinin kapağı kapatılarak 37°C. lık inkübatörde yarım saat bırakılır.

9 — Petri kutusu inkübatörden çıkarılır, ağzına kadar buffer tuzlu su (pH 7.4) ile doldurulur ve boşaltılır, sonra tekrar preparatları örtecek kadar buffer tuzlu su ile doldurulur, 10 dakika bekletilir.

10 — Kuruma esnasında tuz kristallerine mani olmak için bir defada distille su ile yıkanır. Meyilli bir yere konarak suyun süzülmesi beklenir.

11 — Preparatın sağ ve solunda doku sürülmüş kısımlara gliserin (%90 gliserin, %10 buffer pH 7) damlatılır ve temizlenmiş lamelle kapatılır.

Her boyamada CVS ile hazırlanmış bir müsbet preparat kontrol olarak bulundurulur.

Preparatın Okunması : Mikroskopta evvelâ kontrol preparata bakılarak boyamanın iyi olup olmadığı tesbit edilir, sonra şüpheli preparata geçilir. Eğer vak'a müsbet ise; Preparatın sol tarafın da yani konj + NFB damlatılan kısımda grimsi yeşil doku içinde, az veya sayılamıyacak kadar çok, büyüklü, küçüklü, filizi veya sarı yeşil renkte, floresans veren cisimler, bunlar yuvarlak veya oval olabilmekte, etrafı parlak yeşil, merkezine doğru parlaklık azalmakta ve koyulaşmaktadır. Şekil ve cesamet bakımından Negri cisimlerine çok benzemekte fakat diğer boyama metodlarında görüldüğü gibi, içerisinde granül görülmemektedir. Keza aynı preparatta sayılmıyacak kadar çok, gayret küçük ,parlak filizi floresans cisimcikleri görülmektedir. Bazı preparatlarda ise Negri cisimlerine tesadüf edilmediği halde az veya çok bu küçük kum gibi cisimcikler görülmektedir. Bunlarda teşhis için yeterli bulunmaktadır (21). Preparatın, konj. + EFB susp. damlatılan sağ tarafında ise grimsi yeşil veya mavimsi yeşil renkte boyanmış dokudan gayri bir şey görülmemektedir.

FA tekniğinde, bazı preparatlar da spesifik olmayan boyanmalar görülmekte, bilhassa çalışmaya yeni başlayanları şaşırtmaktadır, fakat bunlar parlaklık, şekil ve renk bakımından spesifik olanlardan kolaylıkla tefrik edilmektedir. Böyle hallerde preparatın sol tarafını sağ tarafı ile mukayese ederek şüphe giderilebilir.

SONUÇLAR

Üç teşhis metodu ile, mukayeseli olarak üzerinde çalışmış olduğumuz 809 adet marazi maddenin muayene sonuçları tabloda görülmektedir. Bunlardan 450 adedi fare inokülasyonu ile müsbet sonuç vermiş, 443 adedi FA tekniği ile müsbet sonuç vermiş, 374 adedinde ise Sellers metodu ile Negri cisimleri tesbit edilmiştir. Bu çalışmada fare inokülasyonunu esas olarak alırsak, Negrinin tesbiti, fare inokülasyonu ile ancak %83.1 mutabakat gösterdiği halde, FA tekniği %98.4 mutabakat göstermiştir. Ayrıca çok tefessüh etmiş olan 31 marazi maddeden Negri cisimleri aramak ve fare ino-

külasyonu yapmak mümkün olmadığı halde FA tekniği ile boyanarak 13 adedinde antijen tesbit edilmiştir. Bu marazi maddeleri diğer iki metodla işlemek mümkün olmadığı için tabloya alınmamıştır. Keza üç aylık bir köpeğin beyrinde Sellers metodu ile Negri benzeri cisimcikler görülmüş, fakat bunu FA tekniği ve fare inokülasyonu teyit etmemiştir. Yine tabloda görüldüğü üzere 3 kedi, 1 gelincik, ve bir domuz beyri FA tekniği ile müsbet reaksiyon verdiği halde, fare inokülasyonu ve Sellers boyası ile teyit edilememiştir.

Aşağıdaki tabloda her üç metodla yapılan muayene sonuçları görülmektedir.

Neviler	Muayene edilenler	Muayene sonuçları müsbet olanlar		
		Negri muayenesi	FA	Fare inok.
Köpek	461	293	330	336
Kedi	152	14	26	23
Siğır	79	47	55	57
Koyun	11	7	7	7
Merkep	9	4	6	7
Fare	15			
Sincap	32		2	2
Manda	7	1	1	1
Tavuk	7			
At	3			
Kurt	5	4	4	4
Tavşan	3			
Hamster	3			
Gelincik	1		1	
Domuz	1		1	
Keçi	2	1	2	2
Sansar	1	1	1	1
Tilki	2		1	1
Ayı	1			
Yarasa	1			
İnsan	13	2	6	9
Y e k ü n	809	374	443	450

TARTIŞMA

Kuduz teşhisinde virus izolasyonu en güvenilir bir metod olmakla beraber neticeyi almak uzun zamana ihtiyaç göstermekte ve ısırılan şahısları aşılama da tereddütlere yol açmaktadır. Yakın zamana kadar kuduzun erken teşhisi Negri'nin görülmesi ile müm-

küdü ancak, kuduz hayvanların, vasati olarak %15, istisnai hal-lerde %26, (16), bizim çalışmamıza göre ise %13.3 (13), adedinde Negri teşekkül etmemektedir. FA tekniği ise, erken teşhise yara-ması, virüsü, hattâ inaktiv ve ölü virüsü meydana çıkarması bakı-mından Sellers ve fare inokülasyonu metodlarından daha üstündür. FA tekniği ile bir marazi maddeye normal olarak 5-6 saat içinde teşhis konmaktadır. Yaptığımız mukayeseli denemede, preparatı asetonda 4 saat yerine 1-2 saat bırakmak veya alevde tesbit et-mek arasında, boyanmada herhangi bir fark müşahade etmedik. Böylece zaman daha da kısalmış olmaktadır.

FA tekniğinin muvaffak olmasında, yüksek titreli bir serum-dan elde edilen konjugat ve konjugat istihsalinde kullanılan flore-san boyanın kalitesi ve yetişmiş elemanın rolü çok büyüktür. Bazı fluorescein izothiocyanate proteinle iyi bir kojugasyon verdiği hal-de bazıları vermemektedir (21). Biz konjugat istihsalinde kullandı-ğımız iki ayrı firmanın FITC'dan aynı sonucu aldık.

Çalışmalarının başlangıcında FA tekniği hakkında şüpheye düşen laboratuvarlar yetişmiş eleman, iyi bir konjugat ve iyi bir boyama ile bu metodla virus izolasyonu arasında tam bir beraberlik elde etmektedirler. Bizde çalışmamızın başlangıcında bazı hatâlara düş-müş bulunuyoruz. Nitekim tabloda FA tekniği ile fare deneme-si arasında görülen 7 fark o zamanlara rastlamaktadır. Teste alış-tıktan ve hatâlarımızı tashih ettikten sonra iki test arasında %100 paralellik temin etmiş bulunmaktayız.

Kesif veya %50 gliserin veya herhangi bir antiseptik içinde gönderilen beyinlerden FA tekniği ile iyi sonuç alınmadı. Mc Queen ve arkadaşları (21) gliserin içinde muhafaza edilen 8 müsbet vak'anın ancak %75 ini müsbet olarak tesbit edebilmişlerdir. Keza Wilsnack (24) gliserinde veya formalinde saklamanın boyamayı bozduğunu kaydetmektedir. Buna mukabil az veya çok tefessüh eden marazi materyal FA tekniği ile boyanabilmekte ve antijenin tesbiti mümkün olmaktadır.

Bu araştırmada, Negri tesbiti, fare inokülasyonu ile %83.1 mutabakat gösterdiği halde, FA tekniği %98.4 mutabakat göster-miştir. Mc Queen (20) in araştırmasında FA ile virus izolasyonu paralel gitmiş, Negri tesbiti ise %90.5 mutabakat göstermiştir. Yi-ne Mc Queen ve arkadaşları (21) ikinci bir araştırmada, FA ile fare inokülasyonunu paralel bulmuşlar Negri muayenesi ise %98.3 nis-betinde fare inokülasyonuna uygunluk göstermiştir. Beauregard ve

arkadaşları (3) Goldwasser ve arkadaşları (12) yaptıkları araştırmada, FA tekniği ile fare inokülasyonu arasında pek az bir fark tesbit ettiklerini ve FA'nın Negri tesbitinden çok üstün olduğunu kaydetmişlerdir.

Konjugatı titre ederken ve günlük çalışmalarımızda dilüsyonları, daima normal ve enfekte fare beyni suspansiyonları ile hazırladık ve gayet iyi sonuç aldık. Goldwasser ve Kissling (11) ve Dean (9) beyin dokusu ile sulandırılarak kullanılan konjugat ile boyanmış preparatlarda aspesifik reaksiyonların ve bilhassa dokunun verdiği floresans'ın azaldığını kaydetmektedirler.

İyi bir ışık kaynağı, usulüne göre hazırlanan konjugat ve diğer lüzumlu maddeler ve yetişmiş eleman sayesinde FA tekniğinde karşılaşılan müşkilât kalkmakta ve bu metod kuduz teşhis laboratuvarları için ideal bir metod olmaktadır.

Ö Z E T

Bu mesaide, Floresan Antikor tekniği ile çalışmak için lüzumlu olan maddelerin istihalleri ve kuduzdan şüpheli hayvan ve insan beyinlerinin FA tekniği ile boyanma metodundan bahsedilmektedir.

Üç merkepten istihsal edilen kuduz antiserumları titre edilerek uygun titre verenlerden gamma globulin elde edilmiş, bu gamma globulin iki ayrı florescein izotiocyanate ile konjuge edilerek, normal beyaz farelerden hazırlanan beyin ve karaciğer doku pudraları ile absorbe edilmiştir. Absorbsiyonu müteakip titresi yapılmış ve sonraki boyamalarda bu titre kullanılmıştır.

Muhtelif cins hayvana, 13 adedi insana ait olmak üzere 809 adet marazi materyal floresan antikor tekniği, Sellers boyası ve fare inokülasyonu ile muayeneye tabi tutulmuştur.

Neticeler virus izolasyonu esas alınmak suretiyle değerlendirilmiştir. 809 marazi materyalin 450 adedi, virus izolasyonu, 443 adedi FA tekniği ile 374 adedi ise Sellers metodu ile müsbet sonuç vermiştir. Burada Negri cisimlerinin tesbiti fare inokülasyonu ile % 83.1 mutabakat gösterdiği hadle, FA tekniği %98.4 mutabakat göstermiştir.

Gliserin veya herhangi bir antiseptik içinde gönderilen marazi materyalin FA tekniği ile boyanmasında aspesifik reaksiyonların

çokluğu yanıltıcı sonuçlar vermektedir. Buna mukabil tefessühten dolayı diğer metodlarla muayeneye elverişli olmayan marazi materyal FA tekniği ile boyanabilmekte ve mükemmel neticeler alınmaktadır.

Mevcut araştırmalar ve bizim çalışmamızın sonucu olarak diyebiliriz ki FA tekniği yetişmiş eleman, uygun ışık kaynağı ve iyi hazırlanmış bir konjugat sayesinde kuduz teşhis laboratuvarları için ideal bir metoddur.

SUMMARY

The difficulty of the routine use of the FRA technique is the unavailability of commercially produced reagent. For this reason we started in producing conjugate, using three different lots of antisera and two different lots of fluorescein izothiocyanate, then preparation of tissue powders, sorption of serum globulins and titration of conjugate, also the procedure for staining rabies virus antigens with fluorescent labeled antibody in the brain of naturally infected animals is described. The usefulness of FRA test for routine diagnosis of rabies laboratory, particularly in the case of Negri - negative animals is emphasized.

The brain tissues of 809 specimen, including dogs, cats cows, buffalos, donkies, horses, sheep, goats, wolves, squirrels; mice, rabbits, hens, foxes, weasel, pig, hamster and 13 men were processed with fluorescent antibody. In addition to this test Sellers staining was carried out for Negri bodies and virus isolation studies were made on the brains.

Results were evaluated on the base of virus izolation test. Totally 450 specimen were found positives by virus isolation from the brains and 443 positives detected by FRA test, giving a 98.4 percent correlation. In contrast with this, we found 374 out of 450 positives or 83.1 percent Negri bodies were demonstrable.

If the brain tissues are preserved in glycerol - saline or in any other antiseptic, give aspecific reaction with FRA examination. On the other hand, this test gives satisfying result, even with decomposed specimens.

Although some authors reports FRA test is 100 percent in accordance with virus isolation, We could not get the same result. Because at the beginning we had not enough experience. But as

soon as our experience improved, we got nearly the same result with virus isolation.

According to our study and recent literatures, FRA test is an ideal method for rabies diagnosis. A good result depends on a specific light, well prepared reagents and experienced persons.

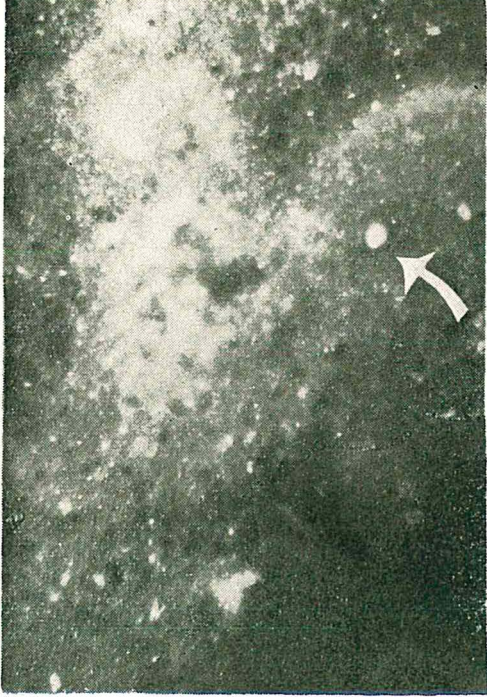
T E Ş E K K Ü R

Bu çalışmayı teşvik eden ve çalışmalar esnasında yardımlarını esirgemiyen Enstitü Müdürü Dr. Ahmet Özsoy'a, Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı elemanlarına ve İzmir'deki Tuslog 36. Müfreze mensuplarına teşekkürlerimizi arzederiz.

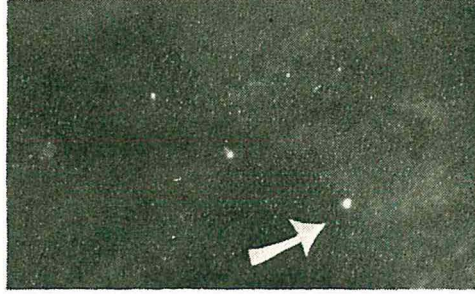
L İ T E R A T Ü R

- 1 — **Atanasio, P.** : Quantitative Assay and Potency Test of Antirabies Serum. Laboratory Techniques in Rabies., W.H.O. Monograph Series, No. 23, S. 167, Genova (1966).
- 2 — **Batty, I., Walker, P.D.** : The Use the Fluorescent Labelled Antibody Technique for the Detection and Differentiation of Bacterial Species., International Symp. of Immunol. Methods of Biol. Standardization, Royaumont 1965; Symp. Series Immunobiol. Standard., Vol. 4, S. 73-96, (Karger, Basel/New-York 1967).
- 3 — **Beauregard, M., Boulonger, P. and Webster, V.A.** : The Use of Fluorescent Antibody Staining in the Diagnosis of Rabies., *Canad. Jour. Comp. Med.*, 29, 141-147 (1965).
- 4 — **Carski, M.D., Wilsnack, R.E. Sikes, R.K.** : Pathogenesis of Rabies in Wildlife. II. Fluorescent Antibody Studies., *Amer. Jour. Vet. Res.*, 23, 1048-1051, (1962).
- 5 — **Cherry, W. B., et Al.** : Fluorescent Antibody Techniques, in the Diagnosis of Communicable Diseases., Bureau of State Services Communicable Disease Center. Atlanta, Georgia, (1960).
- 6 — **Coons, A.H., et Al.** : The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody., *J. Immunol.* 45, 159-170, (1942).
- 7 — **Coons, A.H., and Kaplan, M.H.** : Localization of Antigen in Tissue Cells. II. Improvements in a Methode for the Detection of Antigen by Means of Fluorescent Antibody., *Jour. Exp. Med.*, 91, 1-13, (1950).
- 8 — **Coons, A.H., et Al.** : Localization of Antigen in Tissue Cells. IV. Antigen of Rickettsiae and Mumps Virus., *Jour. Exp. Med.*, 91, 31-37, (1950).
- 9 — **Dean, D.J.** : The Fluorescent Antibody Test., Laboratory Techniques in Rabies, World Health Organization, Monograph Series No. 23 Geneva, (1966).
- 10 — **Etchebarne, M., Bernal, P.G., Leyton, G.R.** : Purification of Rabies Antibodies in Hors Serum and Diagnostic Importance of the Fluorescent Antibody Technique., *Jour. Immunol.*, 84, 6-10, (1960).

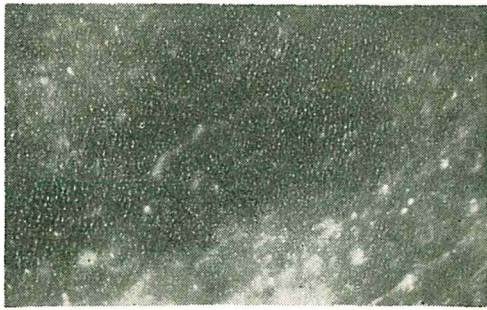
- 11 — **Goldwasser, R. A., and Kissling, R. E.** : Fluorescent Antibody Staining of Street and Fixed Rabies Virus Antigens., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 98, 219-223, (1958).
- 12 — **Goldwasser, R. A., Kissling, R. E., Carski, T. R.** : Fluorescent antibody Staining of Rabies Antigens in the Salivary Glands of Rabid Animals., Reprinted From Bull. Wld Hlth Org., 20, 579-588 (1959).
- 13 — **Güley, M.** : Kuduz Laboratuvarının Günlük Çalışmaları., Etlik Vet. Bakt. Enst. Der., 1, 38-42, (1963).
- 14 — **Gülmezoğlu, E.** : Çocuk İshallerinde Enteropathogenic E. Coli İdentifikasyonunda Floresan Antikor Tekniğinin Kullanılması., Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, Cilt, 6 (4), 206, (1963).
- 15 — **Gülmezoğlu, E.** : Floresan Antikor Tekniği., Türk Hijyen ve Tecrübi Biyoloji Dergisi, Cilt XXIV, S. 2, 181-197, (1964).
- 16 — **Johnson, H. N., Edited by Rivers, T. M.** : Viral and Rickettsial Infections of Man., S. 267-299, Lippincott Co., Philadelphia, (1952).
- 17 — **Kaplan, M. H., Coons, A. H., and Dean, H. W.** : Localization of Antigen in Tissue Cells. III. Cellular Distribution of Pneumococcal Polysaccarides Types II and III in the Mousa., Jour. Exp. Med., 91, 15-29, (1950).
- 18 — **Lepine, P., Atanasiu, P.** : Production of Therapeutic Antisabies Serum., laboratory tehniques in Rabies World Health Organization, Monograph Series No. 23, Geneva, (1966).
- 19 — **Marshall, J. D., Eveland, W. C., and Smith, C. W.** : Superiority of FIIC (Riggs) for Fluorescent - Antibody Technic With a Modifica tion of Its Application., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 98, 898-900, (1958).
- 20 — **Mc Queen, J. L.** : Rabies Diagnosis Special Application of Fluorescent Antibody Techniques., Reprinted from Proceeding United States Livestock Sanitary Association., (1959).
- 21 — **Mc Queen, J. L., Levis, A. L., and Schneider, N. J.** : Rabies Diagnosis by Fluorescent Antibody. I. Its Evaluation a Public Health Laboratory., Amer. Jour. Publ. Health, 50, 1743-1752, (1960).
- 22 — **Riggs, J. L., et Al.** : Izothiocyanate Compounds as Fluorescent Labeling Agents for Immune Serum., Amer. Jour. Path., 34, 1081, (1958).
- 23 — **Sikes, R. K.** : Avaluation of Anti-Rabies Conjugates., Reprint, Asli bulunamadı.
- 24 — **Wilsnack, R. E.,** : The Fluorescent Antibody Diagnosis of Rabies, Reprinted from Jour. Amer. Vet. Med. Assoc., Vol. 137, No. 5, 1, (1960).



ŞEKİL : 1
Tabii olarak enfekte köpek beyninden
büyütme x 300 (Orig.)



ŞEKİL : 2
Tabii olarak enfekte kedi beyninden
büyütme x 300 (Orig.)



ŞEKİL : 3
CVS ile enfekte edilmiş Fare beyninden
büyütme x 300 (Orig.)



ŞEKİL : 4
Tabii olarak enfekte sığır beyninden
büyütme x 300 (Orig.)