

T. C.

Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı
Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha
Enstitüsü

TÜRK
HİJİYEN ve TECRÜBÎ
BİYOLOJİ DERGİSİ

Cilt : XXIV — Sayı : 2
(1964)

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY



REVUE TURQUE D'HYGIENE ET DE BIOLOGIE EXPERIMENTALE



TÜRKISCHE ZEITSCHRIFT FÜR HYGIENE UND EXPERIMENTELLE BIOLOGIE

TÜRK. HİJ. TEC. BIYOL. DERG.

Vol : XXIV — No. 2

Ankara — 1964

**ISSUED BY
PUBLIÉ PAR
HERAUSGEGEBEN VOM**

REFİK SAYDAM MERKEZ HIFZISSIHHA ENSTITÜSÜ (ANKARA)

Senede üç defa çıkar.

The Bulletin is issued three times a year.

Revue paraissent trois fois par an.

Die Zeitschrift erscheint dreimal Jaerlich.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

- 1 — **Dr. Yaşar HEPERKAN - Dr. Azmi ARI**
- Türkiye'de ARBOR viruları üzerinde bir araştırma ... 113
- A Study on the presence of ARBOR - VIRUS infection
in Turkey 118
- 2 — **Bahriye ÖZSÖZ**
- Methylene mavisi ve Gentian violet'nin birbiri yanında
kâğıt kromatografisi ile separasyonu ve kantitatif
tâyini 119
- Separation and quantitative determination of Gentian
violet and Methylene blue by paper chromatography 128
- 3 — **Dr. Kemal ÖZKAN - Dr. Mehmet TÜRKVAN**
- Thymol bulanıklık testi ünite değerlerinde görülen
karışıklıklar 130
- The Disorders, as unites, in expressing of the results
of Thymol turbidity test 133
- 4 — **Dr. Azmi ARI**
- Kuduzda aşıyla tedavi şemaları ve bu hususta bir
çalışma 136
- Vaccination schedules in Rabies and a study on this
subject 144
- 5 — **Turgut TULGA**
- Türkiye akrepleri ve Türkiye'de hazırlanmış Anti An-
droctonus crassicauda akrep serumunun paraspesifik
etkisi 146

	Scorpions found in Turkey and Paraspecific action of an Antivenin produced with the venom of the species <i>Androctonus crassicauda</i>	153
6 —	Dr. Azmi ARI	
	1964 kış ve baharında Türkiye'de ağızdan verilen çocuk felci aşı kampanyası ve neticeleri	156
	Mass oral Polio vaccination campaign in Turkey, during 1964 Winter and Spring	168
7 —	Dr. Vedat ONAN	
	Kemik - Mafsal Tüberküloz'unda Antibiyotik'lere rezistans	174
	The frequency of drug - resistant Tubercle bacilli in bone and joint Tuberculosis	180
8 —	Dr. Ekrem GÜLMEZOĞLU	
	Floresan antikor tekniği	181
9 —	Dr. Necmettin Akyay	
	Kolera'da bakteriyolojik teşhis, tedavi ve korunma alanlarında yeni gelişmeler	198
10 —	Dr. Elhan ÖZLÜARDA	
	Dünya Sağlık Teşkilatı bölgelerarası kuduz semineri intibaları. 8 - 20 Haziran 1964, Moskova	212

TÜRKİYE'DE ARBOR VİRUSLARI ÜZERİNDE BİR ARAŞTIRMA

Dr. Yaşar HEPERKAN (1)

Dr. Azmi ARI (2)

GİRİŞ :

Memleketimizde bu güne kadar vektörlerle intikal eden virütlük ansefalitlerle alâkalı ateşli hastalıkların mevcudiyeti, yayılış sahası ve intikal tarzları hakkında sarıh bir bilgimiz yoktu. Bunun sebepleri arasında, bu çeşit hastalıkların «ihbarı mecburi bulaşıcı hastalıklar» listesinde bulunmayışını ve yine yakın zamana kadar bu hususta araştırma yapacak kapasitede virus lâboratuvarlarımızın mevcut olmayışını zikredebiliriz. Arthropod'larla geçen arbor (arthropod - born) virüsleri üzerinde araştırmalar yapmakta olan John Hopkins Üniversitesi, Hijyen ve Halk Sağlığı Fakültesi, Epidemiyoloji Departmanı, Lâboratuvarlar Direktörü Dr. Winston H. Price'ın, Türkiye'de mevcut olması muhtemel bu nevi hastalıkların ve bilhassa Batı Nil hummasının (West Nile Fever, WN) yayılış sahalarının tesbiti için Ankara Hıfzıssıhha Okulu ile müsterek bir araştırma yapılması teklifi muvafık görülerek araştırmalara başlandı.

Metod ve materyal :

Tesbit edilen plâna göre, araştırma yapılmasına lüzum görülen Erzurum, İzmir, Adana ve Diyarbakır illerinde oturan ve herhangi bir sebeple sair bölgelere gitmemiş olan yerli halktan, beş yaşından küçük, 6 - 15 yaşında ve 15 yaşından büyük üç yaş gurubu şahıstan ve her yaş gurubundan ortalama 65 şer kan nümunesi alınarak, serumları ayrıldıktan sonra serolojik test yapılmak üzere en seri vasıta ile adı geçen lâboratuvara gönderilecekti.

Bunun için sırasıyla Erzurum, İzmir, Diyarbakır ve Adana illerine ve bu illerin bazı ilçe ve köylerine gidilerek yukarıda tarif edilen evsaftaki şahıslardan takriben 10 cc. kan nümunesi alındı. Beş yaşından küçük çocukların kanları: Çocuk kliniklerinde yatan ve muhtelif polikliniklere (hastahane, ana çocuk sağlığı, belediye dispanserleri) müracaat eden çocuklarla Çocuk yuvalarında bulunan çocuklardan ; 6 - 15 yaş gurubundakilerin: Okullardaki yerli öğrencilerden ; 15 yaşından büyüklerin ise: Polikliniğe müracaat eden veya hastahanelerde yatan yerli şahıslardan temin edilmiştir.

(1) Ankara Hıfzıssıhha Okulu, Sağlık Etüdüleri Şubesi Müdürü

(2) Refik Saydam M.H. Enstitüsü, Viroloji ve Virus Aşları Şb. Md.

Alınan kanların serumları usulü **veçhile** ayrılmış ve steril ampullere konarak termoslar içinde **Ankara**'ya ve oradan da yine soğukta muhafaza edilerek **Baltimore**'a, uçakla sevk edilmiştir.

Adı geçen lâboratuvarlarda **WN virusuna** karşı Hemagglutination İnhibition (HI), testi yapılarak **neticeler** bir rapor halinde bildirilmiştir.

Sonuçlar ve Tartışma :

Dr. W. H. Price'ın göndermiş olduğu rapora nazaran **WN viruslarına** karşı yapılan **HI testleri** neticeleri tabloda gösterilmiştir. Erzurum çevresinden alınan **188 serumun** ancak ikisinde (**6-15 yaş gurubu**) müsbet netice alındığından bu ile ait neticeler tabloda gösterilmemiştir.

Tablonun tetkikinde :

1 — **Batı Nil** veya buna yakın karabeti olan bir virusla husule gelen bir hastalığın memleketimizde mevcut olduğu, bazı illerimizde (**Adana, Diyarbakır**) hastalığa tutulma nisbetinin çok yüksek bulunduğu, yüzde nisbetlerinin tetkikinden anlaşılmaktadır. Her ne kadar teste tâbi tutulan şahısların ekseriyetini polikliniklere müracaat eden şahıslar teşkil ediyorsa da bunların müracaat sebebi ile **Batı Nil Humması**nın bir alâkası yoktur. Bulunan nisbetlerin bölgeye teşmili düşünülemezse de bunun **Diyarbakırda** genel olarak **40.6 %** ve **15 yaşundan büyük kadınlarda 70 %**, **Adana'da** genel olarak **57 %** ve **15 yaşundan büyük erkeklerde 79 %** olması mânidardır. Kan alınan şahısların seçiminde bunların bilhassa yerli halktan olmalarına azami dikkat edildiğinden hastalığın buralarda **andemik** olarak mevcut olduğuna hükmedebiliriz.

2 — Tablodaki nisbetler, erkeklerin kadınlara nazaran daha çok hastalığa tutuldukları hissini uyandırıyor da yapılan **signifikant testleri**, her yaş gurubunda, her iki cins arasında bir fark olmadığını, neticelerin tesadüfen bu şekilde **tezahür** ettiğini göstermektedir.

3 — Hastalığa tutulma nisbetinin, üç ilde ve her iki cinste yaş ilerledikçe arttığı müşahade edilmektedir. Bu durum bize **çocukluk çağlarının**, hastalığa karşı, yetişkinlere nazaran daha **hassas** olduğunu ve yaş ilerledikçe **hassasiyetin azaldığını** göstermektedir. Bu neticeler, hastalığın **andemik** olduğu **Mısır**'ın bazı bölgelerinde ve

Bata Nil viruslerine karşı serumlarda yapılan HI testi neticeleri

İlin adı Name of province	Yaş gurupları seneeye göbre Age group (in years)	ERKEK - MALE			KADIN-FEMALE			Toplam - Total		
		Test sayısı No. of tested	Müşbet reaksiyon sayısı No. of positives	Müşbet reaksiyon % Positive %	Test sayısı No. of tested	Müşbet reaksiyon sayısı No. of positives	Müşbet reaksiyon % Positive %	Test sayısı No. of tested	Müşbet reaksiyon sayısı No. of positives	Müşbet reaksiyon % Positive %
İzmir	1-5	27	1	3,7	32	—	—	59	1	1,7
	6-15	25	3	12	39	3	7,6	64	6	9,1
	16+	45	5	11	17	—	—	62	5	8
Toplam - Total		97	9	9,2	88	3	3,4	185	12	6,4
Diyarbakır	1-5	33	4	12	20	2	10	53	6	11,2
	6-15	40	17	42,5	29	16	55	69	33	47,7
	16+	38	21	55,2	37	26	70,2	75	47	62,7
Toplam - Total		111	42	38	86	44	51	197	86	40,6
Adana	1-5	25	6	24	26	5	23	51	12	23,5
	6-15	39	27	69,2	31	20	64,5	70	47	69
	16+	38	30	78,9	18	12	66	56	42	75
Toplam - Total		102	63	61,7	75	38	50,5	177	101	57
Genel toplam Grand Total	1-5	85	11	13	78	8	10,3	163	19	30
	6-15	104	47	45	99	39	39,4	203	86	42,4
	16+	121	56	46,3	72	38	53	193	94	48,7
Toplam - Total		310	114	37	249	85	34,7	559	199	35,6

devri epidemiler yaptığı İsrail'deki araştırmalara uymaktadır (5). Fihakika Mısır'da, hastalığın çocuklar arasında müntesir olduğu. İsrail'de ise çoğunlukla çocukların yakalandığı ve hastalığın her yaş gurubunu alâkadar ettiği belirtilmektedir. (Taylor ve Melinck 5).

4 — Malûm olduğu üzere WN virusu Arbor viruslarının B gurubunda olup, bu gurupta bulunan St. Louis, Japanese B viruslarıyla sıkı münasebeti vardır (2). Bu bakımdan gönderilen Serumlarda, tam bir ayırma yapmak için, bu viruslara karşı nötralizasyon testi yapılacaktır. Aynı zamanda memleketimizde mevcut olması muhtemel Russian Spring Summer (Rus ilkbahar yaz) Tip 21 ve Dengue 1 virusları da araştırılacaktır.

5 — Hastalık sivrisineklerle (Culex) intikal etmektedir. Kaynak vahşi kuşlardır. Virus kuşlar arasında C. univittatus, insanlara da C. molestus ve C. pipiens vasıtasıyla geçtiğine dair deliller mevcuttur (Tahori 5). Bu sivrisineklerden virus tecridi mümkün olmuştur. Memleketimizde bu hastalığın mevcudiyetine kat'i karar verebilmemiz için sivrisineklerden virus tecridine lüzum vardır. Bu husus Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü viroloji Şubesi ile işbirliği yapılarak Adana çevresinden toplanarak Culex türlerinden virus tecridi suretiyle temin edilecektir.

6 — Hastalık âni olarak başlayan ateş, adale ağrıları, döküntü ve adenopati gibi klinik arazla tezahür etmektedir (1 ve 3). Memleketimizde «ihbarı mecburi hastalıklar» arasında yer almadığından bu güne kadar klinik olarak tesbit edilmemiştir. Vakaların klinik olarak tesbiti ve hastaların kanlarından virus tecridi mümkün olursa durum daha iyi belli olacaktır. Bu bakımdan bu nevi hastalıkların da ihbarının mecburi olmasında faide mülâhaza etmekteyiz.

7 — Hastalığın yayılışı hakkında daha fazla bilgi toplamak ve mukayese imkânı elde etmek gayesiyle Kars (bilhassa Rus ilkbahar yaz) Sivas ve Kastamonu çevrelerinde de araştırmalara devam edilecektir.

Hülâsa :

Memleketimizin Erzurum, İzmir, Diyarbakır ve Adana çevrelerinde Batı Nil virusları üzerinde yapılan ve tafsilâtı yukarıda verilen araştırmalara nazaran, bu virusla veya buna yakın karabeti olan bir virusla husule gelen hastalığın yurdumuzda mevcut olduğu an-

laşılmaktadır. Batı Nil virusuna karşı yapılan HI testi Adana'da 57 % , Diyarbakır'da 40 % müsbet netice vermiştir. Buna göre bazı gevrelerde hastalığa tutulma nisbetinin (attack rate) yüksek olduğu görülmektedir. Hastalığın mevcudiyetine kesin olarak hükmedebilmek için sivrisineklerden ve klinik olarak tesbit edilebilen hastaların kanundan virus tecridine lüzum vardır. Memleketimizde hastalık «ihbarı mecburi bulaşıcı hastalıklar» listesinde bulunmadığından bu güne kadar klinik olarak görüldüğüne dair bir delil yoktur. Bu tip hastalıkların da bu listede yer almasının faydeli olacağı kanaatindeyiz.

L I T E R A T Ü R

1 — H.W. PRICE,

Lee R.W., Gunkel W.F. and O'Leary W. The virulence of WN virus and their application to a group B Arbo virus vaccine.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene May 1961.

2 — A.B. ARI,

İnsanda Hastalık Amil Oldukları Tesbit Edilen Sayıları 85 e yakın yeni viruslar. Türk Hij. ve Tec. Biolojî Dergisi 1960, XX/1 - 167

3 — M. AKYOL,

İnsanda Bulaşıcı Hastalıkların Kontrolü, 1963

4 — E. ONUL,

Enfeksiyon Hastalıkları, 1962

5 — T.M. RIVERS ve F.L. HORSFALL,

Viral and Rickettsial Infections, 1959

A STUDY ON THE PRESENCE OF ARBOR - VIRUS INFECTION IN TURKEY

Dr. Y. Heperkan

Dr. A. An MPH

Summary :

A serological survey on arbor virus has been carried out by School of Hygiene of Ankara, with the proposal of John Hopkin's University, School of Hygiene and Public Health, Department of Epidemiology, in Erzurum, İzmir, Diyarbakır and Adana. We collected sera from the people, under 5, 6 to 15 and over 15 years, age groups who were inhabitent in those regions and were not departed anywhere for any purposes. Collected sera were dispatched to Dr. Winston H. Price, Director of Laboratories of that Department, by air fright, in cold conditions. The results of hemagglutination inhibition test against West Nile virus is shown on the table. The evidence indicates that WN virus or some closely related virus diseases are present in Turkey and in some areas of this country. Further tests will be carried out to get more accurate information by neutralization tests. We are going, too, to collect mosquitoes from Adana where virus prevalence is likely high. A collaborative study is underway for the virus isolation.

METHYLENE MAVİSİ VE GENTIAN VIOLET'nin BİRBİRİ YANINDA KÂĞIT KROMATOGRAFİSİ İLE SEPARASYONU VE KANTİTATİF TÂYİNİ

Kımyager, Bahriye ÖZSÖZ

Refik Saydam Merkez Hıfzassıhha Enstitüsü

İlaç Kontrol Şubesi Mütchassısı

Klâsik antiseptiklerden olan Methylene mavisi ve Gentian violet'nin birbiri yanında kantitatif tâyİNinde, mevcut metodların (1,2,3) birbirine karıştırıcı etkisi olması, bundan başka değişik farmasötiklere uygulanamaması sebebiyle, yeni bir metod arama zorunluğunu karşısında kalınmıştır.

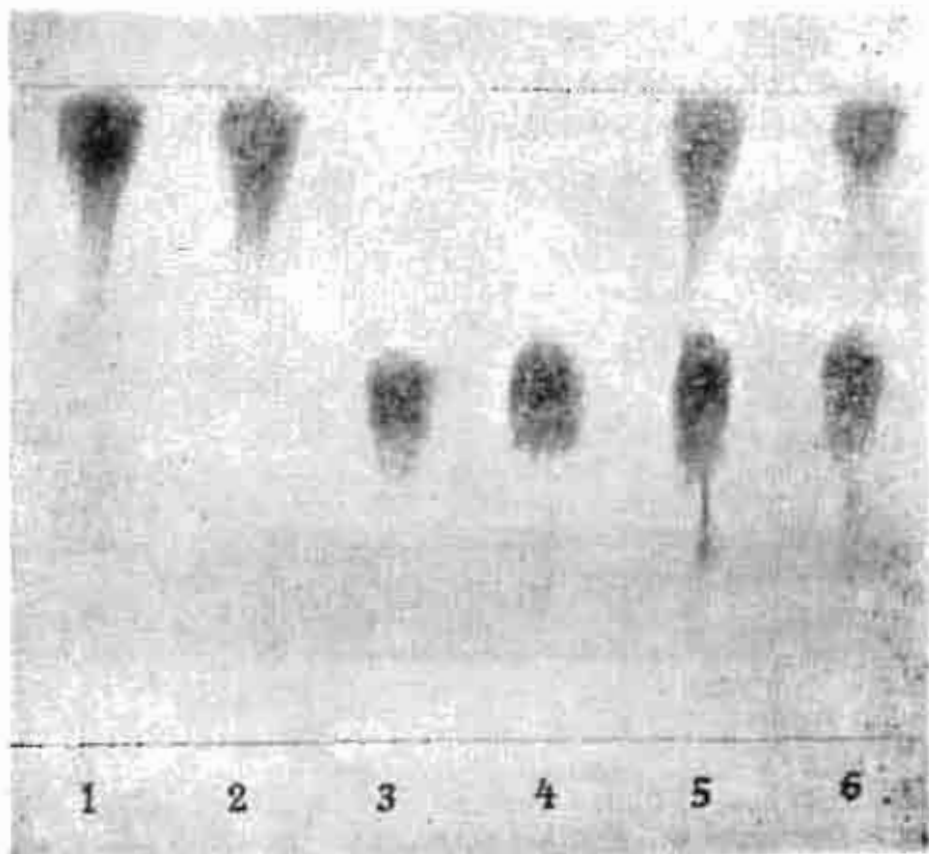
Boyaların separasyonunda kullanılan metod (4) daha basitleştirilerek uygulanmış, ayrılan boya lekeleri methanol ile elüe edilerek ve visible spektralarından yararlanılarak ayrı ayrı kantitatif tâyİNleri yapılmıştır.

Pentamethyl pararosanilin ile hexamethyl pararosanilin karışımı olan Gentian violet ile, bunun kristallendirilerek diğer methyl rosanilin'lerden ayrılmış ve sadece hexamethyl pararosanilin şekli olan Crystal violet renk tonlarının farklı olması sebebiyle idantîfiye edilebilmiştir.

Gentian violet lekesi daha açık tonda ve lekenin alt kısmında penbeye kaçan, ayrılmadan yürüyen bir kısım müşahede edilmiştir.

Crystal violet lekesinin daha koyu renk ve homojen olduğu görülmüştür. Lâboratuvarımıza kontrol için gelen preparatların hemen hepsi gentian violet ile hazırlanmış olduğundan, biz sadece gentian violet'yi dikkate alarak çalışmalarımızı bununla yapmış bulunuyoruz.

Crystal violet'ye, farklı bir Rf değeri bulunup bulunmamasını tetkik için müşahedelerimizde yer verilmiştir. (Şekil 1)



Şekil (1)

Fig. (1)

- 1 — Crystal Violet
- 2 — Gentian Violet
- 3 — Methylene Blue
- 4 — Methylene Blue
- 5 — Methylene Blue + Gentian Violet
- 6 — Methylene Blue + Gentian Violet

Methylene mavisi ile Gentian violet'nin birbirinden çok farklı Rf değerleri sayesinde iyi bir separasyon başarılmış, kantitatif tâyinde kesin sonuçlar alınmıştır. Metodun yürüyüşünde ısı derecesinin

etkisi olduğu görülmüş, 25 C° ı geçen suhunette solvent sisteminin dengesi bozulduğundan lekelerin yayılması sebebiyle tâyin güçleşmiştir. Oldukça kolay ve basit bir teknikle bu kombinasyonlarda tâyini yapılarak mevcut güçlük kaldırılmıştır.

Materyel ve Metod

Materyel :

1. Whatman kâğıdı, No. 1
2. Methylene mavisi, Crystal violet, Gentian, violet, miyar saflığında,
3. N. Butanol, Methyl alcohol, alkol, miyar saflığında,
4. 20 X 14.5 cm. büyüklüğünde cam kavanoz. cam plâk kapağı ile,
5. Mikro pipet, 20 lambda'lık (0,020 CC.)
6. Spektrofotometre, DU modeli,
7. Corex cell, 1 cm.,

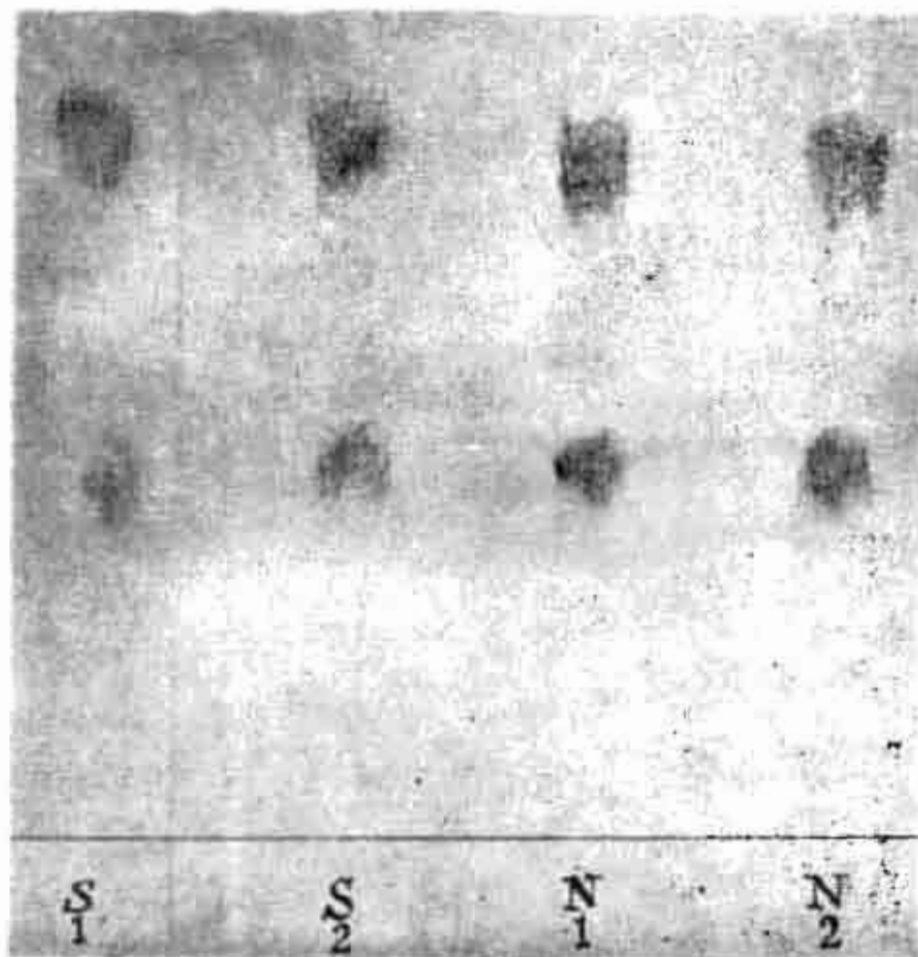
Metod :

N. Butanol : Alkol 95 % : distile su, 25:25:25 oranındaki karışımı hazırlanarak (tek faz) kromatografi tankına konur. Tank'ın kapağı kapatılır ve solvent buharı ile doyması için 3-4 saat kendi haline bırakılır.

Whatman No. 1 kâğıdı 18,5 cm. uzunluğunda, 16 cm. genişliğinde kesilerek 2,5 cm. mesafeden kurşun kalemle çizilir. Boyaların tatbik edileceği yerler işaretlenir, sonra kâğıt 4 cm. mesafeden dâima iç tarafa olmak üzere yukarıdan aşağıya doğru üç defa katlanır. Bu katlama kâğıdın tankta oturmasını sağlar. Bu tertibat yapıldıktan sonra, kâğıt kuru olduğu için ayrıca iplikle tutturmaya veya iğnelemeye lüzum yoktur.

Bizim çalıştığımız nünuneler, Methylene mavisi ile Gentian violet'i eşit miktarda ihtiva ettiğinden, standart solüsyonlar bu iki maddenin eşit oranda karışımı ile yapılmış ve su ile herbiri bakımından 1500 microgram/cc. sinde olmak üzere seyreltilmiştir. Nünunenin bu boyları değişik konsantrasyon'da ihtiva ettiği hallerde, nünunedeki oran dahilinde karıştırılmış standart'lar hazırlanmalıdır.

Hazırlanmış kâğıt üzerine, işaretlenmiş yerlere mukayeseli iki ayrı tâyin yapabilmek amacı ile standart solüsyondan (cc. sinde 1500 microgram methylene mavisi + 1500 microgram Gentian violet bulunan) bir mikro pipetle (0.02 cc., herbirinden 30 microgram) 20 lambda olmak üzere ayrı iki yere tatbik edilir.



Seldi (3)

Fig. (2)

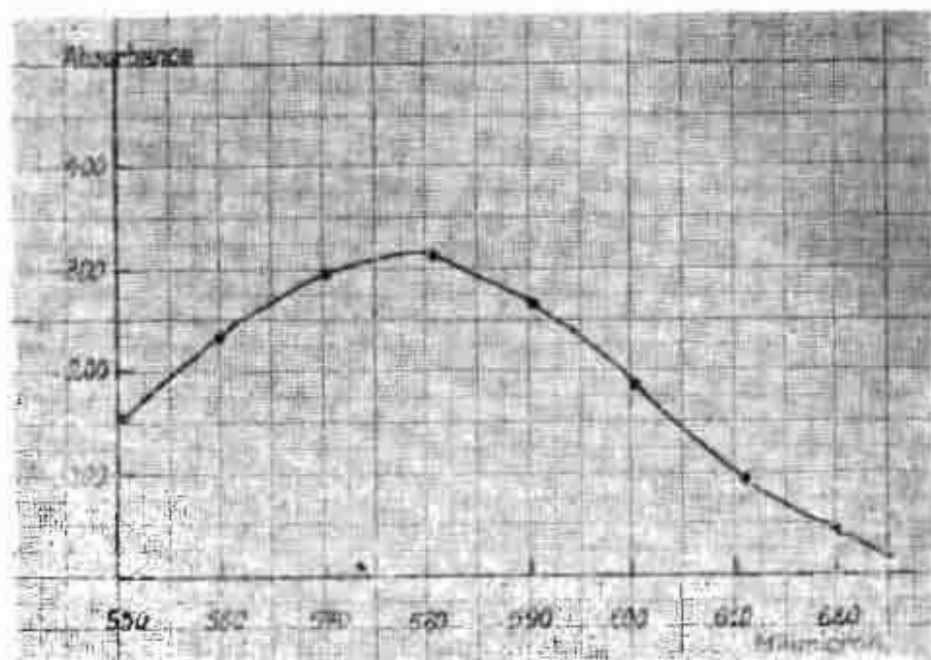
S₁, S₂ : 30 microgram Methylene Blue + 30 microgram Gentian Violet/0.02 cc. de ihtiva edecek şekilde hazırlanmış standart solüsyon'la yapılan ayrı iki tatbikten ayrılan lekeler,

N₁, N₂ : Aynı konsantrasyon'a seyreltilmiş numune solüsyon'dan 0.02 cc. ayrı iki tatbikten ayrılan lekeler,

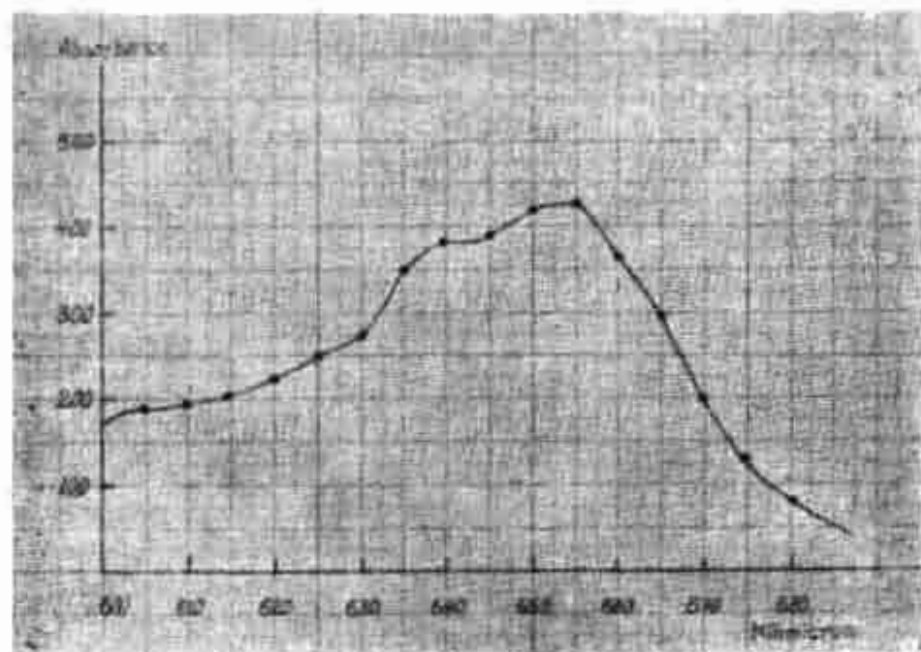
Aynı konsantrasyon'a su ile seyreltilmiş nümune solüsyondan yine iki ayrı yere 20 lambda'lık miktarlar tatbik edilir. Kâğıt havada kurumaya terk edilir, lekelerin iyice kuruması, separasyon'un tam olmasını sağladığından bu hususa dikkat edilmelidir. Kâğıt solvent buharı ile doymuş olan tank'a dikkatle konularak kapağı derhal kapatılır. Lekelerin birbirinden ayrılması ve solvent'in kâğıdın üst kenarına 1,5 cm. mesafeye gelmesi için gereken zaman (pasaj zamanı) 3 - 3,5 saat kadardır. Kâğıdın üzerinde yürüyen lekelerin separasyon'u tamamlandıktan sonra, kromatogram tanktan çıkartılarak havada kurumaya terk edilir. Solvent'in kâğıt üzerinden tamamen uçması için beklenir (şekil 2).

Standart lekeler S₁ ve S₂, numuneler de N₁, N₂ olarak işaretlenir. S₁ in methylene mavisine S₁, Gentian violet'sine yine S₁ işareti konmalıdır. Ayrılan boyaların farklı renkte olması karışıklığa meydan vermez, sadece S₁ tatbikatından ayrılan lekeler S₂ lekeleri ile karıştırılmamalıdır, zira S₁ ve S₂ den elde edilen sonuçların mukayesesi metodun ve çalışmanın emniyetini göstereceğinden bu hususa dikkat edilmelidir. Aynı itina N₁, N₂ için de yapılmalıdır. Her leke, eğer yayılmış kısımları da varsa dâhil edilerek, makasla ayrı ayrı kesilerek çıkartılır. Takriben 3 mm. genişliğinde parçacıklara ayrılarak zayıf 10 cc. lik cam kapaklı balonlara konur. Balonların üzerine ait olduğu lekenin işareti yazılır. Bütün balonlara 10 cc. methanol katılır, yavaş bir hareketle çalkalamaya başlanır. Çalkalama esnasında balonların kapağı açılmamalıdır. Mağnet'le karıştırma kâğıtları parçalayarak bulanıklık yaptığından, bu usul uygulanmamalıdır. Balonların içindeki kâğıtların renksiz hale gelmesi yaklaşık olarak 30 dakika kadar sürmektedir. Balonların içindeki kâğıtların dibe çökmesi için beklenir.

Elüe edilen solüsyon'lar dikkatle aktarılarak spektrofotometre'nin celle'rine alınır. Gentian violet, 580 milimicron'da, Methylene mavisini ise 655 milimicron'da maksima absorpsiyon gösterdiklerinden, şekil (3), (4), gentian violet solüsyon'ları 580 milimicron'da, methylene mavisini solüsyonları da 655 milimicron'da olmak üzere methanol'a karşı absorbans'ları tâyin edilir. Ölçülen absorbans'lar, standart absorbans'ları ile ayrı ayrı orantı usulü ile hesaplanarak konsantrasyon'a geçilir. Deneyde gereken itina yapıldığı takdirde yakın sonuçlar elde edileceğinden, bulunan rakamların ortalaması alınmalıdır.



Sekel (3)
Fig. (3)



Sekel (4)
Fig. (4)

Hesabı :

$$\frac{A_n \times C \times D \times T}{A_s \times B} = \text{mg. Gentian violet veya Methylene mavisi} / \text{Alınan numunede}$$

A_n — Numunenin absorban'sın. A_s — Standard absorban's.
 C — Standard konsantrasyonu, D — Dilisyon faktörü, T — Alınan nümune miktarı mg., B — kâğıda tatbik edilen miktar/mg.

0.02 cc. lik (30 microgram Gentian Violet 30 microgram Methylene Blue ihtiva eden solüsyon) üç ayrı tatbikatla yapılan kromatografik separasyonu'da ayrılan Gentian Violet lekelerinden herbirinin 10 cc. Methanol ile elue edilmesiyle hazırlanmış solüsyon'ların (3 microgram/cc. de) (G., G., G.) 550 - 620 millimicron'daki absorban's'ları.

Tablo I

Millimicron	Absorbance		
	G.	G.	G.
550	.260	.265	.267
560	.281	.287	.281
570	.300	.306	.300
580	.305	.311	.305
582	.303	.309	.303
584	.296	.302	.298
586	.290	.294	.292
588	.280	.285	.283
590	.265	.271	.267
592	.250	.255	.252
594	.241	.245	.243
596	.220	.224	.222
598	.202	.205	.203
600	.188	.188	.187
610	.098	.100	.097
620	.046	.048	.047

Tablo II

0.02 cc. lik (30 microgram Methylen mavisi 30 microgram Gentian Violet ihtiva eden solüsyon) üç ayrı tathikatla yapılan kromatografik separasyon'da ayrılan Methylene mavisi lekelerinden herbirinin 10 cc. Methanol ile elue edilmesi ile hazırlanmış solüsyon'ların (3 microgram/cc. de) (M₁, M₂, M₃) 600 - 680 millimicron'daki absorpsiyonları.

Millimicron	Absorbance		
	M ₁	M ₂	M ₃
600	.170	.172	.170
605	.179	.181	.180
610	.192	.193	.192
615	.201	.202	.202
620	.221	.222	.221
625	.245	.246	.245
630	.271	.273	.272
635	.347	.348	.347
640	.380	.381	.380
645	.385	.385	.385
650	.415	.415	.415
655	.420	.420	.420
660	.370	.370	.370
665	.297	.297	.297
670	.197	.197	.197
675	.127	.127	.127
680	.082	.082	.082

Sonuç ve tartışma :

1. Bu deneylerde, lâboratuvarımızda tespit edilen Rf değerleri methylene mavisi için 0.60 dır. Gentian violet, solvent'in yürüdüğü yere kadar yürüdüğünden Rf değeri 1 dir.

2. Bu solvent sistemi ile kolayca ayrılan lekelerin elüe edilmesinde en uygun solvent'in methanol olduğu görülmüştür.

3. cc. sinde 1,5 - 3 microgram bulunan methanolik solüsyonlarla yapılan tâyinlerde iyi sonuçlar alınmıştır.

4. Methanolik solüsyonların 24 saat sonra dâhi stabil olduğu görülmüştür.

5. Alkol, alkol - su karışımları, distile su, lekeleri elüe etmek için denenmiş, kâğıtların parçalanarak bulanıklığa sebep olduğu, methylene mavisi'nin tam erime yapmadığı tespit edilmiştir.

6. Tablo (1) de metod kısmında anlatılan şekilde kâğıda yapılan üç ayrı tatbikatın separasyonundan elde edilen gentian violet lekelerinin 550 - 620 milimicron'da okunan absorbans'ları, tablo (2) de bu kromatogram'ın, methylene mavisi lekelerinin aynı şartlarda hazırlanmış solüsyonlarının 600 - 680 milimicron'daki absorbans'ları gösterilmiştir.

7. Terkibinde bu boyaları ihtiva eden solüsyon ve tabletler'de uyguladığımız metod ile emin sonuçlar alınmıştır.

SEPARATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF GENTIAN VIOLET AND METHYLENE BLUE BY PAPER CHROMATOGRAPHY

Bahriye ÖZSÖZ, *Chemist*

Refik Saydam Central Institute of Hygiene

Section of Drug Control - Ankara

In this paper a method is described which permits the simultaneous separation and quantitative determination of Gentian Violet and Methylene Blue in medicinal preparations.

The separation is made by ascending paper chromatography. For further identification, and at the same time quantitative determination, the spots are eluted and the absorption of the eluates are measured spectrophotometrically.

Method :

Reagents and Apparatus :

(a) Solvent system: N - Butanol, Ethyl Alcohol and water in equal parts by volume (25:25:25), reagent grade.

(b) Methylene Blue, Crystal Violet, Gentian Violet, reagent grade.

(c) Filter Paper — Whatman No: 1

(d) Spectrophotometer, Beckman Model DU.

(e) Corex Cell, 1 cm.

(f) Chromatography jar, round, 20 x 14.5 cm., with glass cover plate.

(g) Micropipette — 0.020 ml.

Procedure :

The solvent used to saturate the atmosphere was placed in the bottom of the tank 3 - 4 hours prior to the experiment. Whatman No. 1 filter paper was cut into strips 18,5 x 16 cm. and marked 2.5 cm. from the edge to be inserted into the solvent.

(x) Received for publication September 5, 1964

20 lambda (0.02 ml) portions of aqueous solutions of the samples and standard were applied to the paper. The amount actually spotted, contained 30 microgrames quantities of the Methylene Blue and Gentian Violet respectively. At the end of the solvent run, the paper was dried in the air, each spot was cut out, sliced into small pieces and placed in 10 ml. bottles. Ten milliliters of Methanol was added to each bottle to elute the dyes. The bottles were then shaken for 30 minutes by hand by a rotatory movement.

Since the absorption maximum for Gentian Violet was 580 millimicrons and for Methylene Blue was 655 millimicrons (Figs. 3 and 4), the absorbance of Gentian Violet was determined against Methanol at 580 millimicrons, and the absorbance of Methylene Blue was determined also against Methanol at 655 millimicrons. Calculation was made by simple proportion.

Results :

1. The following Rf values were obtained :

Methylene Blue : 0.60

Gentian Violet : 1. (Solvent front)

Figs. 1 and 2 represent the separation of the Crystal Violet, Gentian Violet and Methylene Blue.

2. Methanol was found to be the most satisfactory solvent to eluate the spots, obtained with the described method.

3. Methanolic solutions were found to be stable for more than 24 hours.

4. The absorbancies obtained with Gentian Violet (at 550 - 620 millimicrons) and Methylene Blue (at 600 - 680 millimicrons) are shown in tables I and II.

5. Reliable results were obtained on applying this method to medicinal preparations which contain these compounds.

L I T E R A T U R E

1 — U.S.D., 1955, 858

2 — U.S.D., 1955, 856

3 — B.P.C., 1963, 211

4 — Yanuka, Y., Shalon, Y., Weissenberg, E., and Ntr-Grosfeld, I., 1962, A Paper Chromatographic Method for the Identification of Food Dyes, *The Analyst*, 87, 791 - 796

THYMOL BULANIKLIK TESTİ ÜNİTE DEĞERLERİNDE GÖRÜLEN KARIŞIKLIKLAR

Dr. Kemal ÖZKAN (1)

Dr. Mehmet TÜRKVAN (2)

THYMOL bulanıklık testi bir biyokimya laboratuvarından sık sık istenen tahlillerin başında gelenlerden biridir. Tedavi edici hekimlerin teşhis ve tedavide çok önem verir gördükleri bu testin sonuçlarının değerlendirilmesinin iç yüzü nedir? Çeşitli laboratuvarlara aynı günde uğrayan bir hastanın eline verilen raporlardaki hem hastayı hem hekimi şaşkınlığa düşüren bu çok farklı rakamlar nereden çıkmaktadır? Laboratuvarında bulunan personel, malzeme ve ayıraçlardan gelebilecek hataları bu yazı konumuzun dışında tutuyoruz.

Bilindiği üzere testin esası şöyle tanımlanabilir :

Bir hacim kan serumunun altmış hacim Maclagan thymol ayırıcı (doymuş thymol tampon çözeltisi, PH. 7,5 - 7,8) ile karıştırılmasıyla meydana gelen bulanıklığın ölçülmesidir (Turbidimetry). Bu bulanıklığın kırmızı ışığı absorblaması ile belli şartlarda hazırlanan baryum sulfat suspansiyonu (1), denatüre protein suspansiyonu (2), cam parçacıkları suspansiyonunun (3) bulanıklıkları veya bakır sulfat çözeltisinin (4) kırmızı ışığı (660m — 650m) absorblaması mukayese edilerek değerlendirilir veya serumun meydana getirdiği bulanıklık doğrudan doğruya optik dansite olarak ifade edilir.

Genel olarak bir laboratuvarcı, dil durumuna göre, çeşitli klasikleşmiş laboratuvar kitaplarını el altında bulundurur. Şimdi piyasada bulunabilen bu kitaplardan bazılarında thymol testi bahislerini gözden geçirelim :

1) Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü Biyokimya Mütchassısı

2) Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü Biyokimya Asistanı

a) Prof. K. Aras. Klinik Biyokimya, 1964, s. 184.

3ml. % I, 173 gr. $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ çözeltisi (0,0962 N.) ile 97ml. 0,2 N. H_2SO_4 karıştırılarak standart suspansiyon elde ediliyor. Bu suspansiyonun bulanıklığı = 20 THYMOL ÜNİTESİ
Normal değerler : 0 - 4 unite

b) Prof. M. Atasagünil, Klinik Laboratuar ve Araştırma Metotları, 1962, s. 318.

3ml. % 1gr. $BaCl_2$ (1gr. $BaCl_2 = 1,173$ gr. $BaCl_2 \cdot 2H_2O$) (0,0962 N.) 97ml. H_2SO_4 0,2N. ile hazırlanan standart baryum sulfat suspansiyonu 7 numaralı standart tüpünden anlaşılacağı üzere 34 MACLAGAN ÜNİTESİDİR.
Normal değerler : 0 - 4 unite

c) Gradwohl, Clinical laboratory methods and diagnosis, 1956, s. 355.

3ml. % 1gr. $BaCl_2$ çözeltisi (0,0962 N.)
97ml. H_2SO_4 0,2N

Standartlar tablosunda 6 numaralı tüpte bulunan bu suspansiyonun karşısında 34 MACLAGAN ÜNİTESİ yazıldığı görülüyor. Normal değerler : (1,68ml. Baryum sulfat suspansiyonu konmuş olan tüp karşılığında) 10 MacLagan unitesi altında olmalıdır.

d) P. Fleury, Fiches techniques de chimie biologique, sang-25, s. 3. MacLagan'ın thymol ayırıcı ile karıştırılan serumun meydana getirdiği bulanıklığı, optik dansite olarak (D.0x100) ifade etmenin, keyfi üniteier kullanılmaktan daha mantıklı bir yol olacağı ileri sürülmektedir.

e) Levinson and Mac Fate, Clinical laboratory diagnosis. 1956 s. 224.

3ml. % 1,1755 gr. $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ çözeltisi (0,0962 N.)

97ml. H_2SO_4 0,2N. Böylece hazırlanan baryum sulfat suspansiyonundan 5,40 ml. alarak 0,60 ml. H_2SO_4 0,2N. ile sulandırdığı tüpün bulanıklık derecesini 20 ÜNİTE olarak kabul ediyor.

Normal değerler : 0 - 4,7 unite

f) J. Loiseleur, Techniques de laboratoire, 1954, s. 81.

Kan serumunun thymol ayırıcı ile meydana getirdiği bulanıklığı opasimetrik indeks olarak Vernes fotometresinde ölçerek ifade ediyor. (D.0 x 100). Normal değerler : 6 U.V. nin altında olmalıdır. IU.V. = Optik dansite X 100

g) H. Varley, Practical clinical biochemistry, 1962, s. 303.

3ml. (% 1gr. BaCl₂ çözeltisi (0,0962 N.)

97ml. H₂SO₄ 0,2N. Bu suspansiyonun bulanıklığı 10 MACLAGAN UNİTESİ olarak gösterilmektedir. Bu ise (% 100 mg. protein ihtiva eden standart suspansiyonun bulanıklık derecesine eşittir.

Normal değerler : 0 - 4 Maclagan unitesi

Klasik laboratuvar kitaplarından aldığımız örnekleri burada keserek sonuçları karşılaştırırsak görürüz ki, aynı bulanıklık derecesi göstermesi gereken, aynı şekilde hazırlanmış baryum sulfat suspansiyonları çok farklı ünitelere tekabül ettirilmektedir. Baryum sülfat suspansiyonu esasına dayanan bu ünitelendirme farklarının, yaptığımız inceleme sonunda, bir matbaa dizgi hatasından ileri geldiğini öğrenmiş bulunuyoruz. Shank ve Hoagland'ın ilk makalelerinde (5) 0,0962 M. yerine 0,0962 N. harfi yazılmış ve bunun sonucu olarak % 2 gr. baryum klorür hazırlanması gerekirken yanlış olarak (% 1 gr. şeklinde kitaplara intikal etmiştir. Makalenin sonradan yapılan yeni baskısında bu hata düzeltilmişse de (6) bu hal yeni bir ünitenin kabulünü zorunlu kılmıştır. Bu üniteye birçok yazarlar SHANK ve HOAGLAND ünitesi adını vermişlerdir. 20 SHANK ünitesi, 10 MACLAGAN ünitesine eşittir (7).

Sonuç olarak, tahlil raporlarında, kalibrasyon grafiğini dikkate alarak, ünitenin adının açıkça yazılması, bu gibi karışıklıkları önler kanısındayız. Normal değerler : 0 - 4 Maclagan (0 - 8 Shank) u.

L I T E R A T Ü R :

- (1) Shank ve Hoagland, J. Biol. Chem. 1946, 162, 133
- (2) Maclagan, Brit. J. Exp. Path. 1944 b, 25, 234.
- (3) Hawk, Practical Physiological Chemistry, 1954
- (4) Hector Ducci, J. Lab. Clin. Med. 1947 a 32, 1266.
- (5) Shank ve Hoagland, J. Biol. Chem. 1946, 162, 133
- (6) Hector Ducci, J. Lab. Clin. Med. 1947, 32, 1266
- (7) H. Varley. Pactical Clinical Biochemistry. 1962

The Disorders, as unites, in expressing of
the Results of Thymol turbidity test

Dr. Kemal ÖZKAN

Dr. Mehmet TÜRKVAN

We can describe the thymol turbidity test in this short way: One volume serum is mixed with 60 volumes Maclagan's thymol buffered solution (pH 7.55 - 7.8) than, that mixture is allowed to stand for half an hour. after 30 minutes the turbidity of that mixture is read in a colorimeter with red filter (660 m μ) against Maclagan's Thymol buffered solution.

The results of the test can be expressed with two different kinds of unites. One of them was named Maclagan's unite, the other was called Shank and Hoagland unites. French biochemists preferred to express those results as unite Vernes. 1.U.V. = (o.dx 100)

After those basic knowledges if we investigate that chapter in the various laboratory books of biochemistry which are available in every where, we see that; although all the calibration procedure exactly are the same the results of the test were expressed with differente amounts of unites.

1 — Prof. K. Aras. Klinik Biokimya III 1964 Pages 184

3 ml. % 1.173 gr. BaCl \cdot 2H $_2$ O solution and 97 ml. 0.2 N H $_2$ SO $_4$ are mixed. The turbidity of this standard solution = 20 Thymol. u

Normal values = (0 - 4) Thymol unites

2 — Prof. M. Atasagungil Klinik ve Araştırma Metotları 1962 p.318
3 ml. % 1gr. BaCl $_2$ (0.0962 N.) solution are mixed with 97 ml. 0.2 N H $_2$ SO $_4$ solution. The turbidity of this solution is 34 Mac-lagan unites. Normal values = (0 - 4) Maclagan's U.

3 — Gradwohl. Clinical Laboratory Methods and Diagnosis 1956
p. 355.

3 ml. % 1 gr. BaCl₂ solution (0.0962 N.)

97 ml. 0.2N H₂SO₄ are mixed

Turbidity of this solution = 34 Maclagan's U.

Normal values = Below 10 Maclagan's U.

4 — P. Fleury. Fiches Techniques de Chimie Biologique. sang 25
p. 3.

It is the best way to express the results of thymol turbidity test as optic density instead of such those arbitrary unites.

5 — Levinson and Mac Fate. Clinical Laboratory Diagnosis 1956
p. 224

3 ml. % 1.1755 gr. BaCl₂·2H₂O (0.0962 N.)

97 ml. 0.2N H₂SO₄ solution are mixed

The turbidity of this solution = 20 unites

Normal values = (0 - 4.7) Unites.

6 — J. Loiseleur. Techniques de Laboratoire 1954 p. 81

They use the unite of Vernes I.U.V. = OdX100

(Test Tube O Diameter = 10 mm.)

Normal values = Below 6U.V

7 — H. Varley Practical Clinical Biochemistry. 1962 P. 303

3 ml. % 1 gr. BaCl₂ solution (0.0962 N.)

97 ml. 0.2N H₂SO₄ solution are mixed the turbidity of that standard solution = 10 Maclagan's Unites

Normal values = (0 - 4) Maclagan's unites

Although all the calibration procedures are the same we see that the results of the test are very confused and differentes.

As Hector Ducci pointed out this was due to a typographic error in the original paper of Shank and Hoagland. The barium Chloride solution is 0.0962 M (% 2) instead of 0.0962 N (% 1) according to the correction in the reprints. So the turbidity of (3 ml. BaCl₂ % 1) and (97 ml. 0.2N H₂SO₄) standard solution is 10 Maclagan's unite not 20 Maclagan's unite as stated by those authors before.

For a turbidity equal to 20 Maclagan's unites 0.0962 M Barium Chloride solution must be used.

As a result we say that when expressing the results of Thymol turbidity test according to the calibration procedure we must put the name of unites end of the figures if we want not to cause any confusion.

Normal values :

0 - 4 Maclagan's Unites

0 - 8 Shank and Hoagland Unites

R E F E R E N C E S

- 1 — Shank and Hoagland, J. Biol. Chem. 1946, 162, 133
- 2 — Maclagan, Brit J. Exp. Path. 1944 b. 25 234.
- 3 — Hawk, Practical Physiological chemistry 1954
- 4 — Hector Ducci, J. Lab Clin. Med, 1947 a. 32, 1266
- 5 — H. Varley Practical Clinical Biochemistry 1962

KUDUZDA AŞIYLA TEDAVİ ŞEMALARI (*)

ve

BU HUSUSTA BİR ÇALIŞMA

Dr. Azmi ARI MPH

Refik Saydam M.H. Enstitüsü

Viroloji ve Virus Aşları Şb. Md.

Giriş :

Kuduz, merkezi sinir sisteminin akut ve hemen tamamen ölümlü ve sonlanan virütik menşeli, bulaşıcı bir hastalıktır. Bu hastalık çoğunlukla vahşi ve ehli sıcak kanlı hayvanlara mahsus olmakla beraber, insan nadiren de olsa enfeksiyonu kuduz hayvanının ısırması ile alabilir. Hastalığın kuluçka süresinin ortalama 1-3 ay olması, neticesi fatal olan ve başka hiç bir tedavisi bulunmayan bu hastalığın aktif bir immünizasyon ile kurtarılabileceği düşünürmüş ve hazırlamıştır.

Literatür bilgi ve bilhassa 1959-62 yılları arasında Dünya Sağlık Teşkilâtı (DST) tarafından yapılan dünya çapındaki taramalar, halen kullanılmakta olan aşı çeşitleri ve muhtelif aşı şemalarının durumunu göstermektedir. Bir fikir vermesi itibarıyla, aşağıdaki tablolar DST tarama raporlarından alınmıştır.

(*) XI. Türk Mikrobiyoloji Kongresinde Tebliğ edildi.

Tablo - 1

Muhtelif Aşı İstihsal Metodları
(Types of Vaccine Produced)

Aşı Tipi (Type of Vaccine)	İstihsal eden enstitü sayısı (Number of Institute Producing)			
	İnsan Aşısı (Human Vaccine)		Hayvan Aşısı (Animal Vaccine)	
	1960	1961	1960	1961
Beyin resepte hazırlanan :				
Semple	25	25	12	11
Ferri	3	6	2	2
Hempt	4	4	2	2
Formalinleme			3	4
U.V. ile şulama	2	3	2	2
Umeno - Doi			2	3
Högyes - Philips (canlı)	3	2		
Diğer fenolize aşılar	1	1		
Merthiolath aşılar	1	1	1	1
Isıyla inaktive ve antibiyotikli aşı			1	1
Popovic usulü aşı			1	1
Hempt - Nikolic aşı	1	1		
Eriği, yumurtada hazırlanan :				
Lep flury (canlı)			8	11
Hep Flury (canlı)			6	9
Kelev (canlı)			1	1
Ödek embrio (inaktive aşı)	1	1		

DST Halk Sağlığı Veteriner Bölümünün, dünya çapında yaptığı ankede verilen cevapların ehemmiyetli görülen aşağıdaki özetinin bu vesile ile yazılması faydalı mülâhaza edilmiştir.

Bugün dünyada mevcut takriben 100 memlekette 24 ünde son üç yıl içerisinde kuduz hastalığına rastlanmıştır. Diğer bir ifade

ile bu memleketlerde kuduz intanı pratik olarak eradike edilmiştir. 1959 - 61 yılları arasında bütün dünyada yılda ortalama bir rakamla 400 bin şahıs kuduz şüpheli ısırığa maruz kaldıklarından dolayı aşı tedavisine alınmışlardır. Bunlardan her yıl, vasati 70 kadar aşuya rağmen kudurarak ölmüşler (% 001.75) ve aşılananlar arasında yılda ortalama 30 kadar paralitık aksiden müşahede edilmiştir (% 000.5). Aynı yıllar içerisinde, şüpheli ısırığa maruz kaldığı halde aşılınmak üzere müracaat etmeyenler arasında ortalama 550 kadar insan klinik veya laboratuvar kuduz teşhisi ile ölmüşlerdir.

İnsanda kullanılan aşının istihsal metodları gözden geçirildiği zaman (Tablo - 1), görüleceği gibi laboratuvarların çoğu (% 94) aşuyu beyin mescinde ve 2 si (bir Lab.) ördek embriyonunda olmak üzere inaktive aşı hazırlamaktadırlar. Yalnız 2 laboratuvar beyin mescinde canlı attenüe aşı imalinde devam etmektedirler.

Bu taramada, aşağıda muhtelif bir kaç memlekete âit verilen aşı şemalarının umumî manzarası, tablo incelendiği zaman, aşı tatbikatındaki bir birini hiç tutmayan bir karışıklığın devam edegeldiği dik-kati çıkmaktadır.

Verilen şema örnekleri ve tablo - 2, her memleketin aşı şemaları ve tatbikatta ayrı bir yol tuttuğunu gösteriyor; DST'ı bahsi geçen anketle elde ettiği malûmatları mukayeselere gitmeden dercetmekle yetiniyor. Ancak, bu teşkilâtın bir kaç yılda bir çıkarttığı «Kuduz Eksperler Komite Raporları» ve «Kuduz Aşı Laboratuvar Tekniği» adlı kitabı ile yeni immünolojik bilgilerin ışığı altında aşı istihsal tekniği ve aşı tatbikatlarını üniform, diğer bir ifade ile standart bir hale getirmek gayesi güttüğü anlaşılmaktadır.

DST'nın geçen üç yıl içerisinde tertiplelediği ankette, mühim suallerden biri «memleketinizde aşı istihsal, tatbik ve teşhis metodlarında bir değişiklik varmıdır?» şeklindeydi. Hakikaten, bu üç yıllık taramada, bir kaç laboratuvarın teşhiste floorescin antikor tekniğini rutin hale getirme için çalışıldığını, diğer bir kısım laboratuvarların aşı istihsal, kontrol ve tatbikatındaki çalışma ve yenilikleri kayıt etmek suretiyle beklenen metod benzerliklerini, sağlama yolunda olduklarını gösteren belirtiler müşahede edilmiştir.

Bu mevzuda yeni bir adım, yine DST'nın 1964 Haziran ayında Moskovada tertiplelediği kuduz semineri'dir. DST bu seminerle, genç

Tablo - 2

**Muhtelif Birkaç Memlekette Tatbik
Edilen Değişik Aşı Şemaları**

(Different Rabies Vacc. Schedules In Some Countries)

Memleket Country	Aşının tipi Vacc. type	Aşıda nesle miktarı Tis.-ue Conc.	Zerk edilen gün- lük aşı miktarı Dosages	Kaç gün yapıldığı Days	Günde kaç defa ya- pıldığı ve diğer hususlar Frequency and others
Brezilya	Fermi	% 5	1) 3 ml. 2) 3 " " 3) 3 " "	14 20 30	1 1 1
Kanada	Semple	% 5	1) 2 " " 2) 2 " " 4 " "	14 7 7	1 1 1
Çin	Semple	% 6,6	1) 1,5 ml. 2) 1,5 " "	14 21	(İlk hafta günde 2 defa)
Fransa	Fermi	% 5	1) 5 " " 2) 5 " " 3) 5 " "	14 20 25	1 1 1
Almanya	Semple Hempt	% 5 % 10	1) 4 " " 1) 4 " " 2) 4 " "	16 5 6	1 1 (4 hafta sonra 1 1 zerk tekrar)
Hindistan	Semple	% 5	1) 2 " " 2) 5-10 " "	7 14	1 1
Polonya	Semple	% 4	1) 2 " " 2) 4 " "	20 20	1 1
İran	Semple	% 5	" "	" "	" "
U.S. America	Semple U.V. Ördek em.	% 5 " % 10	2 " " " " 1 " "	14 " 14	1 1 "
Cezayir	Fermi	% 5	1) 5 " " 2) 5 " " 3) 5 " " 4) 5 " "	15 10	1 Gün günde 2 defa son 10 Gün günde 1 defa İlk 15 gün günde 2 defa Son 10 gün günde 1 " " İlk 5 gün günde 3 " " Son 20 gün günde 2 " "
Japonya	Semple U.V. Irrad. Merthiol. Phormalin.	" " " "	1) 0,2 ml. ci. 2) 0,2 " " 3) 2 " " c.a.	7 14	1 1 7 gün günde 2 defa son 7 gün 1 defa

kuşaklara kuduz mevzuunda standart usullerin öğretimini yaptırarak bunların yayılmasını temin edecektir.

1960 kuduz eksperler raporunda (3) kuduz enfeksiyonuna maruz kalmış ve dolayısı ile aşı tedavisine alınmak icap eden bir kimseye tatbik edilecek aşı şeması şöyle derlenmiştir.

1 -- Yalnız kuduz aşısı,

2 -- Evvelâ hiperimmün kuduz serumu,
ertesii günü başlamak üzere kuduz aşısı.

Amerika'da yapılan çalışmalara göre kuduzda, iyi bir aşı ile en kısa bir zamanda kâfi bir immunizasyon sağlamak için, 14 günlük bir şemanın tatbiki zaruri görülmektedir. Kuluçka süresi kısa olması muhtemel ağır ve müteaddit ısırıklılar hariç bu şemanın bütün kuduz şüpheli ısırıklılara aynı tatbik edilmesi lâzımdır.

Bu çalışmada, laboratuvarlarımızda hazırlanan Semple usulü inaktive kuduz aşısı ile aşının uygun verilmiş dozu tesbit edilmeğe çalışılmıştır.

MATERIAL VE METOD :

Semple Aşısı, % 10 koyun beyin emülsiyonu. % 1 fenolle 37°C de 24 saat inaktive edilmiş sonra bu emülsiyon tuzlu su ile bir kat sulandırılarak % 5 lik nihayi aşı elde edilmiş olunur. Bu aşıda % 0.5 fenol preservativ olarak bulunur. Aşı 10°C altında ve karanlıkta saklandığında 6 ay inadlıdır. Aşının müessiriyet dahil (Habel testi) kontrolleri tamamlandıktan sonra kullanılır.

Serumlar, Kuduz aşı tedavisi endikasyonu konmuş hafif ısııklı. 10 - 40 yaşlarında, yarısı kadın yarısı erkek 32 şahıstan, 8'inden birinci serumı almıştır. Bu 8 serum, gurubu temsil etmek üzere ilk serum olarak testlerde kullanılacaktır. Şahısların bir yarısına günde 2 ml ve diğer yarısına 4 ml'lik 14 der günlük aşı şemaları tatbik edilmiş ve sonra bunların her birinden son aşı zerkinden üç hafta sonra ikinci kan nimuneleri alınmıştır. Ayrılan serumlar tecrübe gününe kadar + 4°C buzlukta muhafaza edilmişlerdir.

Antikor aranması, bundan evvelki çalışmamızdaki aynı teknikle yapılmış () her serumun inaktive edilen 1/5 - 1/20 sulandırımı kuduz sabit virusunun 200 LD₅₀ sulandırımı ile karıştırılarak muayyen şartlarda bekletmelerden sonra, farelere 0.03 ml. Bİ zerk edilmiştir. Çalışmalarda her sulandırım için ortalama 10 fare kullanılmıştır. Birinci serumlar yalnız 1/2 sulandırımı ile teste tabi tutulmuşlardır. Serumların 1/20 veya daha yüksek titrede nötralizan antikor iltiva etmeleri uygun netice olarak vasıflandırıldığından (1) başka dilüsyonlarla çalışılmaya lüzum görülmemiştir.

Virus, Yıllarca evvel Paris'teki Pasteur Enstitüsünden getirilen ve Enstitümüzde kuduz aşısı istihsalinde kullanılan kuduz sabit Virus. % 20 tavşan beyin süspansiyonu halinde - 70°C saklanmakta olup tecrübelerde kullanılmıştır. Tohum virus her 3 - 4 ayda bir tazelenir.

NETİCELER :

Bu tecrübelerde, günde 2 ml. ve 14 gün kuduz aşısı tedavisine tabi tutulanlarla, 4 ml. ve 14 gün tedaviye alınan şahıslardaki nötreleyici antikor neticeleri müteakip tabloda gösterilmiştir.

Table - 3

14 Günlük 2 ve 14 Günlük 4 ml.

Kuduz Aşısı Yapılanlarda Antikor Durumu

(Presence Of Rabies Antibodies After Two Vacc. Schedules Applied)

Aşı Şemaları Vacc. Schedules		Vaka sayısı Case Num.	2. Kanın aldığı zaman (ortalama) Average day for 2 nd Sample	Antikor Durumu Presence of Antibody		
				Menfi < 2	5 < 20	> 20
14 Günlük 14 daily ml.	günde 2 ml. 2 ml. day Serum	4		4	—	—
		16	35 Gün	3	—	13
14 Günlük 14 daily ml.	günde 4 ml. 4 ml. day Serum	4		4	—	—
		15	27 Gün	—	3	12

(Nötralizan antikor titresi orijinal serum sılandırımının paydası ile ifade edilmiştir. - Reciprocal of neutralizing antibodies)

Rakamlar tetkik edildiği zaman birinci tertip aşı şeması tatbik edilen 16 şahıstan 13 ünün kanlarında 1/20 veya daha yüksek oranda koruyucu antikorlar teşekkül etmiş olmasına mukabil ikinci tertip aşı şeması tatbik edilebilen 15 şahıstan 12 sinde 1/20 veya yüksek oranda antikor teşekkül etmiş, geri kalan üç şahısta $1/5 < 1/20$, diğer bir ifade ile 1/20 ye yakın titrede bir antikor teşekkül etmiş bulunmaktadır.

TARTIŞMA :

Tecrübemiz, klâsikleşmiş bir malûmatı şartlarının içerisinde gözden geçirmek gibi bir gayeyi esas almış bulunmaktadır. Filhalka literatürde, çabşmalar neticesi hakikaten kuduz ısırıklı bir şahısta kuluçka süresinin ortalama 1 - 2 ay olduğu nazara alınarak aşuya başlanmasından itibaren azami 30 - 35 ci günlerde kanda nötreleyici antikorların, 1/20 ye yükselmiş olması kâfi bir korumayı sağladığı gösterilmiş olduğundan, tecrübemiz bu bulguyu teyite matufdur. Bu itibarla rakanılarımızın küçük olması, neticelerin tefsirinde fazla bir tesir yapmayacaktır.

Birinci tertip şemada yani, günde 2 ml. den 14 gün aşı tatbikinde 16 şahıstan üçünde 1/20 ye yükselmiş bir antikor seviyesi elde edilmemiş olmasına mukabil 2 ci tertipte 15 şahıstan 3 ünde 1/20 ye yakında olsa bir antikor tesbitine, diğer bir ifade ile son 15 vak'ının hepsinde 1/20 ye yakın, veya daha yüksek bir titrede antikor teşekkül etmiş olmasını bir üstünlük olarak mülâhaza etmek mümkündür. Bu itibarla, hafif veya orta derecede kuduz şüpheli ısırığa maruz kalmış kimselerin tedavisinde elimizde mevcut Semple aşısı ile 14 gün, günde 4 ml. lik bir tedavi şemasının emniyetle tatbiki mümkün olabilecektir. Bu arada, immünolojik bakımdan refrakter (non-responder) tiplerin bulunabileceğini ve bunların umumî kaideleri değiştirmemesi icap edeceğini belirtmek faydalı olur.

ÖZET VE KARAR :

Dünya Sağlık Teşkilâtını (DST) 1959 - 60 - 61 yıllarında, kuduzla alakalı olarak dünya çapında yaptığı bir ankete verilen cevaplar, aşının istihsalı, tatbikatı ve teşhis metodlarının pek çok değişiklikler arzettiğinin göstergesidir. Yazının başında bunların kısa bir özeti yapılmıştır. DST'nin 1964 yılı Haziran ayında Moskovada ter-

tiplediği kuduz semineri ve her 4 yılda bir neşrettiği kuduz eksperler komite raporları ile 1955 yılında neşredilen kuduz lab. tekniği kitabı bu teşkilâtın kuduz mevzuunda aşı istihsal, lab. teşhis ve aşı tatbikatında standart usullerin bütün dünyaya yayılmasını hedef tuttuğunu göstermektedir.

Memleketimizde bu hususu temin etmek bakımından muhtelif çalışmalar ele alınmıştır. Bu arada, aşı tatbikatını en son görüşlerin ışığı altında tertiplemeden önce, en kısa zamanda, 14 günlük bir aşılama şeması ile yeterli nötreleyici antikor titresi elde etmek için günde 2 ml. ve 4 ml. aşı verilen şahısların kanları tetkike tabi tutulmuştur. Klâsikleşmiş bir malûmatı, kendi şartlarımız içerisinde tekrar niteliği taşıyan bu çalışma neticesinde, orta derecede. kuduz şüpheli bir ısırığa maruz kalmış kimselerin Semple kuduz aşısı ile tedavisinde 14 gün, günde 4 ml. lik bir şemanın kâfi bir immünizasyon sağlayacağı anlaşılmaktadır.

Ağır ve müteaddit ısırığa maruz kalmış kimselerin ise evvelâ hiperimmün kuduz serumu ve ertesi günden itibaren başlamak üzere 20 günlük günde 4 ml. aşı şemasına tabi tutulması ve son aşı zerkinden itibaren 10 cu ve 20 ci günlerde birer zerk yapılmak suretiyle immüitenin pekiştirilmesi tavsiye edilen usuldür.

VACCINATION SCHEDULES IN RABIES
AND
A STUDY ON THIS SUBJECT

Dr. Azmi **ARI MPH**

S u m m a r y :

A Survey made by World Health organization (WHO), veterinary Pub. Health dept. for the rabies Vaccine production, diagnosis, treatment of suspicious bites and other related subjects for all laboratories throughout the world which work on this subject, during 1959 - 1960 and 1961. The fact, one can observe in these documents, however, there is no unic and standart methods neither on the vaccine production procedures, diagnosis and nor on the schedules of vaccine treatments as well. A short summary, including table - 1 and 2. of this survey is given in Turkish title to present and clear out the idea of discrepancies which are present in this field.

For us it seems that, the WHO using every effort to put all these discrepancies on our view and by its expert committee's publications during the last twelve years, including a Monograph «Rabies, Laboratory Tecnic 1955», and by other means as well, such as the ona a seminar organised in Moscow in june 1964 to demonstrate the standart methods to the young generation. They have all tried to standardise the methodology and Vaccine treatment Schedules throughout the world.

In our Laboratory it is already started to use some of the new technics and methods in rabies product. In this present study two Vaccination Schedules 2 ml. and 4 ml. each, for 14 days applied to some 32 persons and their serums studied for neutralizing antibodies contains (Table - 3). Since this study, tried to confirm previous finding by others in our condition, the presence of antibody in 1/20

serum dilution considered satisfactory for evaluation. The second schedule (4 ml. for 14 days) seems adequate for the Vaccine treatment of the people who slightly or moderately - exposed to rabies infection. Hyperimmun Rabies serum plus Vaccine treatment is and should be the method of Choice, in severe exposures (bites on the face, head, neck, multiple bites or severe bites elsewhere).

L I T E R A T Ü R

1. DEAN, DONALD J. and ALBRECHT, ROBERT M, Rabies,
Med. Clinics of North America, 43 : 1481, 1969
2. World Survey of Rabies 1, 2, 3, ,
by Veterinary Pub. Health unit, WHO, 1960 - 1962
3. Expert Committee on Rabies
Fourth Report, WHO
Tech. Rep. ser. 201, Geneva, Switzerland, 1960
4. A. ARI
Ördek - Embryon Orijinli İnaktive Kuduz Aşısı : Buster Testri Bakımından
Semple Aşısı ile Mukayeseli Bir Çalışma
Türk Hij. Tec. Biol. Dergisi XXIV/1. 1964
5. Antirabies Immunization of Man (3 articles)
Bull Wld Hlth Org., 17 : 869 - 1957 (Special Issue)
6. Semple Aşısı ile Kuduz Aşısı Talimatı 1956, 1960
7. F.B. PECK J. and Co Workers,
Duck Emb. Virus Vaccine
JAMA, 162 : 1373, 1956

**TÜRKİYE AKREPLERİ VE TÜRKİYE'DE HAZIRLANMIŞ
ANTI ANDROCTONUS CRASSICAUDA AKREP SERUMUNUN
PARASPESİFİK ETKİSİ (*)**

Turgut TULGA

Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü
Genel Sekreteri

Akrepler, Arthropoda kökünün, Arachnida sınıfının Scorpionida takımında yer almışlardır. Bu takım 500 akrep türünü kapsayan Vejovidae, Buthidae, Scorpionidae, Chactidae, Bothriuridae, ve Diplocentridae olmak üzere altı familyaya bölünmüştür. Tıbbi yönden en önemli familya Buthidae familyasıdır ve dünyanın en zehirli akrep türlerini içine alan Buthus, Centroides, Androctonus, Tityus ve Parabuthus cinsleri bu familyaya ait bulunmaktadır.

Akrebin insanda yarattığı çekingenlik ve korkuyu bazı kişiler fazla mübalâğalı bulmakla beraber, lokal bir ağrıdan ölümle sonuçlanabilecek kadar farklı tablolar gösteren zehirlenme olaylarında akrep türünün önemi olduğu kadar, hayvanın o andaki fizyolojik durumu ile aktığı zehirin miktarı, şahsın yaşı ve ağırlığı arasında yakın ilişkiler bulunduğu da bir gerçektir.

Türkiye Akrepleri :

Bugüne kadar, Türkiye'de değişik coğrafi dağılımlar gösteren ve beş cinsten toplanan en akrep türü tespit edilmiştir. Bunları şöyle sıralayabiliriz :

1. Scorpio maurus L. fuscus (H. et E)

Hatay, İskenderun, Adana, Elâzığ

(*) XI. Türk Mikrobiyoloji Kongresinde tebliğ edilmiştir.

2. *Euscorpium italicum awhasicum* (Nordman)
İstanbul, Giresun
3. *Euscorpium germanum mingrelicum*
Sinop
4. *Euscorpium germanum ciliciensis*
Denizli, Eğridir, Acıpayam
5. *Euscorpium carpathicum*
İstanbul ve Trakya
6. *Jurus dufourei asiaticum*
Silifke
7. *Androctonus crassicauda*
Güney doğu illeri, özellikle Mardin ve Urfa
8. *Buthus gibbosus brulle*
Batı illeri, Ankara, Erzincan
9. *Buthus eupeus* (C.L.Koch)
Sarıkamış
10. *Buthus quinquestriatus*
Adıyaman

Yukarıdaki on türden ilk dokuz'u M.A. Tolunay ve C. Kosswig tarafından tanımlanmış ve M. Vachon tarafından idantifiye edilmiştir (1, 2, 3). M. Vachon 8 ve 9. türleri sonraki yayınında *Mesobuthus* cinsi içinde mütalâa etmiştir.

Senoncu tür olan *Buthus quinquestriatus*'un Türkiye'de varlığı ilk kez tarafımızdan 1959 yılında Adıyaman'da tespit edilmiş, tür tayini A. Shulov'a yaptırılmıştır (4).

Tıbbî yönden, bu on türden Türkiye için en önemlileri, *Androctonus crassicauda* ile *Buthus quinquestriatus*'dur.

TÜRKİYEDEKİ AKREP SERUMU ÜRETİMİNDEKİ GELİŞMELER

İlk çabalar : Todd tarafından (1909) akrep zehirinin antijen niteliği ortaya konulduktan bir süre sonra akrep sokması olaylarında yegâne tedavi vasıtası olan akrep serumunun üretimi cihetine gidilmiş ve bazı memleketler kendi zehirli akrep türlerine karşı ho-

nolog serumlar hazırlamaya başlamışlardır. Yurdumuzda da akrep serumu üretimine Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsünde 1942 yılında başlanılmıştır (5).

Önceleri yurdumuz ihtiyacını karşılayabilen üretim, zamanla artan istek karşısında tüketime ayak uyduramamış, hattâ bazı senelerde çok miktarda akrep satın alınmasına rağmen (yılda 50,000 - 80,000 adet) prodüksiyon yok denecek derecede azalmış ve yurt dışından serum tedariki bile düşünülmüştür.

Son yıllardaki çalışmalar : 1958 - 1959 yıllarında, Enstitüde diğer serumlarla birlikte akrep serumu ile de görevlendirildiğimizde, ihtiyaç çok kritik bir safhaya ulaşmış bulunuyordu. Akrepe zengin bir memlekette dışarıdan heterolog bir serum ithâl etme zorunda kalmak, sorumluluk duygusuyla bağdaşamıyacağından, üretimdeki aksaklıkların nedenlerinin araştırılması öncelikle ele alındı ve şu hususlar tespit edildi.

1 — Yurdumuzun değişik bölgelerinden gelişi güzel toplatılan farklı türlere ait akreplerin zehirleri arasında immünolojik yönden bir ayrım gözetilmeksizin karıştırılıyor ve hayvan immünizasyonunda kullanılmaya çalışılıyordu.

2 — Antijen olarak kullanılan akrep zehirinin hazırlanması ve serum hayvanlarının immünizasyonu metodları kendi şartlarımıza göre standardize edilmediğinden, bu durum prodüktör hayvanların geniş ölçüde kaybına yol açıyor ve özellikle serumlarda istenilen seviyede antikor teşekkülü sağlanamıyordu.

3 — Akrep toplayıcı ve satıcıları hileli yollara sapsmışlardı. Örneğin, Diyarbakırda hemen, hemen o bölgeye has akrep tükenmiş olduğu halde, Anadolunun başka bölgelerinden kolayca sağlanan az zehirli binlerce akrep buraya aktarılıyor ve Diyarbakır orijinli gösterilerek Enstitü'ye satılıyordu.

Bu aksaklıkların giderilmesi amacıyla, aşağıdaki plân çerçevesi içinde çalışmalara başlandı.

1 — Yurdumuz akreplerine ait farklı zehirlerin karşılaştırmalı olarak incelenmesi, bu arada özellikle antijenisite'lerinin değerlendirilmesi ve farklı türlere ait zehirler arasındaki antijenik ilişkilerin araştırılması,

2 — Kendi şartlarımıza göre hayvan immünizasyonunda en rasyonel bir yolun bulunması,

3 — Alınacak sonuçlara göre Türkiye'de kullanılabilecek akrep serumunun hangi tür veya türlere karşı hazırlanması gerektiğini aydınlatma çabaları.

Sonuçlar: Ege ve güney Anadolu kıyı bölgelerinden kolayca ve geniş ölçüde sağlanmakta olan, az tehlikeli *Buthus gibbosus* brulle ile *Scorpio maurus fuscus* türlerine ait zehirlerin serum üretimi bakımından hayvan immunizasyonuna elverişli olmadıkları anlaşıldı ve bu bölgelerden akrep satın alınmasına son verildi.

Yurdumuzun en zehirli akrebi olarak bilinen ve Urfa, Mardin ilimizde başlıca türü olan *Androctonus crassicauda* (teki basnifite *Prionurus*) ile çalışmaya devam edilirken Adıyaman'dan gönderilen açık saman sarısı renkteki akrepler gerek morfolojik ve gerekse toksisite bakımından dikkat nazarımızı çekti. Fareler'de yapılan deneyler alışık olmadığımız bir sonuç vermişti. Bu yeni tür, Türkiye'nin en zehirli akrebi olarak bilinen *Androctonus crassicauda*'dan beş altı misli daha kuvvetli bir toksisite gösteriyordu. Nitekim bir adet *A. crassicauda* telsonu'nun 1-2 miktarı (kuru zehir) derialtı yoluyla 15-20 gram ağırlığındaki beyaz fareleri 15-20 dakikada, 150 gram ağırlığındaki beyaz sıçanları da 1-2 saat'te yüzde yüz öldürdüğü halde, bu sonuncu akrebin bir telsonu'nun 1/10 miktarı, aynı nitelikteki hayvanları, aynı süre içinde öldürmeye yeter gelmişti (4).

Filistin akrepleri üzerindeki çalışmalarıyla tanınmış, İsrail'de İbrani Üniversitesi profesörlerinden A. Shulov'un o tarihlerde, dünyanın en zehirli akrep türlerinden biri olan *Buthus quinquestriatus* zehirine karşı hazırlanmış olduğu yeni bir akrep serumunu, yurdumuzda hazırlanandan çok üstün olabileceği iddiasıyla memleketimize satmak istediğini Dışişleri Bakanlığı aracılığı ile öğrenmiş bulunuyorduk.

Adıyaman'da varlığını tespit ettiğimiz bu çok zehirli akrepten birkaçını tür tespiti için A. Shulov'a gönderdik.

Aldığımız cevap bizi doğruluyor ve bizce yeni olan bu tür'ün *Buthus quinquestriatus* olduğunu bildiriyordu. Bu karep Filistin'den başka, Suriye ve Kuzey Afrika'da da yaşamaktadır.

2 — Serum hayvanlarının immunizasyonu, kuru zehirle çalışma şartlarınıza göre standardize edildikten sonra, *A. crassicauda* ve *Buthus quinquestriatus*'a karşı iki ayrı spesifik monovalent serum hazırlandı. Yabancı literatür'lerde *Androctonus crassicauda* zehirine karşı bir serum hazırlandığı ve pratığe çıkarıldığına dair bir işarete rastlanmadığımızı da bu arada açıklamak isterim.

3 — Küçük lâboratuvar hayvanlarında uygulanan nötrâlizasyon deneylerinden alınan sonuçlara göre, Anti - *Androctonus crassicauda* serumunun iki santimetre küb miktarı beş akreb'in homolog zehirini, Anti - *Buthus quinquestriatus* serumunun aynı miktarı ise ancak bir akreb'e tekabül eden homolog zehiri nötrâlize edebilmiştir. Bu sonuç, *Androctonus crassicauda* zehirinin ikinci akrebin zehirine nazaran daha üstün bir antijen niteliği taşıdığını ortaya koymuştur.

4 — İki homolog serumla yapılan yukarıdaki nötrâlizasyon deneylerine paralel olarak icra edilen çapraz proteksiyon deneylerinden alınan sonuçlara göre, *Androctonus crassicauda*'ya karşı hazırlanmış serumun aynı ölçüler içinde *Buthus quinquestriatus*'un zehirini de nötrâlize ettiği ve fakat aksinin vârit olamayacağı tespit ve müşahede edilmiştir.

BEYAZ SIÇANLARDA ÇAPRAZ PROTEKSİYON DENEYLERİ

A. *crassicauda* zehiri ile hazırlanmış akrep serumu (Seri No. 6266, Haz. tarihi: Haziran, 1959)

Akrep zehiri	Serum dozları (cc.)		Kontrol sıçanları (Serumsuz)		
A. <i>crassicauda</i>	0.166	0.2	0.3	0.4	—
1/2 telson	2.6	0.6	0.6	0.6	6.6
B. <i>quinquestriatus</i>					
1/10 telson	3.6	0.6	0.6	0.6	6.6

B. *quinquestriatus* zehiri ile hazırlanmış akrep serumu (Seri No. 6425, Haz. tarihi: Ocak, 1960)

Akrep zehiri	Serum dozları (cc.)		Kontrol sıçanları (Serumsuz)		
B. <i>quinquestriatus</i>	0.166	0.2	0.3	0.4	—
1/10 telson	3/6	0.6	0.6	0.6	6.6
A. <i>crassicauda</i>					
1/2 telson	6.6	6/6	6.6	6.6	6.6

(Paydalar deneyde alınan, paylar ise ölen hayvan miktarını göstermektedir. Kontrol sıçanlar iki saat içinde öldüler.)

Bu gerçek, Türkiye'nin her yerinde güvenle kullanılabilecek akrep serumunun, Adıyaman'da bulunan ve dünyaca tanınmış, çok zehirli *Buthus quinquestriatus*'un zehirine karşı hazırlanmış serum olmayıp, bundan dört, beş kez daha az zehirli *Androctonus crassicauda*'ya karşı hazırlanmış monovalent serumun olabileceğini kesin surette ortaya koymuştur.

5 — Akrep zehirlerinde, toksisite ile antijenisite arasında bir beraberlik olamayacağını, diğer bir deyimle zehir komponent'i yanında, tür için spesifik ayrı bir antijen komponenti'nin varlığını dşnemek çok yerinde olacaktır. Nitekim, *Androctonus crassicauda* zehiri *Buthus quinquestriatus*'un özel antijenini de içine alan bir antijen mozayığı kompleksi karakterini göstermektedir. Bunu, immüno-kimya aydınlatacaktır.

6 — Memnuniyetle söyleyebiliriz ki, yukardaki gözlemlerimiz, daha sonra Amerika'lı araştırmacılar tarafından da doğrulanmıştır.

Bu noktaya da kısaca değinmek yerinde olacaktır.

Türkiye için akrep serumunu böylece standardize ettikten ve 1959 - 1960 yıllarında pratiğe yalnızca *Androctonus crassicauda* zehirine karşı hazırlanmış monovalent bir serum arzetmeye başladıktan hemen sonra, Amerika Birleşik Devletleri Ordusu Sağlık Başkanlığı, dünyanın muhtelif memleketlerinde farklı türlerden akrep zehirlerine karşı hazırlanmış serumlar üzerinde bir çalışma programı hazırlanmış bulunuyordu. Bu ekip çalışmasının gayesi hem prospektüsleri kontrol etmek, hem de yapılacak çapraz proteksiyon deneylerinden alınan sonuçlara göre, dünyanın her tarafında tam bir güvenle kullanılabilecek polivalent bir akrep serumunun üretimini sağlayabilmekti.

Enstitümüzden de akrep serumu ve homolog zehir istediler. 6245/4803 seri ve kontrol numaralı serumumuzdan zehirle birlikte gönderdik. Henüz sona ermemiş çalışmaların birinci blns Dünya Sağlık Teşkilatı Bültenin'de yayınlanmıştır (6).

Bu yayından anlaşıldığına göre :

Türkiye'de Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsünde hazırlanmış Anti-*Androctonus crassicauda* akrep serumu kendi homolog zehirini uygun seviyede nötrâlize edebilmiş ve fakat, Cezayir (Inst. Pasteur d'Algrie), Brezilya (Instuto Butantan, Sao-Paulo).

Güney Afrika Birliği (Inst. for Med. Research, Johannesburg) ve Meksika gibi memleketlerin tanınmış enstitülerinde çok daha zehirli akrep türlerine karşı hazırlanmış serumlar, Türkiye akrebi *Androctonus crassicauda*'nın zehiri karşısında etkisiz kalmışlardır.

Bizim serumu dahil, deneye tâbi tutulan antivenim miktarı, birbirinden farklı sekiz homolog, monovalent serumdur.

Buna karşılık, Türkiye'de hazırlanmış, Anti-*Androctonus crassicauda* akrep serumu, Cezayir'in çok iyi bilinen *Androctonus australis* akrebinin zehirini nötrâlize etmek bakımından homolog serumu nazaran daha etkili bulunmuş (yaklaşık olarak iki misli), Güney Avrupa ile Kuzey Afrika akrep türü olan *Buthus occitanus* ile Güney Amerika türleri olan *Tityus bahiensis* ile *Tityus serrulatus* türlerini zehirlerini de homolog serumlara eşit seviyede nötrâlize edebilmiştir.

Bundan başka, yine aynı serum'un Kuzey Amerika akrep türleri *Centruoides sculpturatus* ve *Centruoides vittatus*'un zehirleriyle, Güney Afrika akrep türü olan *Parabuthus Spp.* nin zehirini homolog serumlar derecesinde olmamakla beraber, onlara yakın bir seviyede veya kısmen nötrâlize ettiği müşahede edilmiştir.

ÖZET ve KARAR :

1 — Türkiye'nin bugün için bilinen en zehirli akrebi *Buthus quinquestriatus*'dur.

2 — Türkiye'de akrep serumu üretimi bakımından en uygun antijen *Androctonus crassicauda*'nın zehiridir. Bu zehirle hayvan hiperimmünizasyon'u çok daha kolay olduğu gibi, zehirlenmeler sebebiyle serum üretim hayvanı kaybı da yok denecek kadar azdır.

3 — *Androctonus crassicauda* akrep türüne karşı hazırlanmış akrep serumunun oldukça geniş bir paraspesifik etki alanı vardır. Bu serum, yurdumuzun farklı akrep türleri bulunan her bölgesinde tam bir güvenle uygulanabilir.

4 — Türkiye akrep serumu ithâl edemez ve fakat bazı memleketlere ihraç edebilir.

**SCORPIONS FOUND IN TURKEY and PARASPECIFIC ACTION
OF AN ANTIVENIN PRODUCED WITH THE VENOM OF THE
SPECIES ANDROCTONUS CRASSICAUDA**

Turgut TULGA

Refik Saydam Central Institute of Hygiene

Ankara - Turkey

Ten species of scorpions have been found in Turkey having different geographical distribution.

The species which have been reported are as follows:

Scorpio maurus L. *fuscus*, *Euscorpius germanus* *mingrelicus*, *Euscorpius italicus* *awhasicus*, *Euscorpius germanus* *ciliciensis*, *Euscorpius carpathicus*, *Jurus dufourei* *asiaticus*, *Androctonus crassicauda*, *Buthus gibbosus* *brullé*, *Buthus eupeus*, *Buthus quinquestriatus*.

The first nine species were identified by M. Vachon (1,2,3).

The occurrence of *Buthus quinquestriatus*, the tenth species, has been reported by the author and has been identified by A. Shulov (4).

Androctonus crassicauda and *Buthus quinquestriatus* are the most important venomous scorpions of the Turkey.

The first polyvalent scorpion antivenin production in Turkey was started in 1942 at the Refik Saydam Central Institute of Hygiene (5).

The venoms of scorpions from Turkey were studied in 1958-1959 from the standpoints of their toxicity and antigenicity (4).

It has been observed that of these species studied only *Androctonus crassicauda* and *Buthus quinquestriatus* were found satisfactory for antivenin production.

1 — Two monovalent antivenins have been prepared for these two different species of scorpions, 2 ml. of the antivenin corresponding to the venom *Androctonus crassicauda* could neutralize homologous venom obtained from five scorpions. The same amount of antivenin for *Buthus quinquestriatus* could neutralize the homologous venom of one scorpion alone.

2 — By cross protection tests with these two homologous antivenins, it has been observed that the antivenin produced with venom of the Turkish *Androctonus crassicauda* neutralized venom *Buthus quinquestriatus* from Turkey. The venom of *B. quinquestriatus*, when compared with that of *A. crassicauda*, was found to be 4-5 times more toxic than the latter. However, antivenin prepared at the same time with the venom of *B. quinquestriatus* was not found to be effective on the venom *A. crassicauda*.

CROSS PROTECTION TESTS ON WHITE RATS

Scorpion antivenin produced with the venom of *A. crassicauda*
(Serial No : 6266, Prep. date : June, 1959)

Scorpion Venoms	Antivenin dose (ml.)				Control Rats (no antivenin)
<i>A. crassicauda</i>	0.166	0.2	0.3	0.4	—
1 2 stings	2 6	0 6	0 6	0 6	6/6
<i>B. quinquestriatus</i>					
1 10 stings	3 6	0 6	0 6	0 6	6 6

Scorpion antivenin produced with the venom of *B. quinquestriatus*
(Serial No : 6425, Prep. date : January 1960)

Scorpion Venoms	Antivenin dose (ml.)				Control Rats (no antivenin)
<i>B. quinquestriatus</i>	0.166	0.2	0.3	0.4	—
1 10 stings	3 6	0 6	0 6	0 6	6 6
<i>A. crassicauda</i>					
1 2 stings	6 6	6 6	6 6	6 6	6/6

(The fractions represent the number of rats dying over the number tested. Control rats die in two hours, each weighs 150 grams)

According to these results we believe that the venom of *A. crassicauda* has a more complex antigenic composition in spite of its lower toxicity than the venom of *Buthus quinquestriatus*, and this indicates the superiority of the antivenin produced with venom of the Turkish scorpion *A. crassicauda* in the treatment of scorpion venenation in Turkey.

3 — According to the investigations carried out by Whittemore, Keegan and Borowitz (6) it has been observed that the antivenin which was prepared in our Institute with venom *Androctonus crassicauda* neutralized more effectively the venom of the Algerian species *Androctonus australis* than the homologous antivenin, and was equal to homologous antivenins in neutralization of venoms of the Southern European, North - African *Buthus occitanus*, and the South American species *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis*.

In contrast, the homologous antivenins produced with venoms of these species have failed in neutralizing the venom of the Turkish scorpion *Androctonus crassicauda*.

LITERATURE

- 1 — Oytun, H.Ş., 1961, *Tıbbi Entomoloji*, 21 - 47
- 2 — Vachon, M., 1951, A propos de quelques scorpions de Turquie collectés par M. le Professeur Dr. Curt Kosswig, *Revue de la Faculté des sciences de L'Université d'Istanbul*, XVI, Série B, 4, 341 - 344.
- 3 — Tolunay, A.M., 1958, Zur Verbreitung der Skorpione in der Türkei, *Z. Ang. Entomologie*, 43, 336
- 4 — Tulga, T., 1960, Cross - Reactions between anti - scorpion (*Buthus quinquestriatus*) and anti scorpion (*Prionurus crassicauda*) sera, *Türk İj. Tecr. Biyol. Derg.*, 20, 201.
- 5 — Erzin, N., Balkan, H.O., 1949, Refik Saydam Merkez Hüfzassihha Enstitüsü Faaliyeti (1933 - 1948) hakkında, *Türk İj. Tecr. Biyol. Derg.*, 9, 25.
- 6 — Whittemore, F.W., Keegan, H.L., Borowitz, J.L., 1961, Studies of Scorpion Antivenins «Paraspecificity», *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 25, 185.

**1964 KIŞ VE BAHARINDA
TÜRKİYE'DE AĞIZDAN VERİLEN ÇOCUK FELCİ
AŞI KAMPANYASI VE NETİCELERİ (*)**

Dr. Azmi ARI MPH (**)

Refik Saydam M.H. Enstitüsü
Viroloji ve Virus Aşları Şb. Md.

GİRİŞ :

Memleketimizde, son yıllarda ihbar edilen çocuk felci vak'alarının aşıkâr bir çoğalma gösterdiği tesbit edilmiştir (1,2,5). Diğer taraftan umumi tatbikatı, memleketimiz şartlarında mümkün olan, ağızdan verilen polio aşısının geliştirilmiş olması keyfiyeti karşısında, esas nükten bir tedavi-i bulunmayan ve yakaladığı çocuğu veya geneli bütün hayatına bedenen kâhîrâm ve psikolojik bakımdan muhtelif şekilde bu hastalıkla, en müessir mücadele-i sağlayacak meâmi aşlamayı ele almak kaçınılmaz bir zaruret olmuştur. Yetkili makamlar, bu maksatla evvelâ bir pilot çalışmayı öngörmüşlerdir. Bu pilot çalışma, değil yalnız memleketimizde hatta bütün dünyada yeni olan bir mevzuda nazari bilgilerin yurt ölçüsünde yayılmasını sağlamak ve kendi çevre şartlarımız içerisinde en iyi bir tatbikatı temin edecek ameli bilgileri elde etmeyi öngöreyerek hazırlanmıştır. Nitekim bundan evvelki iki yazımızda, bu pilot çalışmanın hazırlanış ve tatbikatına ait bütün teferruat verilmeye çalışılmış olduktan başka, neticelerin kritiği yapılarak istifade edilecek hususlar tebarüz ettirilmişti (2).

Pilot çalışmanın kazandırdığı ameli ve ilmi bilgilerle, 1963 yılı Sonbaharında Stokholm'de toplanan 9 ncü Avrupa Çocuk Felci ve Benzeri Hastalıklar Simpoziumunun (3) ışığı altında, Türkiye'de

(*) Yazı XI. ci Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Kongresine sunuldu, ve İngilizce özeti 10 ncü Avrupa Çocuk Felci ve Benzeri Hastalıklar Cemiyeti Simpoziumunda tebliğ edildi.

(**) Türkiye Çocuk Felci Aşı Kampanyası Başkanı

1964 yılı Kış ve Baharında umumi bir çocuk felci aşısı tatbikatının esasları hazırlanmıştır.

Aşağıdaki yazımız, umumi hatları ile bu çalışmayı özetlemektedir.

Material ve metod :

Aşılacak İdari Bölümler ve Yaş Gruplarının Seçilmesi, İdari imkân ve teknik personel durumları ile son iki yıllık istatistiklere göre (2) paralitık vak'aların % 55-57 nin, Türkiye nüfusunun % 30-35 ni teşkil eden şehir ve kasabalarda tesbit edilmesi ile alâkalı olarak ilk hamlede şehir, kasaba ve belediye teşkilâtı bulunan nahiyeye ve köylere aşısı tatbikatının götürülmesi uygun görüldüğü gibi yine ihbar edilen paralitık vak'alardan ve henüz neşredilmemiş serolojik çalışmalarımızdan edinilen intibalara göre, şehirlerde paralitık vak'alara ait yaş gurubunun köylere nazaran daha yukarıya kaydığı nazara alınarak aşısı tatbikatının 4 aylıkla 12 yaş arasında çocuklara yapılması faydalı kabul edilmiştir.

1960 nüfus sayımının % 1 örnekleme ile elde edilen neticelerine göre (6) Türkiye'de nüfusu 10 binin üstündeki ünitelerde, 0-12 yaş gurubu çocuk sayısı % 28.7 ve bunun altında ise 38.3 olduğu gösterilmiştir. Çalışma sahamıza bütün büyük şehirlerle beraber nüfusu 10 binin altındaki kasabalar ve belediye teşkilâtı olan nahiyeye ve köylerde girdiğine göre, hassas yaş gurubu çocuk sayısını hesaplarken umumi nüfusun 1/3 ünü almakta bir mahzur olmadıktan başka hesap kolaylığı sağlar. Diğer taraftan memleket nüfusunun yıldı ortalama % 3 artmakta olduğunu nazarı itibara alarak 1964 yılı başında, 1960 nüfusunu % 10 artmış olacağını kabul edebiliriz: Cetvelde görülen hassas yaş gurubu çocuk sayısı bu düşünce zıncisine uyarak hazırlanmıştır.

Aşısı tatbikatına 67 ilde aynı zamanda başlanmasının idari güçlükleri yanında (aşısı sevki, her üniteye organizasyonun yeterli oluşunun merkezden denetleme ve icabında beraberce hazırlama ve takiplerinin güçlüğü), bölgelerin iklim ve coğrafi hususiyetleri gözönüne alınarak bir program hazırlanmıştır (Harita). Buna göre Türkiye beş bölümde mütalâa edilerek birinci Karadeniz bölgesinde Aralık 1963 de, diğer bütün sahillerimizi içine alan ikinci bölgede Aralık 1963 sonu, Orta Anadolu'da 15 Mart ve nihayet 4-5 nci grupları kapsayan Doğu Anadolu illerinde birkaç istisna ile en geç Nisan 1964 ortalarında birinci aşılamalara başlanmıştır.

Aşı ve Aşı Şeması; Aşı olarak Sabin ve Koprowski suşları ile hazırlanmış üçlü aşuların 1.5 - 2 ay ara ile iki defada şekerli su içinde veya şekere damlatarak verilmesi prensip olarak kabul edilmiştir.

Aşının illere sevki, evvelki yazımızda bildirilen esaslar içerisinde yapılmış, böylece hiç bir güçlüğü mâruz kalınmadığı gibi aşı optimal şartlarda (+ 10° C nin altında) kullanıcının eline geçebilmiştir (2).

Aşı Kampanyasının İllerde Organizasyonu, İllerde, Çocuk Felci Aşı Kampanyasının, büyük çoğunlukla, Sağlık Müdürleri ile beraber bir mütehassıs hekim (tercihen Çocuk veya İntani Hastalıklar mütehassısı) yürütmüşlerdir. Birkaç büyük ilde, bu görevi Sağlık Müdürünün vazifelendirdiği bir ekip yerine getirmiştir. İllerde Sağlık Müdürleri ile ilmi müşavirlerinin yukarıda bahsi geçen hizmeti, mahalli şartların icabı değişiklikler hariç en müsait şekilde ve aynı metodlarla yapabilmelerini sağlamak maksadı ile 1963 Ekim ayında, Refik Saydam M.H. Enstitüsünde kurslar tertiplenmiştir.

Tahminen 40 - 45 Sağlık Müdürü ve mütehassısın iştirak ettikleri her biri 4 - 5 gün devam eden 3 kursta, kursiyerlere Çocuk Felci ve aşı mevzuları ile alakalı her türlü yeni bilgiler, mevzularında selâhiyetli arkadaşlar tarafından verildiği gibi idareci arkadaşlarımız tarafından Sağlık Müdürlerine aşı kampanyasının kurulup işletilmesi gösterilmiştir. Bu eğitim tertiplenirken, kursa iştirak edenleri sadece dinleyici olmaktan kurtarıp, tatbikatçı ve eğitici roller verilerek, kurstan beklenen azami randıman sağlanabilmiştir. Pilot tatbikat ve umumi aşı kampanyalarında Tıp Fakültelerimizin anlayışlı, ilmi fikir birliklerinden ve müzaheretlerinden daima faydalanılmıştır.

Kayıt İşleri, Umumi aşı tatbikatında mümkün olan kolaylıkta bir kayıt sisteminin uygulanması tercih edilmiş (2) ve bu sistem sayesinde umumi istatistiki rakamların çıkarılması mümkün olmuştur. Kan tetkiki yapılan vak'alar için tafsilâtlı kart usullerinden faydalanılmıştır. Aşılama esnasında tezahür eden her paralitık vak'a hastanelere sevkedilmek suretiyle bunların aşı ile olan alâka dereceleri tâyin edilmeye çalışılmıştır.

Aşı tatbikatının serolojik değerlendirilmesi :

Aşı tatbikatının serolojik değerlendirilmesi bakımından aşılamaya tâbi tutulan 6 ay ile 3 yaş içerisindeki bebek ve oyun çocukla-

Tablo — 2

1964 Baharı Türkiye'de Umumi Çocuk Felci Aşı Tatbikatı
Bölgeler ve Aşıya İştirak Durumu
(1964 Mass Oral Polio Vaccination Campaign in Turkey
Units and Acceptance Rates)

BÖLGELER (UNITS)	Aşılanacak çocuk sayısı (*) Number of children VII vaccinee mate 4 months-12 years	Aşılanmaları istisna edenler Vaccinated				İkinciye İştirak 1. rnz Second/First	Artan Aşı Vaccine remains (Doses)
		1 ol aşlamada		2 di aşlamada			
		First vacc. %	98	Second vacc. %	84		
1. Karadeniz (13 il) Black Sea Coast	404.375	396.719	98	340.541	84	86 %	27.850
2. Diğer sahil bölgeleri (18 il) All other coast	1.686.837	1.535.152	92	1.310.200	78,6	85 %	331.450
3. Orta Anadolu (18 il) Plato	673.462	718.496	106	591.163	88	82 %	90.750
4.5 Doğu Anadolu (18 il) East Anatolia	382.216	362.192	94	254.380	66	70 %	109.050
6. Köyler (6 ilde) Plot study in villages	544.673	522.113	96	492.992	90,5	94 %	10.000
	3.671.553	3.534.672	96	2.989.276	84	85 %	569.100

(*) 1960 nüfusunun % 10 fazlasının 1/3 ü,
1/3 of the expected population in 1964

rının takriben 100 ünden ve herbirinden 3 defa olmak üzere Gard (7) tekniği ile, teste yetecek 0.3 cc kan parmak ucu veya topuktan antibiyotik ve heparinli bir solusyona 1/5 oranında alınmak usulünden istifade edildikten başka, diğer bir 100 kan aynı yaş gurubu çocuğun vena jugularislerinden 2 nci aşılannmalarından takriben 3 ay sonra alınmıştır; çalışma metodları evvelki yazımızda mevcuttur (2).

Neticeler :

Aşılama faaliyetine 5 muhtelif gurup halinde fasullarla başlamış olan 67 il ve pilot köy tatbikatı yapan 6 ilde aşılannması icabeden (4 ay - 12 yaş) hassas yaş gurubu çocuk sayısı 3,671,553 olarak hesaplanmıştır. Birinci aşılammaya bunların 3,534,672 yani % 96, ikinci aşılammaya 2,989,276 yani % 84 iştirak etmişlerdir; ikinci aşıya iştirak birincinin % 85 ni bulmuştur. (Tablo — 2).

Tablo yakından tetkik edildiği zaman 1 - 2 - 3 No. lu bölgelerde, birinci aşıya iştirak % 90 nın üzerinde ve ikinci aşıya iştirakın da birincinin % 85 nin üzerinde olması gibi güzel bir netice dikkati çeker. İyi plânlanan köy pilot tatbikatında bu nisbetler daha da yükseğe çıkmıştır. Buna mukabil Doğu Anadolu'da 18 ildeki aşı tatbikatında birinci aşıya iştirak beklenen nisbetlerde olmakla beraber ikinci aşıya iştirak birincinin % 70 ine düşmüş bulunuyor. Artan aşı miktarı 569,100 dozdur. Yani % 10 kadar zayıat olmuştur. Birçok yerlerde 50 dozluk bir şişe aşı ile 55 - 60 çocuğu aşılammak mümkün olmuştur. (Şişelerde % 10 fazla aşı mevcudiyeti).

Sabin aşısı tatbik edilen Ankara'da, en az 1 nci ve 3 ncü kanları heparinli solusyon içerisine alınan 35 çocukta aşının meydana getirdiği antikör konversiyon oranı müteakip tabloda verilmiş bulunuyor; bu dönüşler Tip/1 polio için % 64 Tip/2 için % 79 ve Tip/3 için % 79 dur.

Tablo — 3

3 lü Sabin aşısı ile aşılamada antikor konversiyon durumu

Conversion of antibodies after vaccination with trivalent Sabin's vaccine in 1964

Tip/1 için konversiyon Conversion of antibodies for type 1	64 %
» » » » 2	79 %
» » » » 3	79 %

Koprowski aşısı ile aşılanan İzmir ve İstanbul'dan heparin içersine alınan 3 lü, 83 çocuğa ait serumların incelenmesinde tereddüt uyandıran bulgularla karşılaşılması üzerine, İzmir, Konya, İstanbul ve Ankara'da Koprowski aşısı tatbik edilen 97 adet, 3 yaş altındaki çocuktan bir defaya mahsus alınan kanlardan lâboratuvarımızda tetkik edilen 55 inin serumlarında Tip/1 polio için % 73.7, Tip/2 için % 71.4 ve Tip/3 için % 67.4 bir konversiyon hesaplanmıştır. Burada aynı yaş gurubu diğer bir 55 çocuğun ilk kanları hesaplamada ilk serum gibi nazarı itibara alınmıştır.

Tablo — 4

3 lü Koprowski Aşısı ile Aşılamada Antikor Konversiyon Durumu

Conversion of Antibodies After Vaccination With Trivalent Vaccine of Koprowski/Examination Carried Out in May and June 1964

Tip/1 için konversiyon Conversion of antibodies for type 1	7 %	73,7 %
» » » » 2	26 %	71,4 %
» » » » 3	21 %	67,4 %

Heparine alınan kanlar — Bloods taken in heparine.

Aşılarımızın son kullanma tarihlerinde Zagreb İmmunoloji Enstitüsünce yapılan titrasyon neticeleri Tablo — 5 de görülmektedir. Aşıların canlı virus muhtevalarında ancak yarım Log'luk bir düşme müşahade edilmektedir.

Tablo — 5

**6 Aylık Kullanma Süreleri Haziran 1964 de
Biten 3 lü Koprowski ve Sabin Aşılarında Virus
Konsantrasyonu**

Concentration of Virus in Trivalent Vaccine of Koprowski and
in Trivalent Sabin's Vaccine Examinations Carried Out in
June 1964

(Titrasyon Haziran 1964 de) (*)

Aşı (Vaccine)	Koprowski				Sabin	
	1	2	3	4	1	2
Nümunec no. Sample no						
PFU/0.2 cc.	5,87	6,0	5,69	5,54	6,1	5,69
TCID ₅₀ /0.2 cc.	5,6	—	5,7	—	—	—

(*) Zagreb İmmunoloji Enstitüsünde yapılmıştır.
Serologic test was performed in Imm. Institute, Zagreb.

Epidemiolojik bulgulara gelince : (8) 1964 aşı kampanyasını takip eden Mayıs, Haziran ve Temmuz ayları ihbar edilen paralitık polio vak'a toplamları ile 1962 ve 1963 ün aynı aylara ait rakamları aşağıdaki tabloya çıkarılmış bulunuyor.

Tablo — 6

Türkiye'de 1962, 1963 ve 1964 ün Mayıs, Haziran ve Temmuz aylarında Poliomyelitis vak'a miktarı

Cases of Poliomyelitis in Turkey in May, June, July 1962, 1963 and 1964

Sene (year)	1962	1963	1964
Vak'a sayısı No. of cases	523	434	61

1964 yılı ihbar edilen paralitik polio vak'alarının durumunu geçen yıllarla mukayesede daha iyi aksettirmesi itibariyle, köy ve şehir vak'alarını ayrı ayrı ele alarak bunları yine 100,000 olarak ifade edilen son on yıl ortalaması ile karşılaştırdık (Tablo — 7).

Son iki tabloda görülen 1964 yılı rakamlarındaki aşıkazalma ve yaz ayları yükselmesinin durmuş olması çok sevindirici bulgulardır.

Üç milyonun üzerindeki bu çocuk toplumuna yapılan aşılama neticesinde ciddi olarak aşığı bağlanacak reaksiyonlara raslanmamıştır.

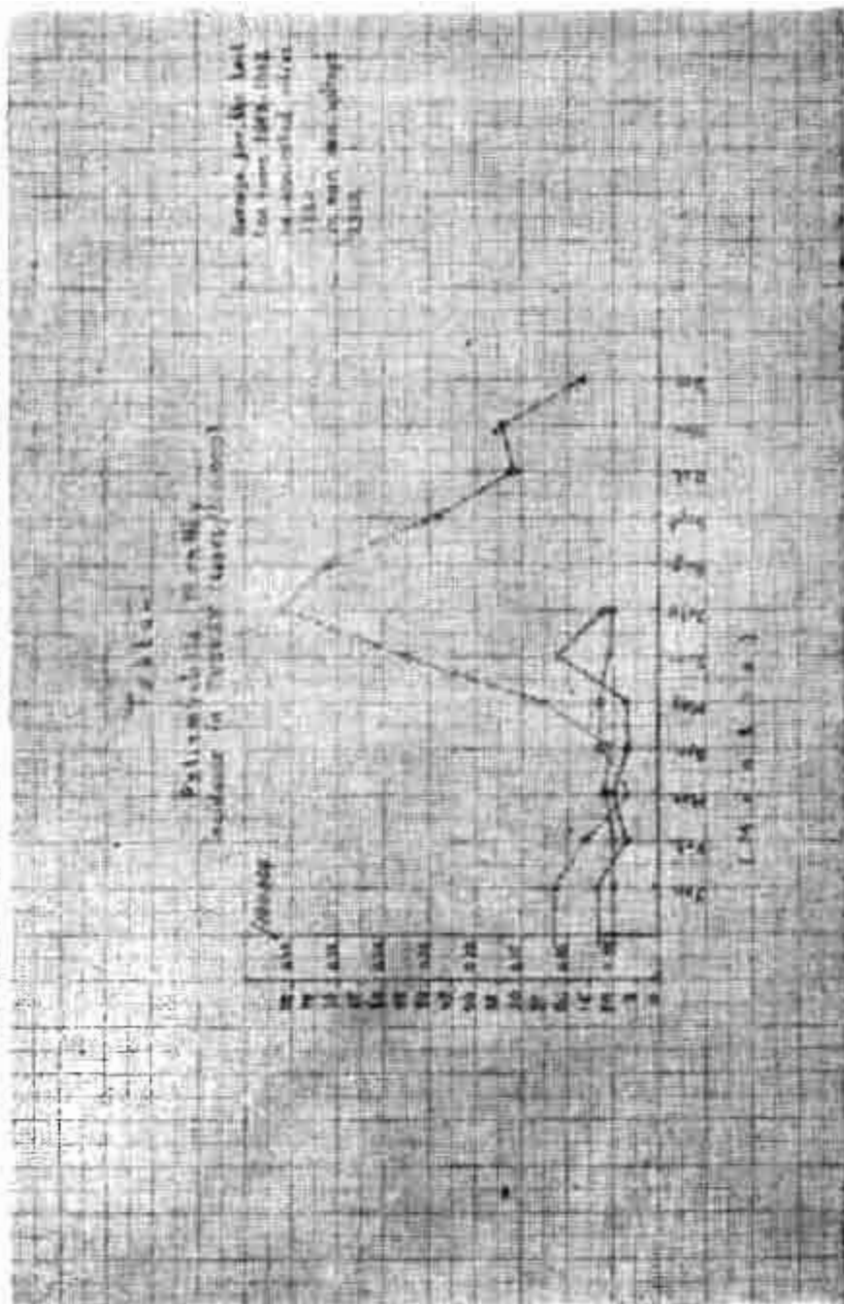
Bildirilen başlıca reaksiyonlar :

1. Aşı alınmasını takip eden saatlerde, mahdut sayıda çocukta bulantı, kusma ve karın ağrıları,
2. Aşığı takip eden 1 - 2 günlük devre içerisinde allerjik cilt reaksiyonları,
3. Mahdut sayıda geçici felçler,
4. Bir kısım çocuklarda aşılamaı takip eden hafta içerisinde hafif ateş ve ishal tarif edilmiştir.

Bu reaksiyonların dışında, aşı yapılan günlerde toplumda esasen mevcut veya tesadüfen teşekkül eden anjinler, nevritle, pnömoniler yazılmıştır. Mevzuu hâkim olan aşı idarecileri raporlarında, bunların tefsirlerini de yapmışlardır. Bunlara ilâveten, aşığı takip eden ilk gün

Tablo — 7

Türkiye'de Aylara Göre Paralizik Çocuk Fekdi/100,000 olarak
 Poliomyelitia Monthly Incidence in Turkey Cases/100,000



içerisinde klinik polio teşhisi konan 5 yaşında bir çocuğun kanında T/1 antikör bulunmuş, gaitasından virus izole edilememiştir. Aşılı çocuklar arasında ayrıca 6 parolitik polio ihbarı vardır.

Bu sonuncu vak'aların 3 ünün kanlarında T/1 - 2 - 3, birinde T/2 - 3 polie antikörleri tesbit edilmiş olup, gaita tetkiki yapılamamıştır. İyi takibi yapılabilen beşinci vak'a, 2 nci aşından 20 gün sonra hastalanmış; 13 aylık olan çocuğun birinci kanında T/1 - 2 ve ikinci kanında T/1 - 2 - 3 polio antikörleri bulunduğundan başka gaitasından T/3 polio virusu izole edilmiştir. Bu vak'anın T/3 aşısı ile olan münasebeti yetkili laboratuvarlarla işbirliği yapılarak araştırılacaktır.

Tartışma ve Özet :

1964 yılı kış ve baharında, ayrı bir teşkilât kurulmadan, mevcut sağlık personeli ile vilâyet, kasaba ve belediye teşkilâtı bulunan nahiyeye ve köylerde 4 aylıkla 12 yaş gurubu çocukların çocuk felcine karşı aşılannmaları ele alınmış ve hakikaten övünülecek muvaffakiyete ulaşılmıştır. Aşılama çağında olan 3,671,553 çocuğun 3,534,672, % 96.50 si birinci aşısı alınmış ve 2,989,276 % 84 ikinci aşısı alınabilmiştir. Aşısı 1.5 - 2 ay ara ile 2 defada şekerli su içerisinde veya şekerli damlatılarak içirilip yedirilmiştir.

Serolojik çalışmalar ve epidemiolojik takip neticeleri, henüz vakt biraz erken olmakla beraber tatbik edilen aşının, iyi bir koruma meydana getirdiğini gösterecek niteliktedir. Tablo - 6 ve 7 nin ortaya koyduğu bulgular, yani bir taraftan 1964 yılı yaz ayları parolitik vak'a sayısının 61'e düşmesi yanında, grafikte yaz yükselişinin silinmesi bizi bu güzel kanaata götürmektedir.

Ağızdan Çocuk Felci Aşısı, alınışının kolaylığı yanında ucuzluğu ile beraber bilhassa normal buz dolaplarında 6 ay hatta bir sene ve oda sıcaklığında 1 hafta - 10 gün saklanabilecek inkışaf safhasına getirilmiş olması ile her yerde tatbik edilebilir bir aşı olmuştur. Sebep tedavisi bulunmayan bu hastalıkta, en ucuz ve en müessir mücadeleyi temin edecek Ağızdan Çocuk Felci aşısı, koruyucu tababetin zafferlerinden biridir. Bu aşılamaı memleketimizde köylere kadar götürerek, bazı Avrupa memleketlerinin 1963 - 64 yıllarında başarmaya

muvaffak oldukları, hastalığı pratik olarak eradike etmiş olmayı yakın bir gelecekte Türkiye'de de başarmamak için hiç bir sebep kalmamıştır.

Teşekkür :

Türkiye Çocuk Felci Aşı Kampanyasında vazife alan bütün sağlık personeli ile laboratuvar mesai arkadaşlarıma ayrı ayrı teşekkür ederim.

L I T E R A T Ü R

1. ARI Azmi, Türkiye'de Ağızdan Verilen Sabın Tipi Attenué Polio Aşısı Kampanyası (1) Plot Çalışma Plânlaması. Sağlık Dergisi, 1963, XVII/5 - 6, 24
2. ARI Azmi, Türkiye'de Ağızdan Verilen Attenué Polio Aşısı Kampanyası (2) Plot Çalışma Neticeleri Sağlık Dergisi, 1964, XXXVIII/3 - 4, 75
3. ARI Azmi, Avrupa 9'cu Çocuk Felci ve Benzeri Hastalıklar Sempozyum İntibaları, Türk Hij. ve Tec. Blol. Dergisi, 1963, XXIII/3, 370
4. BERKE Zühdî, ARI Azmi; Türkiyenin Akdeniz ve Doğu Karadeniz Bölgelerinde 0 - 9 Yaşları Arasında Olan Çocuklarda Poliomyelitiz Antikor Seviyesi, Türk Hij. ve Tecr. Blol. Dergisi, 1960, XX/3, 342
5. PAYZEN Sabahattin, Poliomyelitiz ve Son Yenilikler ile Türkiyedeki Son Durumu, Türk Hij. ve Tecr. Blol. Dergisi, 1957, XVII/1 - 2, 145
6. 1960 Genel Nüfus Sayımı, % 1 Örnekleme ile Elde Edilen Türkiye Neticeleri, T.C. Devlet İstatistik Enstitüsü, 1962, Yayın No. 433
7. GARD S., Micro - Gard - Test for Polio Antibodies Studies. Laboratory Procedure, from Immunology Institute Zagreb, 1963
8. Bütün epidemiyolojik rakamlar ve grafikler Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı Sağlık İşleri Genel Müdürlüğünden alınmış ve birlikte hazırlanmıştır.

MASS ORAL POLIO VACCINATION CAMPAIGN IN TURKEY, DURING 1964 WINTER AND SPRING

Dr. A. ARI MPH

Director Virology Dept., Refik Saydam Central
Institute of Hygiene

According to the recent epidemiologic knowledge presented below, on tables, show that paralytic poliomyelitis was going to be one of the major public health problems in Turkey specially for infants and preschool children:

Therefore, a mass vaccination campaign against poliomyelitis was considered necessary and a pilot study was undertaken in 1963, for to get more experience on the field of «oral polio vaccine», of its practical application and to give opportunity as well to the spread of the new knowledge of this subject all around the country. The planning and the results of this pilot study was shortly presented, last year, to this group in the Stockholm meeting.

After having, specially practical experience from the field trial, a mass vaccination campaign against poliomyelitis was planned. At the first stage, cities, towns and villages with municipal and medical facilities were chosen and taken for this purposes, in 1963, for three reasons:

1. Presence of insufficient number of medical staff for such a large application,
2. Economical reasons,
3. The vaccine which was supplied has not been sufficient to vaccinate the whole susceptible group of children in Turkey.

During vaccination campaign each of the 67 provinces was considered a separate unit and local health administrators were appointed to carry on the campaign. A five days teaching courses were

Table — 1

Reported Number of Paralytic Poliomyelitis in Turkey from 1952 to 1963

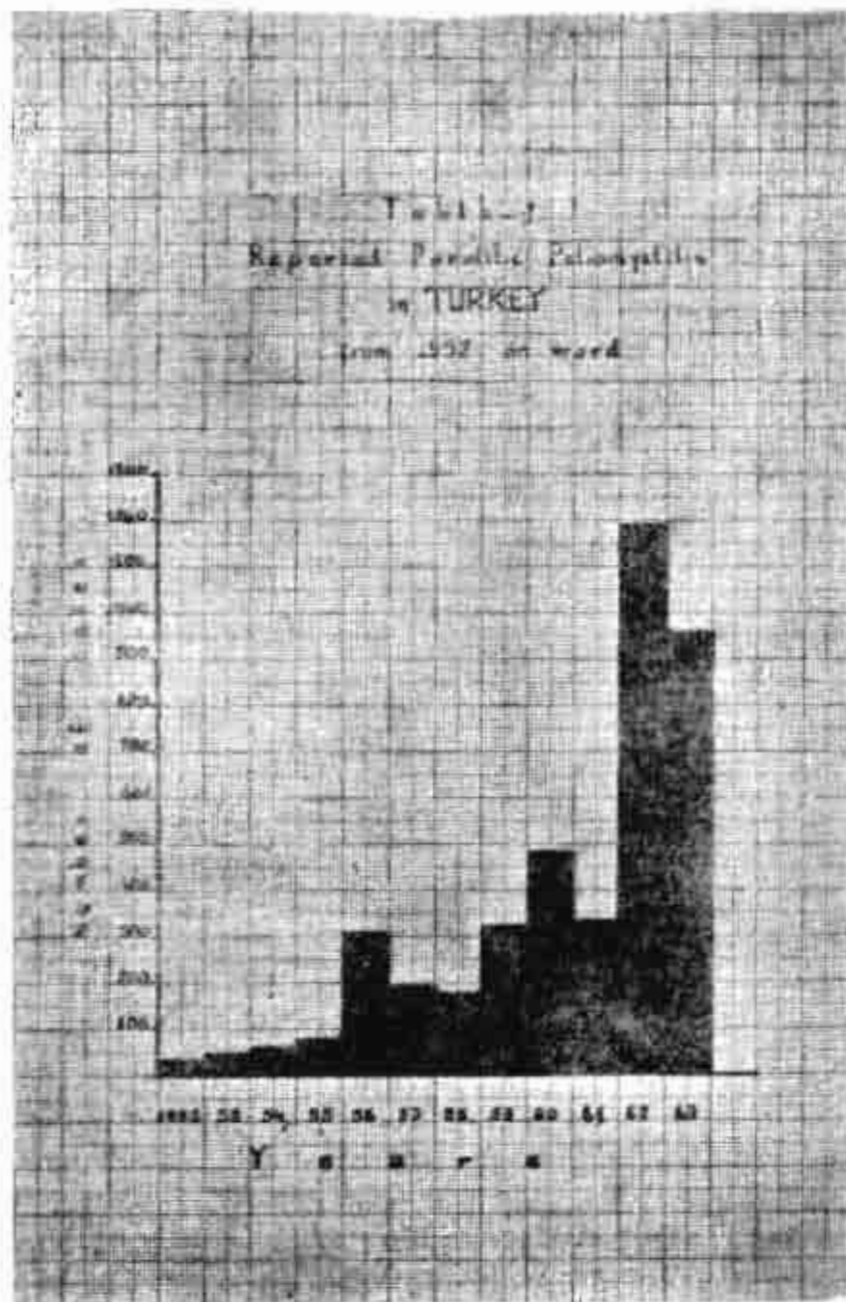
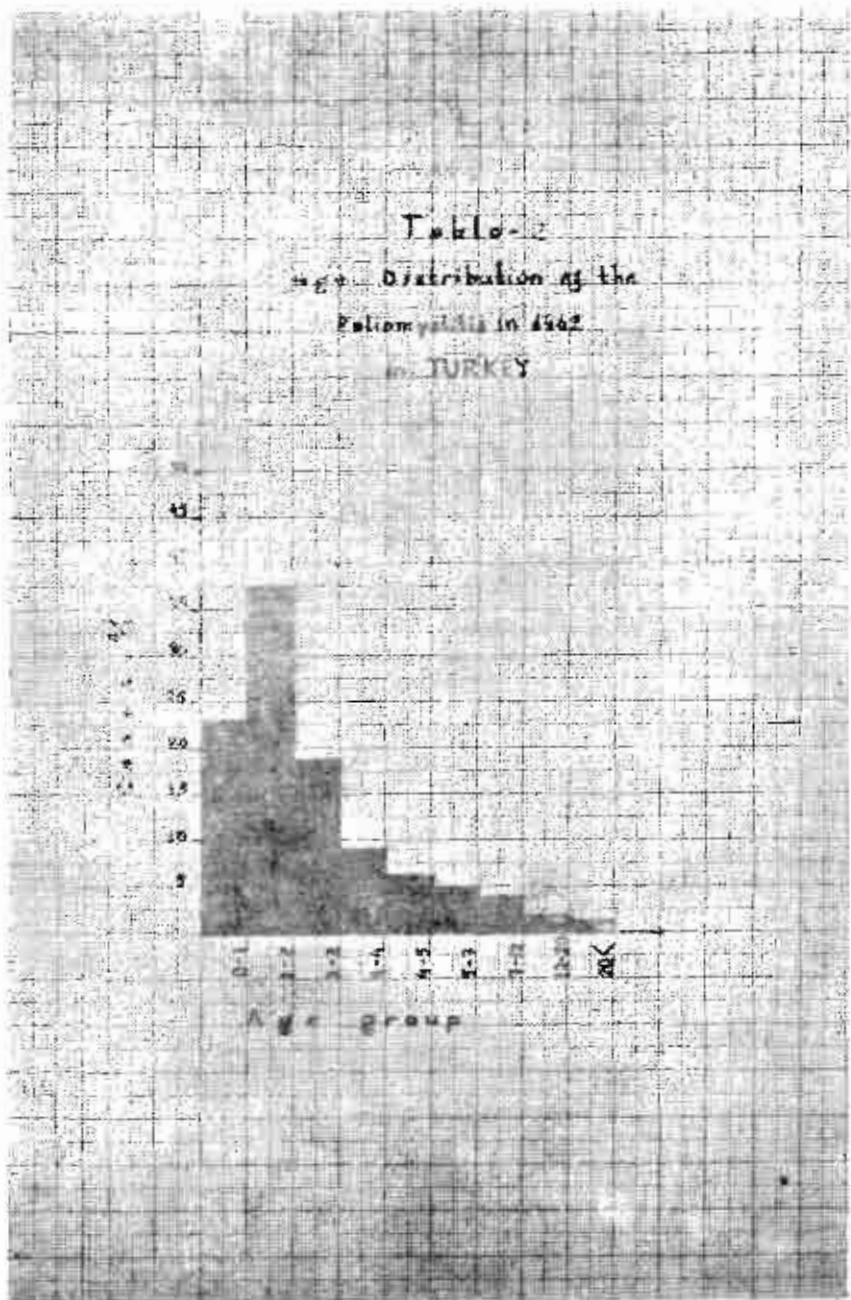


Table — 2

Age Distribution of the Paralytic Cases in Turkey, 1962



organised, in three instances and at least two medical people were invited to attend to these courses from each province; one of these staff were choosen for the administration and the other, preferably a pediatrician for the scienitific adviser of the campaign. The latest concepts of polio vaccines and their application procedures, setting up a mass vaccination campaign were discussed in all details and all possible questions which araise in mind were selvod together.

4 Well trained control groups, each was equiped from two people, one Med. doctor and one sanitarian were supervised on the organisation of the provences and helped them when it was nessacery before, the vaccination campaign has been started.

The trivalent polio oral vaccines, from Wellcome, England and from Zagreb, Creatia Yugoslavia were used and it is given in two instances with one and a half or two months interval to the children either in srup or on a lump of shugar.

67 provences were devided into five groups according geofrafical and climatic condition and each group was set up the campaign following each other. This gave oppertunity to a better central administration, vaccine supply and solving other possible questions which were arised during vaccination campaign.

The first group of provinces have been started the vaccination campaign in the midle of December 1963. This was followed by the second group in january 15, 1964, and next the third in early March, the fourth in early April and finally the fifth late April 1964, respectively.

Table — 3

Map. Shows the Units or Group of Provinces In Mass
Vaccination Campaign Against Poliomyelitis, In Turkey, 1964
Mapisresent in Turkish Title

The vaccination campaign has been completed in all provinces by the end of june 1964.

Next table shows on the line, group of provinces, expected number of susceptible children from 4 months to 12 years, number of first vaccinated and number of second vaccinated the percentages of each and finally the remaining vaccine.

Table — 4

1964 Mass Oral Polio Vaccination Campaign in Turkey Units and Acceptance Rates

As it is seen, at the bottom of the table, another pilot study, using different methods was organized for a better application of the vaccine in small communities.

Expected number of children for vaccination was found 3,671,553; whereas children who get the first vaccine were just 3,534,672 which means that 96 % of the calculated susceptible children get their first vaccine. Then, 2,989,276 children, anotherwards 84 % of the susceptible group get their second vaccine. This means that 85 % of the first vaccinated get their second doses as well; so that the acceptance rate of the vaccination campaign seems to be reasonably good. The reported number of doses of vaccine to be lost are about 569,160 doses which are less then 10 % of the used.

Epidemiological Data

Table — 5

Cases of Poliomyelitis in Turkey In May, June, July 1962, 1963 and 1964

Year	1962	1963	1964
No. of cases	523	434	61

Table — 6

Incidence of Poliomyelitis in Turkey from 1959 to 1964

Year	1959	1960	1961	1962	1963	1964, first 7 months
No. of cases	345	471	368	1238	966	132

Table — 7

Poliomyelitis Monthly Incidence in Turkey No. of Cases/100,000
the Table is present in Turkish title

Serological Data

A rather crud and quantitative neutralizing test in HeLa cell T.C. system was performed for confirming at least the others finding in this field :

Results of the presence of antibodies after vaccination with trivalent Sabin and trivalent Koprowski vaccines are presented in the Following tables.

Table — 8

Conversion of Antibodies After Vaccination with Trivalent Sabin's Vaccine in 1964

Conversion of antibodies for type 1	64 %
> > > > 2	79 %
> > > > 3	79 %

Table — 9

Conversion of Antibodies After Vaccination with Trivalent Vaccine of Koprowski in 1964

Conversion of antibodies for type 1	73.7 %
> > > > 2	71,4 %
> > > > 3	67,4 %

On the basis of acceptance rate of the vaccine and in the same-time from the epidemiological and serological evidences it is concluded that the vaccination campaign against poliomyelitis in Turkey is successful and both vaccines, trivalent Sabin and trivalent Koprowski are found aqually good.

After having this discribed result, it has been decided by the state that a mass vaccination campaign againts poliomyelitis should be brought the small communities, in the very near future.

KEMİK - MAFSAL TÜBERKÜLOZUNDA ANTİBİYOTİKLERE REZİSTANS

Dr. Vedat ONAN

Baltalimanı Kemik Hastalıkları Hastanesi,
İstanbul

G İ R İ Ő :

Antibiyoterapinin tüberküloz infeksiyonunun tedavisinde temin ettiği yenilik ve ilerlemelerin yanısıra zamanla kullanılan ilâçlara rezistan verem basili suşlarının gittikçe artan nispette ortaya çıkması hastalığın hemen bütün şekillerinde müşterek genel bir problem olmaktadır.

Öncelikle pülmoner tüberkülozda olmak üzere genel tüberkülozda son yıllara ait araştırma sonuçları rezistan suşların nispetleri için yüksek sayılar veriyorlar (1, 2, 3).

Kemik-mafsallarda ise antibiyotiklere rezistansın oldukça az görülen bir fenomen olduğu ve dolayısıyla bu vaziyetin fazla ehemmiyetli olamayacağı bildirilmiştir (4, 5).

Memleketimizde bu konudaki araştırmalarla ilgili neşriyata rastlamadık. Yapılmış olsa dahi çalışmaların sayısının fazla olmaması muhtemeldir.

Bir başlangıç mahiyetinde olmak üzere, mahdut dahi olsa, araştırmamızın sonuçlarını veriyoruz.

M A T E R Y E L ve M E T O D :

Baltalimanı Kemik Hastalıkları Hastanesinde klinik olarak tüberküloz teşhisiyle tedavi altında bulunan hastalardan operasyon ve bazında pansuman esnasında ayrılan soğuk abse ve kemik mafsalları

tolojik materyeli major antibiyotiklere rezistans tayini yapılan *Mycobacterium Tuberculosis* suşlarının menşini teşkil etmişlerdir.

Suşların izolasyonundan sonra rezistans tayini için endirekt rezistans yapılmaktadır. Direkt titrajdaki standard ekim yapılamaması, vasata eşit nispette basil düşmemesi sebebiyle sonuçların yanlış olması, kontaminasyonun fazla olması gibi mahzurların yanısıra soğuk abse materyelinde basil hemen hiçbir zaman muayyen bir fazlalıkta direkt müsbet olamayacağı için ve bilhassa bu son sebepten kemik-mafsal tüberkülozunda direkt rezistans tayini yapılamaz,

İzolasyonda olduğu gibi rezistans deneylerinde de Löwenstein - Jensen vasatını kullanıyor ve antibiyotik solusyonlarını koagülasyondan evvel ilâve ediyoruz. Titrajların değerlendirilmesinde limit olarak kabul edilen konsantrasyonlar SM için 10 mkg/ml., INH için 1 mkg/ml. ve PAS için de 10 mkg/ml. dir.

Okumalar onbeş günde yapılmakta, şahit tüpte üreme geciktiği hallerde bu süre uzatılmaktadır.

S O N U Ç L A R :

Kemik-mafsal tüberkülozlu hastalardan temin edilen 301 materyelin bakteriyolojik muayene sonuçları Tablo I de gösterilmiştir.

Tablo I — Bakteriyolojik muayene usullerine göre bulgular

Kültür	+		-		Kontamine		Toplam
	+	-	+	-	+	-	
Teksisif							
Materyel Sayısı	18	88	4	176	1	14	301
%	5,98	29,23	1,32	58,47	0,33	4,65	100,00

Kültürle izole edilmiş bulunan 106 *Mycobacterium Tuberculosis* suşunun üç major antibiyotige rezistans tayini sonuçları Tablo II dedir.

Tablo II — Kemik-mafsals tüberkülozu menşeli 106 suşun antibiyotiklere rezistans durumu

	Hassas üç Antibiyotiğe	R E Z I S T A N							Toplam
		Bir Antibiyotiğe			İki Antibiyotiğe			Antibiyotiğe	
		SM	INH	PAS	SM INH	SM PAS	INH PAS	SM INH PAS	
Sayı	82	6	8	3	4	1	0	2	24
%	77,36	5,66	7,54	2,83	3,77	0,94	0,0	1,88	22,64

Rezistans deneylerinden antibiyotiklerin cinsine göre aşağıdaki nispetler ortaya çıkmaktadır (Tablo III).

Tablo III — Kemik-mafsals tüberkülozu menşeli suşların antibiyotiğin cinsine göre rezistans durumları

	Yalnız Rezistan		Müşterek Rezistan		Genel Rezistan	
	Suş sayısı	%	Suş sayısı	%	Suş sayısı	%
SM	6	5,66	7	6,60	13	12,26
INH	8	7,54	6	5,66	14	13,20
PAS	3	2,83	3	2,83	6	5,66

T A R T I Ş M A :

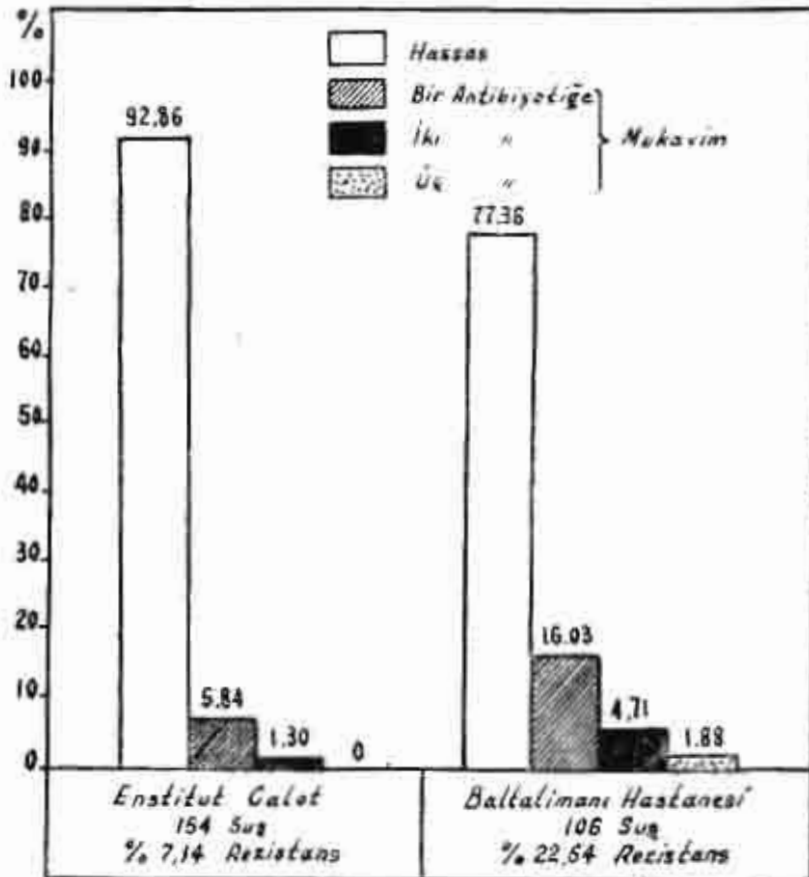
Demek oluyor ki araştırmamızda antibiyotiklere hassasiyetleri denenmiş Kemik-mafsals Tb. menşeli 106 Mycobacterium Tuberculosis suşunun, % 16,03 ü bir antibiyotiğe, % 4,71 i iki antibiyotiğe, % 1,88 i üç antibiyotiğe olmak üzere, % 22,64 ü mukavim bulunmuştur. (24 suş). Ayrıca suşların % 12,26 sı SM ye, % 13,20 si INH a ve % 5,66 sı da PAS a mukavimdir.

Memleketimizde kemik tüberkülozunda rezistans araştırması ile ilgili neşriyata rastlamadık.

da 1954 - 1957 süresinde kemik-mafsal Tb. menşeli 154 süşün hassasiyetini denemiş, % 7,14 nispetinde rezistans tespit etmişlerdir (11 süş). Bunların % 5,84 ü bir antibiyotiğe, % 1,30 u iki antibiyotiğe ve % 0,01 da üç antibiyotiğe mukavimdir. Antibiyotiğin cinsi bakımından rezistans nispetleri SM için % 7,14, İNH için % 0, PAS için de % 1,30 dur. Mukavim süşlerin 4 tanesi önceden antibiyotik tedavi yapılmamış veya çok az süre yapılmış hastalardan izole edilmişlerdir. Araştırmacılar bunların önceden rezistan basillerle primoenfekte olduklarını düşünmektedirler.

Bizim çalışmamızın bu safhasına kadar materyel temin edilen hastaların önceki antibiyotik tedavi sürelerinin kesinlikle tespitine imkân bulunamamıştır. Ancak ekseriyetinin takriben birkaç aylık preoperatif antibiyotik kürüne tabi tutulduklarını biliyoruz.

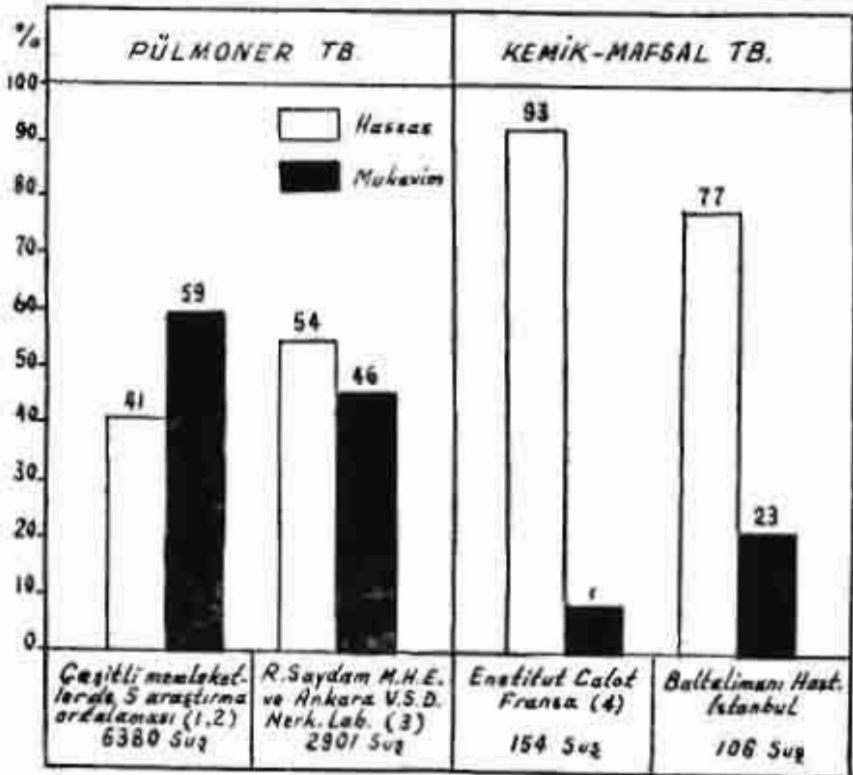
Her iki araştırmanın sonuçları mukayeseli değerler halinde Şekil I de görülmektedir.



Şekil : 1 - Kemik - mafsal tüberkülozu menşeli Mycobacterium Tuberculosis süşlerinde antibiyotiklere rezistansın iki araştırmada mukayeseli değerleri.

Sonuçların belirli bir ölçüde farklı buldukları kolaylıkla müşahade ediliyor. Bununla beraber kemik tüberkülozunda antibiyotiklere rezistansın hastalığın diğer şekillerine kıyasla daha az bulunduğu da bir vakaadır. Şöyleki : Pülmoner tüberkülozda son yıllara ait araştırmalarda Fransa'da % 37, Amerika'da % 51, Japonya'da % 86, Brezilya'da % 91 (1), Finlandiya'da % 34 nispetinde mukavim suş tespit edilmiştir (2). Ankara'da yapılan bir araştırmada ekseriyeti pülmoner kabul edilebilecek 2901 suşun % 46 sı mukavim bulunmuştur (3).

Pülmoner tüberküloz ile kemik tüberkülozunun rezistans durumları arasındaki bariz fark basit bir kıyaslama halinde Şekil 2 de görülebilecektir.



Şekil : 2 - Pülmoner tüberküloz ile kemik - mafsals tüberkülozu arasında antibiyotiklere rezistans durumları bakımından mukayese

Nazarî olarak herhangi bir lezyonda mutasyon şeklinde mukavemetin teşekkülü için basil fertlerinin çok sayıda ve çoğalmalarının da çabuk olması gerekmektedir. Bilhassa kavernli kronik pülmoner lezyonlarda rezistan suşların çıkması ihtimali çok fazladır. Aksine, tüberküloz basili için gayrimüsait metabolizma şartları sebebiyle, ayrıca fakir ve çoğalmaları da zayıf basillerin bulunduğu kemik-mafsal lezyonlarında rezistanların görülme riski az ve dolayısıyla mukavemet problemi nispeten ehemmiyetsiz olmaktadır. Bu sebepten tüberkülozun bu şekilde antibiyotik tedavi, asgari bir yıl olmak üzere, uzun süreli olmalıdır. Uzun tedaviyi icabettiren ikinci bir sebep de kemik lezyonlarında basil çoğalma şiddetinin az olması dolayısıyla antibiyoterapinin nispeten az müessir bulunmasıdır (4).

Çevresindeki avasküler histolojik bariyer sebebiyle kemik lezyonunun, akciğer lezyonuna kıyasla, antibiyotikler için daha az diffüziibl olduğu telakkisi hâlen bir dereceye kadar revaçtadır. Dolayısıyla kemik-mafsal tüberkülozunun tedavisinde, ayrı ayrı olmak üzere, konservatif şekilde antibiyoterapinin (6) ve fokal müdahalenin (7) müsait sonuçları bildirilmektedir.

Ö Z E T :

301 Kemik-mafsal tüberkülozlu hastanın soğuk abse materyelinden izole edilen 106 Mycobacterium Tuberculosis suşunun major antibiyotiklere mukavemetleri araştırılmış, % 16,03 ü bir antibiyotiğe, % 4,71 i iki antibiyotiğe ve % 1,88 i de üç antibiyotiğe olmak üzere, % 22,64 nispetinde rezistan suş tespit edilmiştir.

Antibiyotiğin cinsine göre mukavemet nispetleri SM için % 12,26, INH için % 13,20 ve PAS için de % 5,66 dır.

Araştırma sonucuna göre, kemik-mafsal tüberkülozunda antibiyotiklere rezistans, pülmoner tüberküloza kıyasla, bariz şekilde düşük nispetlerde bulunmaktadır.

The Frequency of Drug - resistant Tubercle Bacilli in Bone and Joint Tuberculosis

Dr. Vedat ONAN

Baltalimanı Bone Diseases Hospital,
Istanbul

S u m m a r y :

In this study, 106 strains of Mycobacterium Tuberculosis isolated from bone and joint tuberculous patients in Baltalimanı Hospital were essayed for SM, INH and PAS resistance.

22,64 % of the strains, in the determination of drug resistance, were resistant to one or more of the three antituberculous agents. Of these, 16,03 % showed resistance to a single drug, 4,71 % to two drugs, and 1,88 % to three drugs.

It was observed that, the rate of drug-resistant tubercle bacilli in bone and joint tuberculosis was obviously less than the rate in pulmonary tuberculosis.

L I T E R A T Ü R

- 1 — GERZSTEN, E., BRUMMER, D.L., ALLISON, M.J., HENCH, M.E., 1963, Increased Resistance of Mycobacterium Tuberculosis to Drug Therapy. J.A.M.A. vol. 185 No. 1 July 6
- 2 — VIRTANEN, S., 1962, Acta Tuberc. Scand. 42,2 (Am. Rev. of Resp. Diseases 88 - 4, 1963 abstracts)
- 3 — GÜRSEL, A., ÖZER, T., 1963, Tüberküloz Depistaj ve Mücadelesinde Bakteriyooloji Laboratuvarının Değeri, T.H. ve T.B.D., XXIII, 3
- 4 — DURIEZ, J., DEBEAUMONT, A., 1957, A Propos du Traitement Antibiotique de la Tuberculose Osseuse. Considérations Bactériologiques, Revue de Chirurgie Orthopédique, Tom 43, No. 3-4
- 5 — VIDINEL, İ., 1959, Dördüncü Türk Tüberküloz Kongresi, Ankara
- 6 — STEVENSON, F.H., MANNING, C.W., 1962, Tubercle 43 : 406 - 411 (Am. Rev. Resp. Dis., 1963, 88 - 4 abstracts)
- 7 — SHAW, N.E., THOMAS, T.G., 1963, Brit. Med. J., 5324 : 162 - 1964 (Am. Rev. Resp. Dis., 1963, 88 - 4, abstracts)

FLORESAN ANTİKOR TEKNİĞİ

Doç. Dr. Ekrem GÜLMEZOĞLU

A.Ü. Hacettepe Tıp ve Sağlık Bilimleri Fakültesi
Mikrobiyoloji Doçenti

Floresan antikor tekniği (F.A.T.) son on sene içinde gerek mikrobiyoloji teşhis laboratuvarlarında ve gerekse araştırma laboratuvarlarında geniş tatbikat sahası bulan bir metodur.^{1,2} Bu yazıda kısaca tekniğinden ve şimdiye kadar alınan neticelerden bahsedilecektir.

Floresan antikor tekniğinin esası bir antijen-antikor **birleşme** reaksiyonudur. Birçok serolojik reaksiyonlarda antijen-antikor birleşmesini, değişik şekildedeki tezahürleri ile anlıyoruz (Aglütinasyonda flokonlar teşekkülü, kompleman birleşmesinde hemolitik sistemde hemoliz olmaması gibi). F.A. tekniğinde ise antijen-antikor birleşmesi, floresan boyalar ile birleşmiş antikor molekülünün mikroskop altında floresans veren bir görünüm vermesi ile anlaşılır. Bazı floresan boyalar ile protein molekülünün birleştirilmesi bugün güç bir iş değildir (konjugasyon) ve bu birleşme neticesi protein molekülünün biyolojik ve immunolojik vasıflarında bozulma olmamaktadır. F.A. tekniğinin tatbikinde iki hususiyet vardır :

I. Floresan boyalar ile antiserumların boyanması (konjugasyon).

II. Muayyen ışık kaynağı ve filtreler ilâve edilmiş âdi mikroskopta, konjuge antiserum ile boyanmış preparatların tetkik edilmesi.

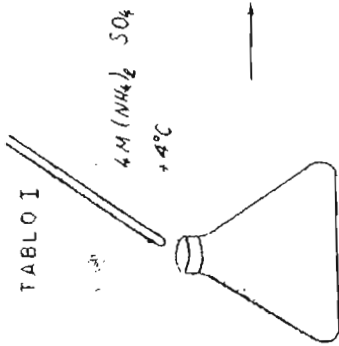
I. Antiserumların konjugasyonundan bahsetmeden evvel, **fluorescence** tâbirinden ve floresan boyalardan kısaca bahsetmek yerinde olur.

Fizikte bir molekül tarafından bir ışığın absorbe edilmesine **Photoluminescence**, absorbe edilen ışığın 10^{-4} saniyeden daha az bir

zaman içinde tekrar geri verilmesine **Fluorescence** ve eğer bu zaman 10^{-4} saniyeden daha uzun ise bu olaya da **phosphorescence** denmektedir. Bu absorpsiyon ve geri verme elektromagnetik bir dalga olan ışıkta bir enerji kaybuna sebep olmaktadır. Enerji kaybı kendini ışığın dalga boyunda uzama şeklinde gösterir. Bu bakımdan floresan ışık kendini çıkartan ışıktan daima daha uzun bir dalga boyuna sahiptir (Stokes Kanunu). Bu sebepten, yeşil-sarı bir fluorescence temini için U.V. veya mavi ışık kullanılması lâzımdır. İyi bir floresan ışık elde etmek için sadece lâmbanın verdiği ışık spektrumu kâfi değildir, aynı zamanda, kullandığımız boyanın absorpsiyon bandlarının da ışık spektrumuna uyması lâzımdır. İlk kullanılan floresan boya fluorescein isocyanate'dir.⁸ Bu boya maddesinin bazı mahzurları vardır; bunlar, toz halinde elde edilememesi stabil olmaması ve protein ile konjugasyon ameliyesinin oldukça komplike bulunmasıdır. 1958 senesinde Riggs ve arkadaşlarının⁹ fluorescein'in değişik bir tuzunu kullanmaları, bu tekniğin daha çok tatbikat sahası bulmasına yardım etmiştir. Bu fluorescein'in isothiocyant (FITC) tuzudur. Bu madde toz halinde elde edilebilmiştir, oldukça stabildir ve protein konjugasyonunda büyük bir kolaylık sağlamıştır. FITC sarı bir toz olup, nem ve ışıktan korunursa bir seneye kadar oda hararetinde muhafaza edilebilir. FITC den başka denenmiş olan boyalardan Lissamine rhodamine B (RB200) de oldukça fazla kullanılmaktadır.⁹ 1-dimethylamino naphthalene - 5 - sulfonic acid (DANS) ve Rhodamine isothiocyantate ise daha az kullanılmaktadır. Lâboratuvarımızda en fazla kullanılan FITC dir. Burada da FITC ile antiserum konjugasyonundan bahsedilecektir. Tablo I de şematik olarak konjugasyon işlemi safhaları gösterilmiştir. Evvelâ konjugasyonda kullanılacak antiserum yüksek titrede olmalıdır. Bu, gerek konjugasyondan sonra titrede düşme husule gelmesinden,⁹ gerekse konjuge serum yüksek titrede olduğu takdirde, sulandırılarak kullanılabilmesi bakımından ehemmiyetlidir. Yapılan dilusyon non-spesifik boyanmanın azalmasında da rol oynar.

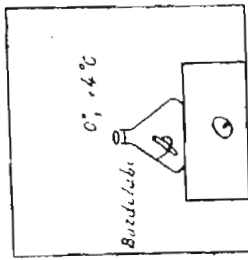
Konjugasyonda antiserumun gamma globulin fraksiyonunu kullanmanın iki faydası vardır: Birincisi, antikorlar umumiyetle gamma globulin fraksiyonunda olduğundan, lüzumlu olmayan diğer protein fraksiyonlarının konjugasyonu için fazla FITC sarfedilmemiş olur; ikincisi, albumin moleküllerinin FITC ile boyanması bazı müelliflere göre⁸ spesifik olmayan boyanmalara sebep olmaktadır. Gamma globulin fraksiyonunu ayırmak için yarı doymuş amonyum sulfat, etil

TABLO I



Antiserum hazırlanması

Serum γ globulinin ödülülmesi



globulinin konjugasyonu
ve dializi (5-7 gün)



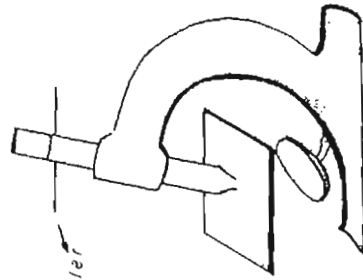
Konjuge antiserumun
reaksiyona girmemis
FITC den temizlenmesi



Preparatın boyanması



U.V ışık
kaynağı



Filtreler

alkol veya DEAE cellulose⁸ ile filtrasyon metodlarından biri kullanılabilir.

Yarı doymuş amonyum sulfat ile soğukta yapılan çöktürme metodu basit ve kâfi hassasiyettedir. Amonyum sülfat soğukta (4°C) ve yavaş yavaş (30 dakika), kullandığımız antiserum miktarı kadar ilâve edilmelidir. Husule gelen çökelek 1.75 M amonyum sülfat ile iki defa santrifüje edilerek yıkandıktan sonra orijinal serum hacmi kadar tamponlu tuzlu su ile eritilir ve amonyum sülfat ionlarından temizlenmesi için selofan tübe konup soğukta tamponlu tuzlu suya karşı dialize edilir. Dializ mayiinde amonyum ionu Nessler ayracı ile aranır, dializden sonra solüsyonun gamma globülin muhteviyatı elektroforez ile de kontrol edilebilir. Solüsyonun protein muhteviyatı Biuret metodu ile tâym edilir. Bu metod, basitliği ve hassasiyeti bakımından maksada uygundur. Konjugasyon için protein konsantrasyonu 1 cc. de 10 - 20 mg. arasında olmalıdır. Bazı araştırmacılar daha yüksek konsantrasyonlarda protein solüsyonu kullanmışlardır.⁷ Konsantre gamma globülin solüsyonları Bicarbonate - carbonate tamponu (pH 8.9) ve tamponlu tuzlu su ile 1 cc. de 10 - 20 mg. olacak şekilde sulandırılır. Bu sulandırmada (bicar-car.) tamponundan son hacmin onda biri olacak kadar ilâve edilir, bu tamponun ilâvesi solüsyonda alkaliniteyi temin eder. Gamma globülin solüsyonuna tampon solüsyonlar ile beraber, her mg. protein için 0.05 mg. FITC ilâve edilir. Bu karışım 24 saat bir erlenmeyerde manyetik karıştırıcı üstünde buzlukta bırakılarak karıştırılır ve müteakiben selofan tüp içine alınarak reaksiyona girmemiş FITC nin temizlenmesi için tamponlu tuzlu suya (pH 7.2) karşı dializ edilir. Dialize soğukta günde iki defa dializ mayii değiştirilerek 5 - 7 gün devam edilir. Dializ mayii U.V. lâmbası ile her gün kontrol edilir ve floresans vermeyinceye kadar dialize devam edilir. Reaksiyona girmemiş FITC nin solüsyondan temizlenmesi için değişik bazı metodlar da kullanılmaktadır. Coons ve Kaplan (1950)¹⁰ doku tozları ile absorpsiyonu diğer bazı araştırmacılar konjugasyondan sonra amonyum sulfat ile mükerrer presipitasyon,¹¹ aktif kömür ile absorpsiyon, sephadex (standardize edilmiş dextran) ile filtrasyon,¹² milipor filtrelerden süzmek gibi değişik metodlar kullanmışlardır. Bu metodların dializ metodu ile yapılan mukayeseli çalışmalarda bazı araştırmacılara göre sephadex kullanmak daha üstün bulunmuş, bazıları tarafından fark bulunamamıştır.¹³

Lâboratuvarımızda yalnız dializ metodu kullanılmaktadır. Direkt metod ile yaptığımız çalışmalarda non-spesifik boyanma fazla bir

güçlük yaratmamıştır.⁴ Fakat indirekt metod, kompleman boyanması metodu ve doku kesitleriyle yapılan çalışmalarda non-spesifik boyanma daha fazla ehemmiyet kazanmaktadır. Gene bu maksatla karışıt boyama metodu tavsiye edilmiştir.⁵ Bu metodda Rhodamine B 200 ile boyanmış sığır albumini - FITC ile konjuge edilmiş antiserum karıştırılarak preparat boyanır. Bu şekilde boyanan preparatta antijen sarı renge boyanmasına rağmen, zemin Rhodamine ile kırmızı renge boyanır ve spesifik olmayan boyanma bu şekilde azaltılabilir.

Konjuge edilmiş antiseruma son konsantrasyon 1:10,000 olacak şekilde merthiolate konur ve buz dolabında hemen kullanılmayacak ise dondurularak muhafaza edilir.

II. Konjuge edilmiş antiserum ile boyanan preparatın tetkik edilebilmesi için âdi mikroskoba ultraviole (U.V.) ve mavi ışık veren bir ışık kaynağı ve uygun filtrelerin konması lâzımdır. Karanlık saha ve aydınlık saha kondansörleri kullanılabilir. Aydınlık saha kondansörü ile daha kalın filtreler kullanılması lâzımdır. Bu husus için muhtelif filtreler denenerek uygun olanı bulunur. Lâboratuvarımızda aydınlık saha kondansörü ile 4 mm. Corning 5840 mavi filtre, karanlık saha kondansörü ile 2,5 mm. Corning 5840 mavi filtre kullanılmaktadır. Bu filtreler ile ışık kaynağı arasına fazla hararetten korumak için hararet emen filtre ve ayrıca objektif ile oküler arasına göz retinasını kaçak U.V. ışınlarından korumak için jelâtin filtre (Wratten 2B) konur. Işık kaynağı olarak kuvvetli U.V. ve mavi ışık veren basınçlı civa buharı ihtiva eden lâmbalar (Osram HB200), kömür arklı lâmbalara tercih edilmektedir. Tercih sebebi, civa buharlı lâmbaların devamlı olarak aynı kalitede ışık vermesidir. Mikroskobun diğer kısımlarının (ayna, mercekler, mercekler arası madde, lâm, lâmel ve sedir yağı) daha evvelden otofloresans verip vermediği kontrol edilmelidir. Tetkik edilen preparat floresan veren az antijen ihtiva ediyorsa, karanlık sahada tetkik etmek daha uygundur.

Mikroskopta görülen floresansın şiddetini değerlendirme izafidir. umumiyetle (1 +, 2 +, 3 + ve 4 +) şeklinde değerlendiriliyor. 3 + ve 4 + olarak değerlendirilen spesifik boyanma antijenin etrafında daha parlak bir floresans hâlenin görüldüğü hallerdir. Bu hâle görünümü bazı müelliflerce antijen ve antikor arasındaki spesifik birleşmenin delili,¹⁵ bazılarınca ise spesifik delil olarak kabul edilmemektedir.¹⁶ Floresan görünümün derecelendirilmesi için Goldman ve

Carver adlı müellifler 1961 de ışığa hassas fotometre kullanmışlardır." Bu suretle daha objektif bir değerlendirme mümkündür.

Yukarıda kısaca tekniğinden bahsettiğimiz floresan antikör tekniği, çalışma mevzuunun hususiyetine göre değişik metodlar şeklinde tatbik edilmektedir.

a) Direkt Metod :

Bu metodun tatbik şekli şematik olarak Tablo II de gösterilmiştir. Direkt metod bilhassa mikroorganizmlerin teşhisinde kullanılmaktadır. Bu metodda bir lâm üzerine hazırlanan nümune veya tetkik edilecek antijen havada kurutulduktan sonra aseton, etil alkol, metil alkol veya hararet gibi muhtelif vasıtalarından biri ile tesbit edilir. Fazla konjuge antiserum sarfetmemek için numunenin sürüldüğü saha mümkün olduğu kadar dar olmalıdır. Bu sahanın üstüne hazırlanmış konjuge antiserumdan bir damla konur. Kürdan veya temiz bir çubuk ile damla tesbit edilen saha üstüne yayılır. Konjuge antiserumun kurumaması için lâmlar, bir petri kutusu içine, ıslak bir pamuk ile beraber konup, kapağı kapatılır. Böylece nemli bir atmosferde 30 - 45 dakika enkübe edilir. Enkübasyon oda derecesinde yapılır. Bu zamanın bitiminde preparatlar tamponlu tuzlu su (pH 7.2) veya distile su ile yıkanır. Bir preparat yıkama kabında 4 - 5 defa su değiştirilerek 5 - 10 dakika hafifçe sallayarak yıkanır; yıkanmış preparat doğrudan doğruya tetkik edileceği gibi, üzerine lâmel konarak da tetkik edilebilir. Yıkama zamanı deneme ile kısaltılır veya uzatılabilir.

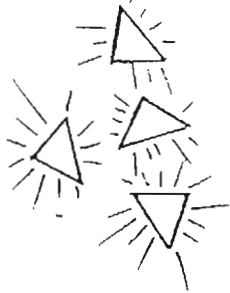
b) Önlenim Metodu :

Bu metod, umumiyetle direkt metodun kontrolü olarak kullanılmaktadır. Önlenim metodunda tesbit edilmiş preparat evvelâ konjuge olmamış antiserum ile muamele edilir, enkübe edilir, enkübasyon sonunda yıkanır ve fazla reaksiyona girmeyen antiserum atılır, aynı preparat bu sefer konjuge antiserum ile muamele edilir. Eğer direkt metodda görülen floresan boyanma spesifik olarak antijen-antikör arasında husule gelen bir reaksiyon neticesi ise, önlenim metodunda bu boyanma husule gelmez, çünkü aynı antijene karşı olan konjuge

2017

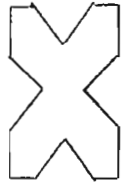
TABLO II

Direkt Metod



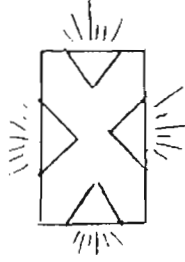
Boyanmış antikor

+



Antigen

=



Antigene birleşmiş
Boyanmış antikor
(Floresans mevcut)

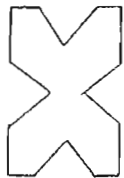
TABLO III

"Özelenin metodu"

1. Safha



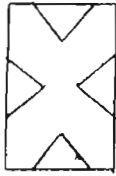
+



Antikor

Antigen

=

Antigen-antikor
birlesimi

2. Safha:



+



Boyanmiş antikor

Antigen. antikor
birlesimi

=

Antigen-antikor
birlesimiBoyanmış antikor tarafından
floresansın "önerilmesi"

olmamış antiserum daha evvel tatbik edildiğinden, ikinci olarak konan konjuge antiserum ile antijen birleşmez. Tablo III deki iki safha halinde tatbik edilen bu metod şematik olarak gösterilmiştir.

c) İndirekt Metod :

İndirekt metod da çok kullanılan bir metoddur. Bu metod ile meçhul antijenin boyanması mümkün olduğu gibi, serumda bilinmeyen antikorun da tesbiti mümkündür. Bu metodun iki safhası vardır: Birinci safhasında bilinen antijen bir lâmda tesbit edildikten sonra, meçhul serum ile muamele edilir. Eğer bu serumda antijene uyan bir antikor mevcut ise antijen ile birleşir. Metodun ikinci safhasında antijen ile muamele edilen antiseruma karşı hazırlanmış ve konjuge edilmiş antiserum tatbik edilir. Birinci safhada antijen ile birleşmiş antikor, ikinci safhada tatbik edilen konjuge antiserum ile floresan bir boyanma gösterir. Bu suretle meçhul serumda bizce bilinen antijene karşı antikor mevcudiyeti gösterilmiş olur. Bilinmeyen antijenin tesbiti için bu sefer malûm antiserum kullanılır ve ikinci safhada bu antiseruma karşı hazırlanmış ve konjuge edilmiş antiserum ile meçhul antijenin identifikasyonu mümkün olur. İndirekt metodun bu ikinci tatbik şekli direkt metoda benzemektedir. İndirekt metodun kolaylığı muhtelif antijenlere karşı hazırlanan antiserumlar eğer bir cins hayvanda hazırlanmış ise, bu hayvanın serumunun gamma globülin fraksiyonuna karşı hazırlanmış ve konjuge edilmiş bir tek antiserum muhtelif antiserumların hepsine karşı kullanılabilir fakat direkt metoda nazaran mahzurlu tarafı daha fazla non-spesifik boyanma göstermesidir. İndirekt metod şematik olarak Tablo IV de gösterilmiştir.

d) Komplemanın boyanması metodu :

Bu metodu ilk defa Shepard ve arkadaşları denemiştir.²⁸ Bir tek komplemana karşı hazırlanmış antiserum..... meselâ kobay komplemanına karşı tavşanda antiserum hazırlanır ve bu antiserum konjuge edilir. Kompleman tesbit eden antijen-antikor birleşmelerinde antiserum hangi hayvan cinsine ait olursa olsun eğer kullanılan kompleman kobay komplemanı ise, yukarıda hazırladığımız konjuge edilmiş anti-kompleman serumu ile bu antijen-antikor birleşmesi tesbit edilebilir. Bu metodun kolaylığı bir tek kobay komplemanına karşı hazırlanmış antiserumun konjuge edilmesi kâfi ve en büyük deza-

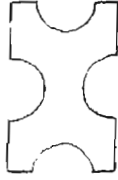
TABLO IV

İndirek Metod

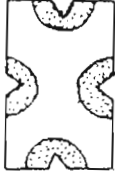
1. Safha



+



=



Antikor

Antigen - Antikor
birleşimi

(Tavşanda hazırlanmış)

(Floresans mevcut değil)

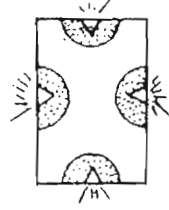
2. Safha



+



=



Boyamış antikor

Antigen - Antikor
birleşimi(Baska bir hayvanda
tavşan & globulinine
karşı hazırlanmış)Antigen - antikor birleşimi ve
antikor ile birleşmiş
boyalı antikor
(Floresans mevcut)

(Floresans mevcut değil)

TABLO V

Kompleman boyanması metodu



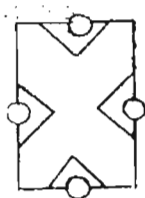
Kompleman ve antikor

+

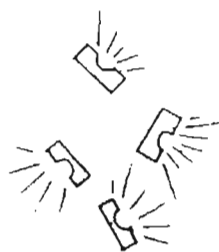


Antigen

=

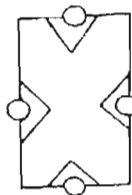


Antigen-antikor ve Komplemanın birleşmesi



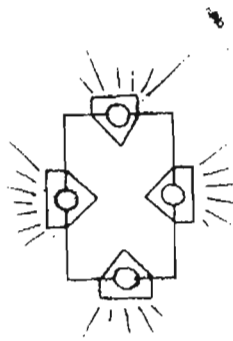
Boyanmış antikompleman antikor

+



Antigen-antikor ve Komplemanın birleşmesi

=



Antigen-antikor-kompleman ve boyalı antikompleman antikorun birleşmesi (Fluoresans mevcut)

vantajı, direkt metoda nazaran daha fazla non-spesifik boyanma göstermesidir. Goldman ve Shepard, bu metodu kullanarak R. Moo-seri ile yaptıkları çalışmada rutin kompleman birleşmesi testine nazaran daha yüksek titrede antikor tesbit etmişlerdir. Bu metodun tatbik şekli şematik olarak Tablo V de gösterilmiştir:

Kısaca bahsettiğimiz F.A. tekniğın muhtelif tatbik şekillerinde en fazla üzerinde durulan boyanmanın spesifikliğıdir. Bu bakımdan her konjuge edilmiş antiserum bu bakımdan kontrol edilmelidir. Konjuge antiserumlar :

- 1 — Antijenik benzerliğı olmayan hallerde boyama husule getirmemelidir.
- 2 — İndirekt ve kompleman boyanması metodlarında spesifik antiserum yerine normal serum kullanıldığında boyama husule gelmemeli.
- 3 — Önlenim metodu, direkt metodun kontrolu olarak kullanılmamalıdır.
- 4 — Homolog antijen ile absorbe edilen konjuge antiserum boyama husule getirmemelidir.

F.A. tekniğı mikrobioloji sahasında mikroorganizmlerin identifikasyonunda, steril çalışma mecburiyeti olmaması, organizmin canlı olmasa da identifiye edilebilmesi ve kısa zamanda netice alınması gibi halihazırda kullanılan metodlara üstünlüğü vardır.

Tablo VI de mikrobioloji sahasında yapılan çalışmalardan alınan neticeler hülâsa olarak gösterilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi Beta hemolitik streptokok Grup A,¹⁷ E.E. coli,^{18,19} B. pertussis,²⁰ Frengi,^{21,22} Kuduz,²³ Toxoplasmosis,²⁴ M. pneumoniae,²⁵ Sıtma²⁶ teşhisinde rutin olarak kullanılan metodlar ayarında veya onlardan daha iyi neticeler alınarak teşhis lâboratuvarlarında kullanılmaktadır. Diğer mikroorganizmler ile yapılan çalışmalar henüz kıymetlendirilmemiş veya çapraz boyanmanın fazla olması dolayısıyla rutin teşhis lâboratuvarlarında kullanılması tavsiye edilmemektedir.^{1,2} Lâboratuvarımızda şimdiye kadar iki çeşit mikroorganizmin identifikasyonunda F.A. tekniğini kullandık. Birisi E.E. coli olup, E.E. coli 9 tipi ile tavşanlarda hazırladığımız OB antiserumlarını FITC ile konjuge ettik ve bu konjuge antiserumlar ile ishal şikâyeti olan çocukların gaita nümunelerini tetkik ettik. Şimdiye kadar kullanılan rutin kültür teşhis metodlarıy-

Tablo VI

F.A.T. ile tetkik edilen organizmlerin listesi (*)

Bakteri	Virus	Mantar	Parazit
Beta hem. Streptokok	Influenzae	H. Capsulatum	Endamoeba coli
Prömökok	N.D. Virus	B. Dermatitiz	E. Histolytica
Gonokok	Kabakulak	C. Neoformans	T. cruzi
Meningokok	Adeno	C. Albicans	Toxoplasma gondii
Mimcae	Mycoplasma	S. Schenkii	Paramoecium
Salmonella	Pneumoniae		T. Vaginalis
Shigella	Kazamik		Plasmodium
Proteus	Camne distemper		Schistosoma
V. cholera	H. Simplex		Trichinella spiralis
E.F. coli	Vaccinia		
L. Monocytogenes	Varicella		
Erysip. Inalidosa	Psittacosis		
P. Pestis	Kuduz		
M. Pseudomallei	Pollomyelitiz		
Brucella	Shope papiloma		
B. Pertussis	Polyoma virus		
H. Influenzae B	R. Mooseri		
Mycobacterium	Cox. burnetti		
Leptospira			
T. Pallida			
M. Lepra			
Borrelia			

O : F.A.T. teşhis için kullanılabilir.

+ : F.A.T. kullanılması henüz tecrübe edilmiyor veya tavsiye edilmiyor.

(*) : Tablodaki mikroorganizmler için Literatür malûmat 2 nolu literatürde mevcuttur.

le yapılan mukayesesinde her iki metod ile alınan neticeler % 83.2 nisbetinde birbirine uygun sonuç vermiştir. % 14.3 nisbetinde kültür metodu ile menfi olan numunelerde F.A.T. ile müsbet bulgu tesbit edilmiştir. Kültür müsbet olup da F.A.T. menfi olan haller % 2,5 nisbetindedir. Gerek bu çalışma,⁶ gerek dış memleketlerde¹⁰,¹⁰ yapılan diğer çalışmalar F.A.T. nin E.E. coli rutin teşhis metodu olarak kullanılacağını göstermektedir. F.A. tekniğini kullanarak yaptığımız ikinci çalışma difteri antitoxini iledir. Difteri antitoxinini FTTC ile konjuge ederek difteri şüpheli olan hastaların boğazından eküvyon ile alınan nümuneler konjuge antitoxin ile boyanarak tetkik edilmiştir.²⁰ Halihazırda kullanılan kültür metodu ile yapılan mukayesesinde, konjuge antitoxin ile yapılan identifikasyon büyük nisbette menfi sonuç vermiştir. Kültür metodu ile müsbet bulduğumuz 8 vak'ının ancak ikisinde F.A. tekniği ile müsbet netice alınmıştır. Bu hususta münakaşa 30 no.lu literatürde verilmiştir. Bakteriler ile yapılan klinik tatbikat yanında virus hastalıklarında F.A.T. teşhis metodu olarak az kullanılmıştır. Virus hastalıklarında hastadan alınan nümunenin direkt olarak tetkiki yerine daha ziyade doku kültürlerine ekim yapıldıktan sonra F.A.T. tatbik edilmektedir. Virus enfeksiyonlarında teşhis maksadından ziyade virus antijenin hücrenin sitoplazma veya çekirdekte husule gelişi veya virus hastalıkları patojenesinde virus antijenin vücut hücrelerine dağılımını tesbit için kullanılmaktadır.²¹

Virus enfeksiyonlarda doku kültürlerinde sitopatogenik etkinin husule gelmediği hallerde virus antijenin gösterilmesinde, ayrıca tümör yapan virus çalışmalarında, «Lysogenic Phage» enfeksiyonlarını, enfeksiyon ajanlarının dışında yabancı antijenler vücuda zerk edilerek bunların takibi yapılabilmektedir.²² Otoimmün veya kollagen hastalıklar dediğimiz bir grup hastalıklarda doku antijenlerinin lokalizasyonları veya muayyen organ antijenlerine karşı antikörlerin tesbitinde kısmen muvaffakiyet ile kullanılmıştır.²³ Ayrıca muhtelif hormonların,²⁴ enzimlerin doku hücrelerinde lokalizasyonu, organa spesifik maddeleri, bağ dokusu komponentlerinin tesbitinde, kan hücreleri ve kan grubu antijenleri plâzma proteinlerinin tesbitinde de kullanılmaktadır. Son zamanlarda tümoral dokularda husule gelen antijenik değişmelerin tesbiti ile tümörlerin teşhisinde kullanılması denmektedir. Bu mevzulardaki geniş literatür malûmat 1 ve 2 no.lu literatürde mevcuttur.

Fluorescent Antibody Techniques

This paper deals with some of the technical aspects of conjugation of antisera to fluorescent materials. The various staining methods by direct, indirect, complement staining and inhibition are discussed. Some of the results of studies in this laboratory are mentioned briefly, specifically in respect to *E. coli* and *C. diphtheriae*. Some of the advantages and disadvantages of this technique are given.

L I T E R A T Ü R

1. Cherry, W.B., Goldman, M. ve Carski, T.R. : Fluorescent antibody techniques in the diagnosis of communicable diseases, U.S.D.H.E.W. Public Health Service Publication, No: 729, 1960.
2. Nairn, R.C. : Fluorescent Protein Tracing, E. and S. Livingstone Ltd. Edinburgh and London, 1962.
3. Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N. ve Berliner, E. : The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody, *J. Immunol.*, 45 : 159, 1942.
4. Riggs, J.L., Selwald, R.J., Burckhalter, J.H., Downs, C.M. ve Metcalf, T.G. : Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum, *Amer. J. Path.* 34 : 1081, 1958.
5. Borek, F., ve Silverstein, A.M. : A new fluorescent label for antibody proteins. *Arch. Biochem.* 87, 296, 1960.
6. Gülmezoğlu, E. : Çocuk ishallerinde enteropathogenic *E. coli* identifikasyonunda Floresan antikor tekniğinin kullanılması, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, Cilt : 6, (4), 206, 1963.
7. Nelson, D.J. ve Whitaker, A.J. : An outline of pathogenic *E. coli* fluorescent antibody methods. (Neşredilmemiş malûmat).
8. Marshall, J.D., Eveland, W.C. ve Smith, C.W. : Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent antibody technic with modification of its application, *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)*, 98 : 898, 1958.
9. Beutner, E.H. : Immuno fluorescent staining : The fluorescent antibody method, *Bact. Rev.* 25 : 49, 1961.
10. Coons, A.A. ve 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. Exp. Med.*, 91 : 1, 1950.

11. Vasquaz, J.J. ve Dixon, F.L. : Immunohistochemical analysis of amyloid by the fluorescence technique. *J. Exp. Med.* 104, 727, 1956.
12. Fothergill, J.E. ve Nairn, R.C. : Purification of fluorescent conjugates : comparison of charcoal and sephadex. *Nature (Lond.)* 198, 1316, 1963.
13. Porath, J. ve Flodin, P., Gel filtration : a method for desalting and group separation. *Nature (Lond.)* 183, 1657, 1959.
14. Goldman, M., ve Varver, R.K. : Microfluorimetry of cells stained with fluorescent antibody. *Exp. Cell. Res.* : 23, 265, 1961.
15. Whitaker, J.A., Nelson, J.D. ve Fink, C.W. : Fluorescent antitoxin test for the immediate diagnosis of diphtheria. *Pediatrics* 27, 214, 1961.
16. Moody, M.D. : Şahsi muhavere.
17. Moody, M.D., Ollis, E.C. ve Npdyke, E.L. : Staining smears with fluorescent antibody. *J. Bact.* 75, 357, 1958.
18. Nelson, J.D. ve Whitaker, J.A. : Diagnosis of enteropathogenic *E. Coli* diarrhoea by fluorescein-labeled antibodies. *J. Pediat.* 57 : 684, 1960.
19. Thomason, B.M., Cherry, W.B., Davis, B.R. ve Lebron, A.P. : Rapid presumptive identification of enteropathogenic *E. Coli* in fecal smears by means of fluorescent antibody. 3. field evaluation, *Bull. Wld. Hlth. Org.* 25 : 159, 1961.
20. Kendrick, P.L., Eldering, G. ve Eveland, W.C., : Fluorescent antibody techniques methods for identification of *Bordetella pertussis*. *A.M.A.J. Dis. Child.* 101, 149, 1961.
21. Deacon, W.E., Freeman, E.M. ve Harris, A. : Fluorescent treponemal antibody test. Modification based on quantitation (FTA-200). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.)* 103 : 827, 1960.
22. Fife, E.H., Bryan, B.M., Sanders, R.W. ve Muschel, L.H. : Evaluation of the Fluorescent treponemal antibody (FTA) test for syphilis, *Amer. J. Clin. Path.* 36, 105, 1961.
23. Goldwasser, R.A., Kissling, R.E., Carski, R.T. ve Hosty, T.S. : Fluorescent antibody staining of rabies virus antigens in the salivary glands of rabid animals. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 20 : 579, 1959.
24. Goldman, M., : Staining *toxoplasma gondii* with fluorescein - labelled antibody - I. The reaction in smears of peritoneal exudate. *J. Exp. Med.* 105, 549, 1957.
25. Liu, Ch. Studies on primary atypical pneumonia-III. A factor in normal serum which enhances the reaction between PAP virus and convalescent serum *J. Exp. Med.* 113, 111, 1961.
26. Dixon, F.J., Vasquez, J.J., Weigle, W.D. ve Cochrane, C.G. : Pathogenesis of serum sickness. *A.M.A. Arch. Path.* 65, 18, 1958.

27. Lacy, P.E. ve Davies : Demonstration of insulin in mammalian pancreas by the fluorescent antibody method. *Stain. Technol.* 34 : 85, 1959.
28. Tobie, J.O. : Detection of malaria antibodies Immunodiagnosis. *A.J. Trop. Med. Hyg.* 13 : 195, 1964.
29. Goldwasser, R.A. ve Shepard, C.C. : Staining of complement and modification of fluorescent antibody procedures. *J. Immunol.* 80 : 122, 1958.
30. Gülmezöğlü, E. ve Sayre, J. : The use of fluorescent labelled diphtheria antitoxin for the diagnosis of diphtheria cases. *Turkish J. of Pediat.* 6, 1964 (Baskıda)
31. Mims, C.A. : Aspects of the pathogenesis of virus diseases. *Bact. Rev.* 26 :30, 1964.

KOLERA'DA BAKTERİYOLOJİK TEŞHİS TEDAVİ VE KORUNMA ALANLARINDA YENİ GELİŞMELER

Dr. Necmettin AKYAY

R.S. Enstitüsü Serum - Aşı Şb. Md.

GİRİŞ :

1964 Mayıs ve Haziran aylarında CENTO karşılıklı teknik yardımlaşma fonundan yararlanarak batı ve doğu Pakistan'da kolera alanındaki yeni gelişmeleri incelemek fırsatını bulduk. Bu arada doğu Pakistanın merkezi Dacca'da Amerikalılar tarafından 1960 da tesis edilmiş olan SEATO Kolera merkezini ziyaret bizim için çok faydalı oldu.

Memleketimizde Birinci Dünya savaşından takriben yarım yüzyıla yaklaşan bir zamandanberi kolera görülmemiştir. Onbeş gün süren bu kısa tetkik gezisinde, incelemeye imkân bulabildiğimiz hususları kısa bir özet halinde yayınlamayı faydalı telâkki ettik.

Epidemiyolojik bilgiler :

Kolera epidemiyolojisinin esaslarını 1883 de R. Koch tesis etmiştir. Epidemiyolojik bilgilerimizde bu gün dahi bir çok boşluklar bulunmaktadır. Bu boşlukların mevcudiyeti hastalığın eradike edilmesine engel teşkil etmektedir.

Çeşitli iklim şartları, halkın çeşitli itiyatları, çevre sağlığının bozukluğu, halkın sosyal ve ekonomik durumu, epidemilerin meydana gelmesinde önemli rol oynamaktadır.

Mevsimler :

Uzak doğuda, doğu Pakistan ve batı Bengal (Calcuta ve çevresi), Thailand kolera endemi bölgesi kabul edilmektedir. Bu bölgeye

civar olan Hindistan'ın diğerk kısımları, Burma, Nepal, batı Pakistan, Afganistan koleranın tehdidi altında olup sık sık salgınların meydana geldiği yerlerdir (1).

Doğru Pakistan'da ve Thailand'da kolera epidemileri bir yıl içinde üçer ay devam eden iki sivrilik göstermektedir. Bunlardan biri Mart Nisan ve Mayıs ayları, ikincisi Ekim, Kasım ve Aralık'tır. Bu aylar dışında hastalık andemik olarak devam eder.

Mevsim bakımında kolera salgınlarının meydana gelmesinde rutubet ve yağmurların, muhitin hararet derecesinin önemi vardır. Doğru Pakistan'da ve tropik muntakalarda hararet derecesi yılın dokuz ayı 30 un üzerinde bulunmakta ve kışa raslayan üç ay ise hararet 15 - 20 arasında bulunmaktadır.

Yağmur mevsimlerinde rutubet nisbeti % 100, bu mevsimlerin dışında % 70 - 80 arasındadır. Bu itibarla doğru Pakistanı büyük bir enkübatör olarak tasavvur etmek mümkündür. Kolera vibriyonunun insan uzviyeti dışında yaşayabilmesi için bütün şartlar mevcuttur.

Doğru Pakistan'da 1948 - 1959 arasında koleradan 245.234 kişinin ölmüş olduğunu kaydetmek bu memleket için hastalığın ne kadar tahribkâr olduğunu anlatmağa kâfidir.

Thailand'da 1918 - 1939 yılları arasında 57.687 kişi hastalığa yakalanmış 39.224 ü ölmüştür. Ölüm nisbeti % 68 i bulmaktadır. Aynı memlekette 1943 - 1959 yılları arasında 38.170 kişi hastalanmış, 15.424 ü ölmüştür, bu devrede mortalite % 40 a düşürülmüş bulunmaktadır. 1959 salgınında ölüm oranı % 8 e kadar indirilmiştir. Bunda teşkilâtın kuvvetlendirilmesi, tedavi istasyonlarının çoğaltılması vesair ciddi çabışmalar mühim miktarda rol oynamıştır. (2)

Epidemiler arası foküsler :

Eir kolera andemi bölgesinde epidemilerin sık sık meydana gelmesi olağan ve sık görülen hallerdendir. Ancak bir salgın çıktıktan sonra epimiyolojistler hastalığın filiyasonunu tesbitte büyük müşkülâta uğramaktadırlar. Yapılan tetkiklerde hastanın, kasabasından, hatta köyünden dışarı çıkmadığı, mutad su ve gıda menbalarından faydalandığı tesbit edilmiştir.

Bu şartlar altında salgının nasıl meydana geldiğini izah hemen de inkânsız hale gelmektedir.

Epidemiler dışında kolera vakalarının hastahanelerde, dispenserlerde dizanteri, yaz ishalleri veya adı diyareler olarak teşhis edildiği, bu şekilde tedavi edildiklerini düşünmek yerinde olur. Epidemiler haricinde kolera vibriyonları karakter değiştirmekte, virülansları azalmakta ve hafif, okült bir salgın sürüp gitmektedir.

İşte muhtemelen bu şekilde seyretmekte olan bir hastalık, birçok faktörlerin tesiriyle epidemi halini almakta ve vibriyon virülans kazanmakta, bildiğimiz, korkunç, öldürücü salgınlar meydana gelmektedir.

Epidemiyolojide, salgınla salgın dışı olayları bu şekilde bağlamak, karanlık olan noktaları aydınlığa kavuşturmak belki mümkün olabilir.

İklim şartları :

Kolera vibriyonu, üreyebilmek için, muayyen bir hararet ve rutubet derecesine ihtiyaç gösterir. Doğu Pakistan ve diğer memleketlerdeki tropik iklim, vibriyonların insan uzviyeti dışında hayatını idame ettirebilme bakımından pek uygundur. Bu memleketlerde kolera senenin belirli aylarında salgınlar yapmaktadır. Tropik bölgelerde yağmur mevsimleri kolera epidemileri için sebep gösterilir. Halbuki öyle epidemi mihrakları vardır ki buraları yağmur alma bakımından pek fakirdir.

Büyük sağnak ve sellerin satıhta ve etraftaki pislikleri sürükleyerek suları kirlettiğini ve bu suretle epidemilerin meydana çıkmasına sebep olduklarını kabul etmek daha uygun bir görüştür kanısındayız (3).

Sanitasyon ölçüleri:

Asyada, koleranın andemik olarak bulunduğu bölgelerde çevre sağlığı bakımından en ufak bir tedbirin dahi alınmadığı tesbit edilmiştir. Halkın sosyal ve ekonomik seviyesi fevkalâde düşüktür. İçme ve kullanma sularının kontrolleri, bakımı bahis konusu değildir. Halkın cahil bulunması, çok fakir olması da bunlara eklenirse epidemilerin kolaylıkla meydana çıkabileceğini kabul etmek yerinde olur. Şehir ve kasabalarda dahi gıda maddeleri satışının kontrolü, suların ıslahı yönünde bir tedbir yoktur.

Bu faktörler ortadan kaldırılmadıkça kolera salgılarının bu memleketlerden yo kedilebileceğini, koleranın eradike edilebileceğini düşünmek daha uzun yıllar için bir hayaldir.

Kolera salgıları İkinci Dünya harbinden sonra pasifiği geçememiştir. Yalnız 1947 de Mısır'da kısa süren bir salgın tesbit edilmiştir.

Buna mukabil Doğu Pakistan'da 1938 den 1960 a kadar hiçbir yıl salgın eksik olmamış. 1960 da Hindistan'da müteaddit salgınlar görülmüştür.

Thailand'da da 1940 - 1943 ile 1950 - 1958 arasında hiç vaha görülmemiş, bunun dışında her yıl epidemiler çıkmıştır. 1960 da bu memlekette 38 vilâyeti içine alan büyük bir salgın olmuştur.

Yaş faktörü :

Koleraya daha ziyad egeñç kâhiller yakalanmakta, 30 - 50 yaşdakilerin nisbeti daha yüksek bulunmaktadır. Keza küçükler ve genç yetişkinler de hastalığın tehdi altındadır.

Çok yaşlı şahıslarda hastalık nadir görülmektedir. Erkekler kadınlara nazaran hastalığa daha çok yakalanırlar.

Şahsi faktörler :

Hastalığa yakalanmada şahsi faktörlerin de rolleri oldukça mühimdir. Aynı muhitte yaşayan aynı gıdayı ve suyu kullanan kimse-lerden bazılar hastalığa yakalanmamakta, bazılarında ise öldürücü seyretmektedir.

Salgının daha ziyade nehirlerde balıkçılıkla geçinen ve kirli nehir suyunu içen ve kullanan şahıslarda görüldüğü tesbit edilmiştir.

Bağışıklık :

Koleraya bir defa yakalanan şahsın tekrar hastalığa yakalanmayacağı kanaati hatalı bir görüştür. Müteaddit defalar koleraya yakalanmış şahıslar vardır. Kolerada ömür boyunca bağışıklık yoktur. Aşılı şahısların da koleraya yakalandığı oldukça sık görülmektedir.

Enkübasyon :

Kolerada enkübasyon devri umumiyet itibariyle çok kısadır. 6 - 24 saat arasında değişmekte, nâdir olarak 48 saat uzayabilmektedir. Vahim seyreden vakalarda enkübasyon süresi kısılmaktadır, 5 - 12 saatlik enkübasyonu olan vakalar ekseriya öldürücü olmaktadır. Orta derecede vakalarda bu devre 48 saattir. Enkübasyon süresiyle virülans arasında sıkı bir bağlılık bulunduğu tesbit edilmiştir. Sıhhatli insanlarda bu devre içerisinde herhangi bir hastalık belirtisi görülmemektedir.

KLİNİK

Hastahğin başlangıcı :

Hastalık mutad olarak son yemekten 5 - 12 saat sonra bağırsaklar boş iken başlar. Yarım veya bir saat zarfında geniş ve oldukça hafif bir ishalle hastalık kendini gösterir.

Hastalık seyri esnasında üç devir gösterir:

Birinci safha boşalmadır. Bu zamanda tipik piring suyu ishal vardır. İshal adedini hesabetmek güçtür. Her ishalde hasta takriben yarım ilâ iki litre su kaybeder. İshaller arası yarım ilâ bir saattir. Ağır vakalarda daha da sıklaşır. Orta vakalarda dışarı çıkma adedi 12 - 15, ağır vakalarda 20 - 30 dur. Bu devrede kusmalar da baş gösterir. Bunlar da adeta piring suyu ishal manzarası arzeder. Kusmalar bulantı ile gelmez. Her kusmada hasta 250 - 500 cc. mayi çıkarır. **Kusmak** balık kokar. İshal ve kusmalar koleranın tipik manzarasını ortaya koyarlar. Cilt soğuk ve yapışkandır. Nabız hissedilemeyecek kadar zayıftır. **Tachypne** mevcuttur. Yüz, ızdıraplı ve buruşmuştur. Gözler içeri çökmüş, dil temiz fakat kuru, tırnak dipleri siyanoze, ses kısalmıştır. Hasta endişeli ve huzursuzdur.

Hasta susuzluğunu giderebilmek için çılgınca su içme arzusu duyar. Hastada hypotention ve idrar zorluğu vardır. Bütün bu tezahürat kolerada dehidratasyonun müsterek alâmetleridir.

Kollaps safhası : Hastalıkta ikinci safhayı teşkil eder. Bu devrede kusma ve ishaller adet itibariyle azalmağa başlamıştır. Büyük bir susuzluk, dyspne, huzursuzluk mevcuttur. Nabız duyulamıyacak

kadar zayıftır. İdrar tutuluğu ve tansiyon düşüklüğü bariz bir şekilde artmıştır.

Hastada anurie teşekkül eder. Anürinin 24 - 48 saat devamı, çok vahim veya tedavi edilmemiş vakalarda görülür. Ölüm veya anürinin açılması anürinin devam müddetine bağlıdır. Kan tazyiki ishal ve kusmalar başladıktan sonra süratle düşmeye başlamıştır. (70/40) Bu hal dehidratasyonla beraber gider.

Kollaps devri orta şiddette vakalarda 12 - 24 saat sürer, çok vahim vakalarda daha da uzayabilir ve hastalık ölümle sonuç bulur.

Reaksiyon devri : Bu, kolerada üçüncü safhadır. Bu devir hafif vakalarda kendi kendine, tedavi edilenlerde tedavi sonucu teessüs eder. Nabız duyulmaya, tansiyon yükselmeye başlar, hasta yiyecek ve içecek ister. İdrar çok renklidir ve albüminiüri vardır. Bazı ahvalde kusma ve ishaller kısa bir süre için üç, dört saat arayla görülür. Bu hal bazan şiddetlenir, hasta kollapsa girer ve ölür. Çocuk koleralarında konvülsiyonlar çok görülür. Bazı ahvalde delir ve hallüsinasyonlar olur.

Lâboratuvar bulguları : Su kaybı ve dehidratasyon sebebiyle plâsmanın üçte biri, vahim hallerde yarısı kaybolur. Kan keşafeti yüksektir (1060 - 1066) bu sebeple entravenöz tuzlu su verilmesi zorlaşır. Eritrosit adedi 7 - 8 milyona, vahim hallerde 10 - 11 milyona yükselmiştir.

Mecmu günlük klorür iyonu kaybı ishalle 35, kusmayla 10 gramdır. Bunlar sodium, potassium ve calcium klorürlere aittir. Bu süratle kanda asit - alkali muvazenesi bozulmuştur, ihtiyat kalevilerinin mevcudu çok azalmıştır. Su kaybı idrar azalmasına, susuzluğa yol açar. Plasmadaki sodium klorürün azalması osmotik tevettürün azalmasına sebep olur, bu da hücre dışı mayilerin de azalmasına yol açar. Bu suretle periferik deveran bozuklukları ve progressiv bir asidoza yol açılmış olur. Keza su ve tuzların kaybı adale kramplarına, confusion mental'e yol açar. Metabolizma mahsullerini dışarı atılamaması, kanda birikmesine, netice olarak üremiye sebep olur.

Komplikasyonlar :

1 — Hyperpyrexie: Reaksiyon devresinde ve fatal terminus safhasında görülür. Deri hararet 39 - 40, rektal derece 41 civarındadır. Gözlerin kanlanması, baş ağrısı, sırayıcı nabız, ihtilaçlar, büyük kusursuzluk, görülür, bazı ahvalde hasta komaya girerek kaybolur.

2 — Üremie, idrar retansiyonu ile başlar. Toksinin doğrudan böbreklere tesiriyle husule gelmektedir. Anüri 10.-12 saat zarfında meydana çıkar, tedavi esnasında, bazı ahvalde reaksiyon devresinde de anüri görülür. Üremide gözler kanlı, dil paslı ve kurudur; kusma ve başağrısı vardır, tansiyon yükselir, hıçkık sık görülür, hasta derin bir komaya girer ve kaybolur. Kolerada ölüm sebeplerinin % 80 e yakın kısmı üremidir.

Bunlardan başka bronkopnömoni, penis ve skortum gangrenleri, kornea ülserasyonları tarif edilmiştir. Son yıl salgınlarında artık bu komplikasyonlar kaydedilmemektedir.

Ayrıncı teşhis :

Kolera, tipik araziyle diğer hastalıklarla pek karışmaz. Salgınlar dışında çocukların yaz ishalleri, basilli dizanteri vakaları, tropika malarjasının meydana getirdiği ishaller, bazı gıda zehirlenmeleri (bilhassa salmonella) botulinum, stafilokok ve streptokoklardan ileri gelen diyarelerle karışabilir. Bu hastalıklarda da pirinç suyu ishal ve kusmalar mevcuttur.

Bakteriyolojik teşhis :

Kolera vibriyonlarının morfolojik görünüşü üniform manzara göstermez. Asılı damlada adeta akar suda yüzen balıklara benzer, çok hareketli bir manzara gösterirler. Koleradan hareketli bir bağırsak bakterisi mevcut değildir. Kolera hastalarında bağırsak muhteviyatından direkt muayene ile % 50 vakada vibriyon tesbit etmek mümkündür. R. Kock 1894 Berlin kolerasında bu usulle teşhise varmıştır. Taze vakalarda ve ilk ishallerin tetkikinde direkt mikroskopi ile vibriyon görülür.

Salgın zamanlarında pek kolay olan bakteriyolojik teşhis, epideminin başlangıcında, sağlam portörlerde, insan dışı kolera membalarda, nekahatdaki hastalarda vibriyon tesbiti kolay olmaz.

Vibriyonların başlıca biyosimik özellikleri glukoz, mannitol, şükroz ve maltoza gaz husule getirmeden asit yapmak suretiyle tesirleridir.

Heiberg (1935 - 1936) hakiki vibriyonların mannitolü fermante ettiğini, arabinoza tesir etmediğini bildirmiştir. Bu hususiyetleri sebe-

bi ile vibriyonlar 6 gruba ayrılmışlardır. Hakiki kolera vibriyonları bu tasnifte birinci sınıfa dahildirler.

Bu vasıflardan başka kolera vibriyonunun nitratları nitrite çevirmesi suretiyle kolera kırmızısı taamifli, Voges - Proskauer reaksiyonu menfi olması (El Tor müsbet) hemolizin testinin menfi olması (El Tor müsbet) hususiyetleri arasındadır. Kolera kırmızısı reaksiyonu başka bakterilerle de meydana gelebileceği cihetle bu gün pek kullanılmamaktadır.

Serolojik özellikler : Madum olduğu üzere kolera vibriyonlarının H (thermolabile) ve o (thermostabile) iki antijeni mevcuttur. H antijenleri parakolera ve diğer patojen olmayan vibriyonlarla iştirak gösterir, bir özelliği yoktur. Fakat o antijenleri vibriyonlar için özellik arzeder. Vibriyonlar kendi özel O antiseronlarıyla agglütinasyon verirler. El Tor vibriyonunun antijen yapısı diğer patojen vibriyonları gibidir. Ogawatipine çok yakındır. Kolera vibriyonları İnaba ve Ogawa olmak üzere iki serolojik tipte toplanırlar. Biyosimik özellikleri aynı olduğu halde serolojik olarak ayrılırlar.

Şimdiye kadar patojen olmadığı söylenen El Tor tipi tamamen patojendir, bu tipte meydana gelmiş salgınlar tesbit edilmiştir.

Bakteriyolojik teşhis : Burada Dacca'daki Seato kolera merkezini kullandığı metodlar esas tutulmuştur. Hastadan ekuviyon ile rektal yolla dışkı numunesi alınır. Zenginleştirme üretim yerine ekilir. Üretim yeri şudur :

Celatine % 3, Sodyum klorüre % 1, Tryptocase % 1, sodyum thymoclate % 3.5. Ph. sı 8.5 a ayarlanır, Otoklavda sterilize edilir. Steril gartları altında litresine tellurite stok solusyonundan 1.5 cc. ilâve edilir.

Tellurite stok solusyonu telluritin distile sudaki % 0.5 mahlülünden ibarettir.

Ekuviyonla alınan numune bu zenginleştirme üretimyerine ekilir ve 37 derecelik etüvde 24 saat üremeye terkedilir. 18 - 24 saat sonra zenginleştirme üretimyerinden özeyle tek koloni düşürmek suretiyle Monsur vasatında ekilir. Bu üretimyeri, yukarıdaki sıvı vasata % 1.7 agar ilâve edilerek hazırlanmıştır. 24 saat sonra üreyen koloniler tetkik edilir. Şeffaf, parlak, saydam koloniler büyük bir çoğunlukla kolera kolonileridir. İnaba ve Ogawa spesifik aglütinan serumlarıyla hemda aglütinasyon yapılmak suretiyle tip tayin edilir. Zenginleştirme

üretim yerinden alınacak bir damlada özel karanlık saha yapan mikroskopla bakılmak ve hareketli vibriyonları görmekte diğer kültür muayenelerinin elüzümü kalmadan teşhise varmak mümkündür (4).

İngiliz mah olan ve yalnız karanlık saha yapan bu aparat (Cooke Trughton and Simmons Ltd. «Vickers group com.» Haxby RD, York, England) firması tarafından satılmaktadır.

Kültürle yapılan paralel çalışmalarda karanlık saha yoluyla teşhis ile kültür sonuçlarının aynı olduğu tesbit edilmiştir. Hüdüd kaplarında, hava meydanlarında uzun bakteriyolojik araştırmalara lüzümü kalmadan, emin ve kısa yoldan portör araştırmalarını yapmak bu cihazla imkân dahiline girmiş bulunmaktadır.

Yukarıda bildirilen Monsur üretimyerinin yerine daha basit olan (gelatine - agar) üretimyeri de kullanılabilir. Bu vasatın terkihi:

Agar % 1.6, Gelatine % 3, sodium chloride % 1 trypticase % 1 den ibarettir.

Bu metcdlar ve üretimyerleri Dacca'daki Seato kolera merkezinde uygulananlardır.

1959 - 1959 Thailand salgınında üç çeşit üretimyeri kullanılmıştır : **Bunlardan birincisi** : laktoz - bromtimol mavili agardır. Bromtimol mavisi (% 0.5 alkolik solüsyonu) % 1, % 1 laktoz, Beef extract'a eritilmiş % 3 agar. Ph. 7.6 ya ayarlanır. Bu üretimyerinde koloniler nemli, şeffaf ve laktoz menfidir.

İkinci üretimyeri insan kanlı beef extract agardır. % 2 beef extract ve agarla % 4 insan kanını ihtiva eder. Nihai Ph. sı 8 dir. Koloniler şeffaf olup etrafında hemodigestic hâle bulunur.

Üçüncü üretimyeri : % 0.5 thaurocolate ihtiva eden beef extractlı agardır. Burada da kolera kolonileri saydam, parlak, renksiz, şeffaftır.

Bu üretimyerleriyle 1958 Bangkok salgınında 811 hastadan 360 ında vibriyon izole edilmiştir. Keza aynı yerde 1959 salgınında ise 1364 hastadan 440 vakada vibriyon ayrılmıştır.

Prognoz :

Kolerada prognoz tedavinin erken başlamasına hastanın derhal bozulan elektrolit balansunun tanzimine ve kaybolan suyun telâfisine

bağlıdır. Kolerada eski salgınlarda ölüm nisbeti % 70 - 80 arasındaydı.

Bu gün tedavi metodlarının geliştirilmesi, tedavi merkezlerinin çoğaltılıp hastanın ayağına kadar gidilmesi, erken müdahale sebebiyle son Thailand salgınında mortalite % 8 e kadar indirilmiştir. Cholera sicca denilen ve nadir görülen vakalarda hastalığın başlangıcıyla ölümü arasında 2 - 3 saat kadar zaman vardır. Bunlarda kusma ve ishal de görülmez. Bu vakalar daima ölümle sonuçlanır.

Tedavi :

Kolerada hastalar, dehidratasyondan öldükleri, çok büyük süratle su kaybettikleri için tedavi de kaybolan suyun, bozulan elektrolit muvazenesinin yerine getirilmesi esasına dayanır. Mayi damar yoluyla damla damla verilir. Fazla mayi verilmesi de tehlikeden salim değildir. Umumi hal, idrar miktarı, tansiyon, kanın rengi, akciğerlerin daimi kontrolü mayi verilmesinde bize rehberlik eder. Verilen tuzlu su umumiyet itibariyle izotoniktir.

Damar yoluyla verilecek mayi litrede 6.8 sodium chlorure ve 18.2 gram sodium bicarbonate ihtiva eder. **Tatbikata başlarken ilk 15 dakika yarım litre kadar hipertonic tuzlu su verilir.**

Pratik olarak hastanın ishalle kaybettiği miktarda mayii damar yoluyla ilâve etmek icabeder. **Bunun için hastalar özel olarak yaptırılmış karyolalarda yatırılır, altlarında ölçülü kovalar vardır.** Buradan çıkardığı ishal hesabedilerek kayıp damar yoluyla tamamlanır. Hasta aynı zamanda daimi hekim kontrolündedir, nabız, tansiyon ve akciğer ödemi ihtimalleri tetkik edilir. Bazı ahvalde verilen mayie 1/1000 nisbetinde adrenalin solüsyonundan 1 cc. ilâve edilir. Ağır vakalarda günde 4 - 5 litre mayi vermek icabeder.

Bir vakanın tedavisi için vasati olarak 12 - 24 litre mayi verilmesi lâzımdır, miktar hastanın umumi ahvaline göre değişir.

Üremi vakalarında intravenöz periston verilmesi fayda sağlar. Kolerada tedavisi esas itibariyle basittir.

Mayi tedavisinde sodium bicarbonate yerine sodium lactate da kullanılabilir. Tedavide potassium kaybının da büyük önemi olduğu için ağız yolu ile potassium klorür verilmesi de lâzımdır. Bundan başka hypoglycemie de önemli arızalardan olduğu cihetle serum glikoze

zerkeleri veya mümkün olduğu takdirde ağız yoluyla verilmesi lüzumludur. Hyperpyrexie'ye karşı rektal yolla buzlu su verilmesi münasib olur.

Kolera'da, hastalar hastalığın başlangıcında 2-4 saat sonra vasküler kollapsa girerler, müdahale edilmezse kısa zamanda ölümler sonuqlanır. Bu komplikasyonla mücadele edilmesi mühimdir.

Antibiyotikler : Kolera vibriyonlarına karşı antibiyotiklerin etkisi eskidenberi in vitro ve in vivo denenmiştir (5). Son zamanlarda ağız yoluyla veya entavenöz Oxytetracycline verilmesinin iyi sonuçlar verdiği, erken tatbik edildiği zamanda diyare müddetini kısalttığı ve vibriyonları kısa zamanda yok ettiği tesbit edilmiştir (6).

Scato kolera merkezinde tetracycline tedavisi her hastaya uygulanmaktadır. 6 saatte bir 250 mgr. terramycin ağız yoluyla, 8 saatte bir de aynı miktar entavenöz tatbik edilmektedir. Bununla beraber vitamine C, thiamine ve B complex verilmesi tavsiye edilmektedir (7).

Yıllarca kolera mücadelesinde çalışmış mahalli otoriteler antibiyotik tedavisine fazla önem vermemekle beraber, Amerikalılar bu tedavi üzerinde ısrarla durmakta ve tavsiye etmektedirler.

Patogenez :

Koleradan ölmüş şahıslarda yapılan otopsilerde hastaların böbrek komplikasyonlarıyla ve derin su kaybı sonucu öldükleri tesbit edilmiştir.

Böbreklerde tubular nekrozlar ve keza böbrek üzerinde nekrotik lekeler tesbit edilmiştir. Bunların su kaybına ve potassium iyonu noksanına bağlanması uygun olur. Bağırsaklarda bir hyperemie'den başka mühim bir şey yoktur. Şok sonucu ölen hastalarda kalb adalesinde patolojikal lekeler bulunur. Bazı vakalarda miyokardit tesbit edilmiştir.

Prophylaxie :

Kolera aşısı 1885 denberi tatbik edilmektedir. Bu tarihtenberi aşı mevzuunda çok çalışılmış ve bir hayli geliştirilmiştir.

Bu gün elimizdeki aşı 1 cc. de 8 milyar vibriyonu ihtiva eden ve 4 milyarı inaba, 4 milyarı ogawa suşuyla hazırlanmıştır. Aşının verdiği bağışık % 100 değildir. Bir orantı kurmak icabederse % 70 olarak kabul edilebilir.

Aşılılar arasında hastalığa yakalananlar seyrek değildir. Pakistan'da yapılan incelemelerde aşının hastalığa yakalanma şansını azalttığı ve fatal sonuçları aşıllarda oldukça seyrek görüldüğü tesbit edilmiştir. Aşılı şahıslarda hastalığa yakalananlar % 1.3 iken aşılı olmayanlarda, şahit olarak bırakılanlarda % 3.10 olduğu görülmüştür.

Japonya'da Tokyo epidemisi (1916) sırasında 300.924 kişi aşılanmış, bunlardan ancak % 0.13 ü hastalığa yakalanmıştır. Aşılı olmayanlarda bu nisbet % 1.85 di.

Yine Japonya'da Osaka salgınında (1920) 231.540 kişi birinci, 380.307 kişi ise ikinci kolera aşısı tatbikatına tabi tutulmuştur. 436.208 kişi de aşılanmamıştı. Aşılanmamışlarda çıkan 340 vakaya karşılık birinci aşısı yapılanlarda 28, ikinci aşısı da yapılmış olanlarda ise 2 vaka görülmüştür.

Kolera epidemi bölgelerinde bir şahsı aşılama için iki defa bulmağa imkân olmadığı dikkate alınarak Seato kolera merkezinde alüminyum hidrokside adsorbe aşuların kullanılması düşünülmüş, ve Amerika'da hazırlanan iki tip adsorbe aşı örneği ile saha tatbikatına girilmiştir. Kontrol olarak da Dacca da hazırlanan tifo aşısı kullanılmıştır. Bu mevzuda çalışmalara devam edilmektedir. (8) Andemi bölgelerinde altı ayda bir aşılama yoluna gidilmektedir.

Aşı hazırlama metodu : Bizdekinin aynıdır. Kalevi adi agar (Ph. 8 - 8.5) da üretilen 18 - 24 saatlik kültürler serum fizyolojikle toplanıp hararetle öldürülür, % 0.5 fenolle prezerve edilir. Birer hafta arayla 0.5 ve 1 cc. zerk edilir. Semans kültürleri kalevi peptonlu suda hazırlanır, koloni evsafı tetkik edilir, 18 - 24 saatlikten eski kültürler ekilmez. İnaba ayrı, Ogawa ayrı hazırlanıp sonra aşı ihzar edilirken müsavi nisbette karıştırılır. Mecmu jerm adedi bilindiği gibi 8 milyardır. Aşı 0 - 4 yaşına kadar 0.4 cc., 5 - 10 yaşına kadar 0.6 cc. ve 10 yaşından büyük olanlara da 1 cc. olarak yapılır. Pakistan'da uygulanan tek doz ve 1 cc. dir.

Kolera, toksini ile tesir ettiği düşünülerek bir anatoksin hazırlanması mevzuunda Japonlar elan mesai sarfetmektedirler. Bu suretle daha tesirli bir immünizasyon metodu bulmak imkân dahiline kirebilecektir.

Aşının hazırlandığı yerden uzak mesafelere hiç bir tedbir alınmadan nakli de bilhassa tropik iklimlerde aşının potency üzerinde

mühim etki uyandırmakta, kudretinin azalmasına yol açmaktadır. Aşının nakli hususunda bazı tedbirler almak lâzım geldiği gibi aşya konulacak kullanma hududunun da bu hususlar gözönüne alınarak sınırlandırılması icabetmektedir.

Aşı komplikasyonları : Mühim değildir. Fenalık hissi, başağrısı, geçici hafif fiyevr bu arada sayılabilir.

Düşünülen bir mühim nokta da ağız yolu aşlamayı geliştirmektir. Bu hususda da çalışmalar mevcut bulunmaktadır.

Koruyucu tedbirler :

Aşı dışında, epidemi sırasında koruyucu tedbir olarak ilk akla gelecek husus içme ve kullanma sularının sıhhi kontrol altına alınması, halka temiz su teminidir. Gerek kaptaj gerek isale bakımından hijyen şartlarını yerine getirmek lâzımdır. Su kontrollerini sık sık yapmak icabeder. Pakistan'da şehir ve kasabalarda kullanılan suların hemen hepsi kirlidir. Seato kolera merkezinde kurulmuş olan su laboratuvarı çalışmaları bu hususu açık olarak göstermektedir. Suların klorlanması, gıda maddelerinin ve satıcılarının sıkı bir kontrol alınması, gerektiği takdirde çiğ meyve ve sebze satışlarının yasaklanması tedbirler arasında sayılır. Bunlardan başka taşıyıcı olmaları her zaman mümkün olan sinek vesair haşaratın öldürülmesi için DDT tatbikatını da tedbirlere eklemek yerinde olur.

Karantine tedbirleri :

Kolera endemi ve epidemi noktalarında alınması gerekli karantina tedbirlerinin başlıca şartlar olması gerekmektedir :

1 — Bütün memleketler aynı metodlarla standard bir aşı hazırlamak, suşlar, jerm adedi, entervalier, zerk edilecek miktarlar aynı olmalıdır. Bu hususlar Dünya Sağlık Teşkilâtınca standardize edilmelidir.

2 — Çok seyahat edenler, gemi adamları, uçak mürettebatı en sık 6 ay, en az yılda bir mutlaka aşılanmalıdır.

3 — Enfekte mahallerden gelenlere uygulanacak hususlar şartlar olmalıdır :

a) Eğer şahıs muteber bir aşı sertifikası varsa enfekte yerden ayrıldığı tarihten başlamak ve beş günden fazla olmamak üzere gözlem altında tutulmalıdır.

b) Eğer şahıs muteber bir aşı vesikasına malik değilse beş gün müddetle karantinaya alınmalıdır.

4 — Gemide mevcut içme ve kullanma suyu enfekte bölgeden alınmış ise temiz olduğuna dair sertifikası olmalı, veya temiz bir limandan alındığına ait belgesi bulunmalıdır. Uçaklar için de aynı husus varittir.

5 — Enfekte bölgelerden gelen gemi ve uçaklarda hasarata mücadelesi yapmak dezensektizasyona tabi tutmak icabeder.

6 — Enfekte yerden gelen gemi ve uçaklarda balık, meyve ve sebze gibi gıda maddeleri mevcutsa bunların şehre çıkarılması yasaklanır. Bunlara el konup imha edilmelidir.

L İ T E R A T Ü R

- 1 — Brigadier M. Sharif — Inaugural adress. Seato Conference on cholera. (1960)
- 2 — Pramern Chandavimol — Thai Health organization in 1958 for recognition. Seato conference on cholera (1960)
- 3 — Ali Nawab Khan — Epidemiology of cholera in East Pakistan. (1960) Seato Conference on cholera.
- 4 — K.A. Monsur — Bacteriological diagnosis under field Conditions. Bull. WHO. (1963) 28, 387/389.
- 5 — Payzan S. ve Akyay N. — Kolera vibrasyonları üzerine muhtelif sülfonamid ve antibiyotiklerin in vitro ve in vivo tesirleri. Türk Hij. ve Tec. Biol. Dergisi
- 6 — W.B. Greenough, R.S. Gordon and A.S. Beneson — Tetracycline in the treatment of cholera 1964. Lancet feb, 13 pp. 355/357
- 7 — Seato cholera laboratories in Dacca — Treatment of cholera at the East Pakistan (1964)
- 8 — Cholera research laboratory — Response and reactions to cholera immunization (1964)

DÜNYA SAĞLIK TEŞKİLATI
BÖLGELELERARASI KUDUZ SEMİNERİ İNTİBALARI

8 - 20 Haziran 1964 — MOSKOVA

Dr. Elhan ÖZLÜARDA

Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü Viroloji Şubesi Mütchassısı

Dünya Sağlık Teşkilâtı (WHO) 1964 Haziran ayında Moskova'da Kuduz mevzuunda bir seminer ve kurs tertip etti. Bu seminer'e Türkiye, İngiltere, Yugoslavya, Yunanistan, Polonya, Peru, Şili, Venezuela, İran, Pakistan, Hindistan, Seylan, Birmanya, Mongolistan, Japonya, Endonezya, Gana, Kenya ve Sudan'dan birer, Nijerya'dan iki üye iştirak etti. Konuşmalar İngilizce ve Rusça olarak iki dilde yapıldı ve tercümanlar tarafından birbirine tercüme edildi. Seminerde münakaşaları yöneten ve konferans verenler kuduz mevzuunda dünya çapında otorite sayılan kişilerdi. Bunların başında Dr. Karl Habel, Dr. Hilary Koprowski, Dr. M. Kaplan, Dr. M.A. Selimov, Dr. D. J. Dean, Dr. M. Abdussalam geliyorlardı. Ayrıca, Dr. R.A. Kantorovic, Dr. Seminova ve diğer Rus doktorlar demonstrasyon, projeksiyon yaptılar ve konferans verdiler. Seminerin yapıldığı «Virus Ensefalitleri ve Poliomyelitis Enstitüsü» Direktörü Dr. Chumakov da Seminerin ilk ve son günlerinde genel olarak kuduz ve Poliomyelitis Enstitüsü hakkında birer konuşma yaptı.

Seminer'in gayesi, kuduz mevzuunda epidemiyoloji, saha kontrolü, tedavi ve laboratuvar tekniğindeki son gelişmeleri münakaşa etmek, kuduz teşhisi ve aşı ve serumlarının istihsal ve kudret deneyleri metodlarındaki son laboratuvar teknikleri hakkında pratik bilgi vermektir. Pratik çalışmalarını dört grup halinde yaptık ve bütün safhalarında herbirimizin manipülasyona iştirakine mümkün olduğu kadar dikkat edildi. Laboratuvar tekniği pratiklerinde ve konferanslarda WHO'nun «Kuduzda Laboratuvar Tekniği» adlı monografı esas alın-

makla beraber bu broşürün neşrinden sonraki gelişmeler üzerinde fazlası ile duruldu.

Seminer'de ele alınan başlıca konular şunlardır :

Kuduz aşısının standardizasyonu = kudret deneyleri,

Kuduz antiserumunun standardizasyonu = serum - virus nötralizasyon testi,

Tavuk embriyonunda kuduz aşısı istihsalı,

Kuduzda laboratuvar teşhisi,

Kuduzda doku kültürü çalışmaları,

Kuduz virusu ile ilgili interferens fenomeni,

Kuduzda floressan antikor (F.A.) testi,

Lokal yara tedavisi,

İnsan kuduzunun spesifik profilaksisi, kuduz aşuları ve tesir dereceleri (Fernü aşısı, bebe sıçan aşısı, aşı liyofilizasyonu),

Maruziyet öncesi immünizasyonu = Pre-exposure immunization.

Transpolar bölgelerdeki Dikovanie hastalığının ekolojisi.

Bunlardan başka, kuduzun patogenezi, histopatolojisi, laboratuvara numune gönderme usulleri, hayvan kuduzunun klinik teşhisi ve profilaksisi, dünyada kuduz epidemiyolojisi konularında konferanslar verildi, kuduz antiserumu ve gama globulin istihsalı ve liyofilizasyonu demonstre edildi.

Bu yazıda, Seminer'de ele alınan konuların en önemlilerinden kısaca bahsedilecektir.

Kuduz aşılarının standardizasyonu - Kudret deneyleri :

Kuduz aşısı istihsal eden birçok laboratuvar potens testi yapmaya başladıktan sonra senelerdir istihsal etmekte oldukları aşuların ya pek düşük veya hiç immünizan kudreti olmadığını görmüşlerdir. Birçok viruslarda olduğu gibi kuduz sabit virusu da hayvan pasajları ile mutasyona uğrayarak vasıflarını değiştirebileceğinden kudretli bir aşı hazırlanmasında on sene evvel kullanılan metodların bugün de değerli olamayacağı aşıkârdır.

Kontrol grup temin edilemeyeceğinden ve kuduz vak'alarının azlığından kuduz aşılarının kudretlerinin insanda değerlendirilmesi zordur. Zaten esas olan, aşılardan insan ve hayvanda kullanılmasından önce değerlendirilmesidir.

Kuduz aşılarının kudretini tayinde bilhassa şu üç husus düşünülür :

1) Test, insan ve hayvanda kuduz profilaksisinde aşının müessiriyetini tayin edebilmelidir.

2) Gerekli materyelin temini ve yapılması kolay olmalı, pahalı ve zaman alıcı olmamalıdır.

3) Standardize edilebilmelidir.

Kuduz aşısı istihsal eden laboratuvarlar mevcut kudret deneylerinden birini, öğrenmek istedikleri husus ve imkânlarına göre seçebilirler. Bir laboratuvarın fazla test hayvanı yoksa ve yalnız aşının yeterli veya yetersiz olduğunu anlamak istiyorsa farede modifiye Habel testini kullanabilir. İmkânları varsa ve aşının kantitatif değerini öğrenmek istiyorsa farede orijinal Habel testi veya NIH (National Institute of Health) testten birini seçebilir. NIH test daha standard bir metod olmakla beraber, standard bir referens aşısı ve çok sayıda hayvan kullanmayı icabettirmektedir. Tavşanda Pasteur Enstitüsü testi de Habel testine müsabih kantitatif bir testtir. Bunlardan başka canlı, tavuk embriyonu tipindeki (Flury LEP ve HEP gibi) aşılardan kudretini ölçmede kullanılan kobay testi vardır. Bu test kantitatifdir, yani aşının yeterli veya yetersiz olduğunu gösterir. Bu testte, 400 gr ağırlığında 10 kobay sağ bacak adalesine zerki suretiyle 0,25 cc % 5 dilüsyonunda Flury aşısı ile aşılanır. 21 gün sonra bunlar ve 5 kontrol kobayın sol bacak adalesine 0,5 cc CVS (Standard Challenge Virus) veya sokak virusu (normal kobayların % 80 inden fazlasını öldürecek kudrette) süspansiyonu zerki suretiyle «challenge» yapılır. 5 - 14 gün içinde (CVS kullanıldığı takdirde) hastalanan ve ölen kobaylar kaydedilir. İyi bir aşısı kobayların % 70 inden fazlasını korumalı ve kontrol kobayların % 80 inden fazlasını ölmelidir.

Habel testi «bağışıklığı kırma - immunity breakdown» tipinde bir testtir. Bu testte fareler 6 defa verilen aynı doz aşısı ile aşılanır. «Challenge» yapılacağı zaman bunlar 5 gruba ayrılarak her gruba virusun onkatlı sulandırılmalarından biri verilir. Aşının kudreti, virusun LD₅₀'ünü yani aşıları farelerin yarısında bağışıklığı kıran dozu hesap edile-

rek tayin edilir. Mutabek bir aşı fareleri, en az virusun 1000 LD₅₀ dozuna karşı korunmalıdır. Bu testten alınan neticeler laboratuvardan laboratuvara ve hatta aynı laboratuvarda muhtelif zamanlarda yapılan tecrübelerde farklı olabilir. Bu fark «challenge» virus suçundan, bu virusun işlenmesinden veya fare suçundan ileri gelebilir. «Challenge» virustan ileri gelebilecek farkı bertaraf etmek için bir standard challenge virus (CVS) ihdas edilmiştir. Bu suç WHO tarafından isteyen laboratuvarlara gönderilmektedir. Challenge virusun işlenme tarzı da standardize edilmiştir. Virus süspansiyonu % 2 serumlu distile su ile % 10 beyin dokusu ihtiva edecek şekilde sulandırılır, 1000 g de 15 dakika santrifüje edilir ve üstte kalan mayı kullanılır. Fare suçlarındaki varyasyonu tesbit için de her seri aşının kudret tayininde paralel olarak referens bir aşı kullanılmalıdır. Bu suretle aşının kalitatif bir mukayesesi yapılmış olur. Kuduz aşları stabil olmadığından referens aşı ultraviyole ile inaktive edilmiş ve donmuş halde kurutulmuş (freeze dried) olarak hazırlanır ve aktivitesini en az bir sene idame eder.

Daha kantitatif bir test «antijeni söndürme - antigen extinction» tipinde olan testtir ki bunda farelere muhtelif dozda aşı verilir ve sonra aynı dozda virusla challenge yapılır (NIH test). Her aşı için, farelerin yarısını challenge dozda virusa karşı koruyacak aşı miktarı olarak % 50 efektif doz (ED₅₀) tayin edilir. Bu testte bir referens aşı kullanılması esastır ve kudret referens aşuya nazaran tayin edilir (1).

Modifiye canlı virus aşılarının kudret deneyinde kullanılan NYLAR (New York Laboratories and Research) test te «antijeni söndürme» tipindedir. Fareler tek bir doz aşı ile peritonici aşılanır ve challenge adale içi yapılır. Bu suretle aşuya ilk cevap ölçülür ve Habel ve NIH testlerdeki aşı veya virusun müteaddit enjeksiyonlarının bus-ter tesirinden kaçınılmış olur. Kullanılan farelerdeki yaş, cins, orijin farklarını bertaraf etmek için potent standard bir referens aşı da paralel olarak kullanılır (2).

Kudret deneylerinde mümkün olduğu kadar üniform hayvanlar kullanılmalı ve test hayvanları aynı bir koloniden uzun zaman idame edilmelidir. Hayvanlar önceden kudretli bir aşı ile teste tabi tutularak kontrol edilmelidir.

CVS'in idamesi için şu usul tavsiye edilmektedir: WHO dan getirilecek CVS farelere muhtelif dilüsyonlarda zerke edilir. Hastalık

arazı gösterenlerin beyinleri toplanır, emülsifiye edilir ve ampüllere konup -50°C de muhafaza edilir. Bu şekilde 10 - 12 senelik ihtiyacı karşılayacak adette ampül hazırlanır. Her sene bu standardtan bir tüp alınıp farelere zerkedilir. Bunların beyinlerinden bir senelik ihtiyacı karşılayacak adette ampül hazırlanıp 0°C altında muhafaza edilir ve o sene içinde kullanılır. Bu suretle virus karakterini değiştirmemiş olur.

Kuduz antiserumunun standardizasyonu = Serum - virus nötralizasyon testi :

Bu test iki gaye ile kullanılabilir :

1) Bir serumda ne kadar antikor bulunduğunu öğrenmek için. Bu testte serumun muhtelif dilüsyonları sabit miktarda virus ile karşılaştırılır.

2) Eldeki virusun titrasyonu ve idantifikasyonu için. Bu tip testte malûma bir serumun sabit bir miktarı muhtelif dilüsyonlardaki virus ile karşılaştırılır.

Kuduz antiserumunun standardizasyonu için yapılan kudret deneyi birinci tipe dahildir. Bu testte, tetkik edilecek serum, referens serum ve normal serum (LD₅₀ tavini için) un 55°C de 20 - 30 dakika inaktivasyondan sonra fizyolojik tuzlu su ile, 2 cc içinde, 1/25 - 1/3200 iki katlı sulandırılmaları hazırlanır. Kudreti bilinen standard bir kuduz virusunun, cc de 100 LD₅₀ ihtiva edecek şekilde, % 2 at serumlu distile su ile yapılan süspansiyonu ikişer cc olarak serum sulandırılmaları üzerine tevzi edilir. Bu suretle serumların nihai sulandırılmaları 1/50 - 1/6400 olur. Bu karışımlar 1 saat 35,5° - 37°C de bırakıldıktan sonra, her serum dilüsyonu için 10 fare kullanmak üzere, serumun en alçak dilüsyonundan (bu dilüsyon en az aktif virus ihtiva etmektedir) başlamak suretiyle, beyniçi yolla 0,03 cc miktarında farelere zerkedilir. 5 - 14. günlerde ölen veya paraliği görülen fareler kaydedilir. Farelerin % 50 sini koruyan serum titreleri hesap edilir. Tetkik edilen serumun immünizan kudreti referens seruma nazaran ifade edilir. Eğer test serumunda yaşayan farelerin bütünü farelere nisbeti referens serumdaki kadar veya ondan yüksek ise serumun kâfi miktarda kudreti olduğu anlaşılır. Eğer % 50 koruyan titre referens serumun % 50 koruyan titresinden meselâ 10 kere yüksek ise o serumda 800 I.U./cc vardır. Zira internasyonal standard serumun (1 cc

tuzlu su ile sulandırılan kuru serum) 1 cc inde 80 I.U. olduğu kabul edilmiştir. Bir serumun muteber olması için referens serumdan en az 2,5 defa daha kuvvetli olması gerekmektedir.

Tavuk embriyonunda kuduz aşısı istihsalı :

Halen tavuk embriyonu kuduz aşılarının istihsalinde, tavuk embriyonuna adapte ve burada modifiye edilmiş olan Flury ve Kelev tipi kuduz virüsü suşları kullanılmaktadır. Flury suşu Georgia'da kuduz bir köpek tarafından ısırılmış ve kuduzdan ölmüş Flury isimli bir kız çocuğunun beyninden, Harold Johnson tarafından, doğrudan doğruya bir günlük civcivlere beyiniçi zerkedilmek suretiyle izole edilmiş ve pasajlarına devam edilmiştir. Önce uzun olan enkübasyon devri sonra 7 - 8 güne kadar düşmüştür. Civcivde 138. pasajdan sonra virus, Koprowski tarafından tavuk embriyonuna adapte edilmiştir. Burada 40-50 pasajdan sonra Flury virus köpeklerde tecrübe edilmiş, müsbet netice alındığından bu pasaj seviyesinde aşı hazırlanarak köpeklere tatbik edilmiştir. Bu suş Flury LEP suşudur. Bir taraftan virusun pasajlarına devam edilmiş ve 100 den fazla pasajdan sonra virus vasıflarını değiştirmiş, yetişkin farelere beyiniçi zerkteki patojenitesini kaybetmiştir. 180 pasajdan sonra hasıl olan bu varyanta Flury HEP denmiştir. Bu virustan hazırlanan aşı sığırlarda ve bazı saha çabuşmalarında insanların korunmasında kullanılmıştır.

Flury HEP suşu ile aşı hazırlanmasında 7 günlük tavuk embriyonu kullanılır. Flury HEP virusun % 20 sulandırımının 0,25 cc miktarları yumurtaların sarı kesesine zerkedilir. 10 günlük enkübasyondan sonra canlı kalan embriyolar toplanarak tartılır. Stabilizan mahlul ile % 33 emülsiyon olacak şekilde, ezme makinesinde 1 dakika kadar homojenize edilir. İki katlı tülbentten süzülükten sonra bakteriyolojik ve zararsızlık kontrolleri yapılır ve aşı ampüllere tevzi edilir. Genç yetişkin farelerde yapılan titrasyonda aşı en az $10^{3.3}$ LD₅₀ dozda virus ihtiva etmelidir. Kullanılan farelerde Flury virusla interferens yapan latent bir virus olup olmadığı, daha önce standardla mukayeseli titraj yapılarak araştırılmalıdır. Kullanılan yumurtalar iyi netice vermiyorsa başka bir menbadan temin edilmelidir.

Kuduzda laboratuvar teşhisi :

Kuduzun laboratuvar teşhisinde kullanılan metod doğru, çabuk ve ekonomik olmalıdır. Kuduz şüpheli hayvan beyinde Negri cisimle-

rinin aranması için preparat yapılması ve Seller tekniği ile boyanması usulü bu gerekçeleri temin etmektedir. Negri cisimcikleri en çok beyin Ammon boynuzunda, korteksin piramidal hücrelerinde ve beyincığın Purkinje hücrelerinde bulunurlar; daha az olarak talamus'un nöronlarında, beyin sapında ve duyu ganglionlarında da tesbit edilebilirler. Bazen Ammon boynuzundan yapılan preparat menfi olduğu halde beyin sapından alınan numunede Negri cisimcikleri tesbit edilebilir. Bu bakımdan yalnız Ammon boynuzundan değil beyin muhtelif yerlerinden, beyincik ve beyin sapından da preparat yaparak tetkik etmek lâzımdır. İmpresyon tarzında yapılan preparatlar, küçük bir sahada azamî sinir dokusu ihtiva etmeleri ve hücrelerin harap olmaması dolayısı ile yayma preparatlara tercih edilirler. Yayma preparat yaparken bunun kalın olmamasına dikkat etmek lâzımdır. Seller boyama tekniğinde fiksasyon ve boyama aynı anda yapıldığı için önceden preparatın fikse edilmesine lüzumu yoktur. Preparat daha sı-lakken boya solüsyonuna batılarak 1-5 saniye tutulur, hemen çıkarılır ve havada kurutulur. Seller tekniği çok basit ve süratli olması sebebiyle umumiyetle tercih edilmektedir.

İmpresyon, yayma preparat ve kesitlerin boyanmasında RSSCB de kullanılan Muromtsev ve Tureviç metodları da bazı üstünlükleri haizdirler. Muromtsev metodu ile boyanan preparatta Negri cisimcikleri koyu mor, zemin açık eflatun, sinir hücresi protoplazması açık mavi renkte görünür. Bu preparatlar uzun müddet netliklerini muhafaza ederler. Çok basit olan bu boyama metodunda Negri cisimlerinin iç yapısı gayet iyi görülür. Billhassa beyin kesitlerinin boyanmasında kullanılan Tureviç metodu ile boyanan preparatlarda Negri cisimleri parlak kırmızı, sinir hücresi protoplazması koyu yeşil, hücre nükleüsü siyah boyanır.

Taze preparatta Negri cisimleri görülemeyeceği hallerde, şüpheli beyinden hazırlanan 1/10 nisbetindeki emülsiyon, taze ve steril olmadığı takdirde antibiyotik ilâve edilmek suretiyle, farelere beyinciği olarak 0,03 cc zerkedilir. Materyel taze değilse fare beyinine inokülasyon mahzurlu olacağından, zerk farenin burnu yanından adefe içine 0,1-0,2 cc miktarında yapılır. İki haftalık farelerin kullanıldığı bu usulde enkübasyon devri daha uzundur.

Kuduzda doku kültürü çalışmaları :

Daha iyi vasıfları haiz kuduz aşlarının istihsalı için sinirsel olmayan dokudan hazırlanmış yüksek titrede virus gerekmektedir. 1961 e kadar yapılan araştırmalar, kuduz virusunun bir takım invitro doku kültürü hücre sistemlerinde ürediğini göstermişti. Karşılaşılan en büyük zorluklar sitopatojenik tesir (CPE) in sabit olmayışı, virus miktarının az oluşu ve hücrelerin hepsinin enfekte olmayışı idi. Daha sonra yapılan çalışmalarda bu zorluklar bertaraf edilmiştir. Hamster böbrek hücresi BHK 21 clone 13 muhtelif kuduz virusu suşlarına hassas bulunmuştur. Muayyen şartlarda CPE teşekkül etmiş ve 10^4 - 10^6 titre devamlı olarak elde edilmiştir. Bu sistem, CPE i endpoint kabul etmek suretiyle, nötralizan antikörlerin titrasyonunda ve floresans yardımı ile, virusun hücreiçi üremesinin ve enklüzyon cisimlerinin teşekkülünün incelenmesinde kullanılmıştır. Hücrelerin % 100 ü enfekte edilebilmiştir.

Kuduzda kullanılan ikinci bir hücre hattı insan diploid hücre suşu (HDCS) dur. Bu sistemin primer enfeksiyonu muhtelif sabit virus suşlarına maruz bırakılmak suretiyle kolaylıkla temin edilmişse de, enfekte vasat veya hücre ekstraktı ile virusun seri pasajlarında muvaffak olunamamıştı. 15-20 pasajdan sonra hücreler eriyor ve kültür kayboluyordu. Enfekte kültür hücreleri her pasajda enfekte olmayan hücrelerle karıştırıldıktan sonra kuduz virusu HDCS de devamlı olarak üretilebildi. Bu şekilde yapılan 40-50 pasajdan sonra virusu, enfekte vasatı taze kültürlerle nakletmek suretiyle üretmek mümkün oldu. Birkaç gün sonra hücrelerde erime oluyor ve fazla miktarda virus elde ediliyordu. Bu sistemde de CPE virus titrasyonunda endpoint olarak kullanılır. Virusun HDCS e adapte edilmesinde kullanılan bu «hücre-karıştırma» metodu diğer doku kültürü sistemlerine de tatbik edilmiştir. Dr. Koprowski ve ark.nın HDCS de hazırladıkları ve beta-propiolactone ve fenol ilâve ettikleri aşlardan biri Habel testini geçmiştir (19) (21).

Hamster böbreğinden doku kültürü şu metodla hazırlanmaktadır: Eterle bayıltılan 3-4 haftalık hamsterin sırt derisi kaldırılıp iki tarafına birer şak yapılır. Steril şartlarda çıkarılan böbrekler antibiyotik ihtiva eden tuzlu suya konur, dekapsüle edilir, pelvis çıkarılır, korteks bir santrifüj tüpüne aktarılıp steril bir makasla 1-2 mm lik parçalara ayrılır. Fizyolojik tuzlu su ile birkaç defa ve sonra tripsin (Difco 1/250, pH 7, Tyrode sol. da) solüsyonu ile yıkanır. Parçalar

magnetik karıştırıcının kavanozunda, iki höbrek için 200 cc (37°C ye ısıtılmış) tripsin solüsyonu içinde 40 - 50 dakika (37°C de) bırakılır. Sonra santrifüj tüpüne aktarılarak 800 rpm ile 15-20 dakika çevrilir, üstte kalan atılır. Hücreler biraz besi vasatı ilâve edilerek pipetle karıştırılır. cc de 250.000 - 300.000 hücre olacak şekilde besi vasatı (Hank sol.da % 10 sığır serumu, % 0,5 lactalbumin hidrolizate) ilâve edilir. 4-5 gün sonra hücre tabakası teşekkül eder.

Kuduz virusu ile ilgili interferens fenomeni :

Kuduz virusu tavuk embriyonu hücre kültürlerinde bazı virus susları ile interferens yapar. Meselâ Batı beygir ensefaliti (WEE), Çiçek, Sendai virus, Newcastle virus (NDV), pseudorabies virusların bu kültürde üremesini önler. Kuduz virusu bu hücre sisteminde CPE yapmadığı halde, yukarıda bahsedilen virusların CPE i vardır. Kuduz virusu bunların üremesine ve dolayısı ile CPE yapılarına mani olur. Bu vasfından istifade edilerek, meselâ Flury HEP virusun tavuk embriyonu hücre kültüründe titraji yapılabilir. Bunun için hücre kültürlerine kuduz virusunun muhtelif dilüsyonları ekilir. Sonra interferens yaptığı bir virus bu kültürlerle ilâve edilir. Interferens 48. saatte başlar ve 5. günde azami seviyeyi bulur. Bu olayda, zaman ve kuduz virusunun miktarı gibi iki faktörün rolü vardır. Kuduz virusu bulunan kültürlerde sonradan ilâve edilen (meselâ WEE virus) üremeyeceğinden CPE görülmez. Kuduz virusu bulunmayan dilüsyona ait kültürlerde CPE görülmür. Bu suretle kuduz virusunun titrasyonu kısa bir zamanda yapılmış olur (19).

Kuduzda Floresan Antikor (FA) testi :

Floresan antikor testi (FA) birçok mikrobik hastalıklara tatbik edilmiştir (Antrax, Brucella, virus hastalıkları gibi). Prensiptir: Floresan boyanın spesifik bir proteinle kimyasal olarak bağlanmasına dayanır. Bu protein antijen veya antikor olabilir. Bu metodda birçok floresan kimyasal madde kullanılabilir. Bunlar arasında Fluorescein isothiocyante en uygun bulunmuştur. Otopsi materyelinde (beyin veya tükrük bezi) veya doku kültüründe antijenin ve serumlarda antikorların tesbitinde bu metod başarı ile kullanılmaktadır.

Bu test iyi tatbik edildiği takdirde aşağıdaki avantajları temin eder :

1) Çok spesifiktir.

2) Birkaç saat gibi kısa bir zamanda teşhise götürür.

3) FA testi ile fare inokülasyon testi neticeleri arasında yüksek derecede pozitif korelasyon mevcuttur. FA testi müsbetse fare testi de muhakkak müsbettir. Eğer FA testi müsbet olduğu halde fare testi menfi bulunursa hipokampustan başka beyin sapından da numune alınarak fare zerki yapılmalıdır.

4) Floresan antikor testi ölü antijenin de mevcudiyetini gösterir. Onun için, numunenin laboratuvara taze olarak gelmesi mecburiyeti yoktur. Yayma preparat veya kesit tetkikinin gerektirdiği numunenin dondurulmaması mecburiyeti bu testte yoktur. Numune taze, gliserinli, donmuş halde veya bozulmuş olsa dahi bu test ile teşhise varılabilir.

Bütün bu üstünlüklerine rağmen FA testinin rutin olarak kuduzun laboratuvar teşhisine tatbiki ve iyi netice alınabilmesi ancak bu hususta yetiştirilmiş personel ve kaliteli malzeme kullanılmasına bağlıdır.

FA tekniği direkt ve indirekt metod olmak üzere iki şekilde tatbik edilebilir:

Direkt FA testinin yapılışı: Bir lâmin iki ucuna şüpheli materiyelden impresyonlar yapılır. Preparat oda hararetinde havada kurutulur (takriben 30 dakika). Fiksasyon için -20°C de soğutulmuş acetone içine konur ve burada 4 saat bırakılır. Pozitif ve negatif kontrol olmak üzere kuduz olduğu malûm bir numuneden ve normal fare beyininden aynı şekilde impresyon preparatı yapılır ve tetkik edilecek numune ile aynı muamelelere tabi tutulur. Tesbit edilen ve -20°C de bırakılarak kurutulan prepatlar rutubetli bir ortama (meselâ içinde fosfat tampon mahlüllü ile ıslatılmış filtre kâğıdı bulunan bir Petri kütusuna) konur. Impresyonların etrafına parafin veya cam kalemle birer halka yapılır. Bu, preparata ilâve edilecek emülsiyonların birbirine karışmasını önler.

Bu test için gerekli materyel :

1) Conjugate: Anti-kuduz gama globulin veya hiperimmün serum² (bütün titreşimin çok yüksek olması lâzımdır, 10^{-4} gibi) un floresan bir boya ile bağlanması suretiyle hazırlanır. Conjugate'in ha-

zrılanması ince bir teknik istediğinden bu metodu yeni olarak kullanmaya başlayan laboratuvarların bunu hazır olarak satın almaları tavsiye edilir.

Hiperimmün serumun gama globulin fraksiyonunu almak için muhtelif metodlar vardır. Bunlardan biri seminerde şu şekilde demonstre edilmiştir :

Serum buz banyosu içindeki behere konur, içine magnetik çomak atılır, magnetik karıştırıcı üzerinde seruma damla damla eşit miktarda amonyum sulfat (100 cc H₂O + 103 gr (NH₄)₂SO₄) ilâve edilir. Karıştırma +4°C de 1 saat devam eder. Presipitasyon husule gelir. +4°C de 1 saat daha bırakıldıktan sonra muhtevaşı 10.000 rpm ile 15-20 dakika santrifüje edilir. Üstte kalan mayı atılarak presipitat selofan bir torbaya nakledilir. Selofan torba, içinde distile su bulunan bir kapta bir gün bırakılır. Ertesi gün +4°C deki fosfat tamponlu (0.15M, pH 7.2 - 7.4) tuzlu suya (% 0,85 NaCl) konur. Bu suretle diyaliz olayı tamamlanmıştır ve elde edilen gama globulin konjugasyona hazırdır.

Konjugasyon için, 50 cc % 2 lik gama globulin'e 10 cc sodyum karbonat (Na₂CO₃/NaHCO₃ 0.5M pH 9) solüsyonu (% 20), 5 cc fosfat tamponu (pH 7.2 - 7.4) ve 10 mgr Fluoresceine isothiocyanate (FBL) ilâve edilir. Karıştırıcı üzerinde bu ilâveler yapıldıktan sonra 18 saat +4°C de bırakılır. Sonra conjugate'in pürifikasyonu için pH 7.2 - 7.4 fosfat tamponlu tuzlu su ile diyalize tabi tutulur. Bu suretle hazırlanan conjugate -20°C de veya liyofilize halde muhafaza edilir.

2) -Normal fare beyni süspansiyonu (NMB) ve kuduz fare beyni süspansiyonu (RMB) : NMB normal beyninden, RMB sabit virüsün CVS suşu ile enfekte edilmiş fare beyninden hazırlanır. Bunun için 1 kısım (ağırlık itibariyle) fare beyni 4 hacim % 10 luk yumurta sarısı (6-7 günlük embriyodan alınan yumurta sarısı, 0.05M sodyum fosfat pH 7.6 - 7.8 mahlülünde sulandırılmıştır) içinde homojenize edilir. Süspansiyon 1000 rpm ile 10 dakika santrifüje edilir ve üstte kalan mayı -20°C de muhafaza edilir (6).

3) -20°C de muhafaza edilen acetone. Bu soğuklukta duran acetone'da, antijenin vasfını değiştirebilecek bir kısım maddeler bulunmaz.

4) - Fosfat tampon mahlülü

5) -Negatif kontrol (normal fare beyninden hazırlanmış preparat) ve positif kontrol (kuduz fare beyninden hazırlanmış impresyon preparatı)

Yukarıda anlatılan şekilde hazırlanan conjugate, kullanılacağı zaman 1/2 nisbetinde NMB ve RMB ile sulandırılır. Conjugate çok kuvvetli bulunursa 1/40 a kadar sulandırılabilir.

Tesbit edilmiş ve rutubetli bir ortama konmuş olan preparatların sol taraflarına conconjugate + RMB, sağ taraflarına conjugate + NMB ilâve edilir. Petri kutusu kapatılır ve 37°C de 30 dakika (conjugate iyi ise 5 - 30 dakika) bırakılır. Sonra preparatlar distile su ile çalkalanır ve 60 dakika kalmak üzere pH 7.2 - 7.4 fosfat tamponlu tuzlu suya konur. 1 saat sonra, tuzu bertaraf etmek için distile su ile çalkalanır ve havada kurutulur. Üzerlerine bir damla gliserin + tuzlu su konup lâmelle kapatılır ve floresans mikroskopunda tetkik edilir.

Preparatın okunması :

RMB + conjugate kompleksinde conjugate'de bulunan anti-kuduz antikolar RMB deki antijene bağlanmıştır; dolayısı ile bu kompleks serbest antikor yoktur. Onun için, positif bir numuneden yapılan preparata ilâve edilince dahi birleşme olamayacağından, preparatın yıkanması esnasında bu kompleks te yıkanır ve mikroskop muayenesinde floresans görülmez. Bu kompleks conjugate'in kontrolü için kullanılmaktadır. Non-spesifik floresans bu kontrol yardımı ile tesbit edilebilir.

NMB + conjugate kompleksinde ise işaretli antikolar serbest bulunmaktadır. Onun için, positif bir preparata ilâvesinde bu müsbet ve floresans işaretli antikolar numunedeki antijenle birleşirler ve mikroskop muayenesinde antijen bulunan yerlerde floresans görülür.

Buna göre, kontrol ve numuneye ait preparatların muayenesinde şu neticeler alınır:

1 — Negatif kontrol preparatı: Preparatın sol ve sağ taraflarında floresans görülmez.

2 — Positif kontrol preparatı: Solda floresans yok, sağda vardır.

3 — Numuneye ait preparat : Solda floresans yoktur; sağda, numunede antijen varsa floresans müsbet, yoksa menfidir.

Antijen bulunan preparatlarda, muhtelif ebatta (ancak görülebilen 20 milimikrona kadar) ve muhtelif şekilde (oval, yuvarlak, uzun) açık yeşil, floresan cisimcikler görülür. Herhangi bir sebeple conjugate kusurlu olmuş ise negatif kontrolde ve sistem kontrolü (RMB + conjugate)nda non-spesifik floresans görülür. Bu non-spesifik lekeler muhtemelen, a) boyanın presipitasyonu, b) preparatın kalın yerlerinde dokunun yaygın olarak boyanması, veya c) normal doku komponentlerinin hücrevi boyanmasından hasil olur (13).

Preparat iyi bir şekilde hazırlanmışsa ve iyi bir optik sistemle tetkik ediliyorsa, zemin koyu mavimsi gri veya hafifçe yeşilimsi gri görünür. Eğer preparat kalın yapılmışsa veya tetkik edilen doku dört haftadan fazla donmuş olarak kalmışsa bu preparatlarda zemin açık mavimsi griden beyaza kadar renk veren floresans arzedebilir.

Floresans mikroskobunda ışık menbaı, içinden yüksek voltajlı ceryan geçen bir cıva lambasıdır. Sistemde, ısıya mukavim bir mercek, ultraviyolede gayrı her ışığı süzen bir filtre, gözü ultraviyolede koruyan diğeri bir mercek ve bir de yeşil filtre bulunmaktadır. Bazı tip mikroskoplarda ultraviyole ışınlar doğrudan doğruya göze gelmez, yalnız dokudan göze gelen refleksiyonu görülür.

Floresan boya ile boyanan preparatlar, gliserin + tuzlu su karışımı ile kapatıldıktan sonra + 4°C de saklanırlarsa haftalarca floresan vasıflarını muhafaza ederler.

İndirekt FA testinin yapılışı: Bu metod serumda kuduz antikorlarının araştırılmasında kullanılır. Prensipte, antikorun araştırılacağı serumun ait olduğu cinse karşı hazırlanmış gama globulinin floressin ile konjugasyona tabi tutulmasıdır. Böylece, eğer insan serumunda antikor aranıyorsa, münaşip bir hayvanda (meselâ keçi) insan serumuna karşı gama globulin hazırlanır ve fluoresceine isothiocyanate ile konjugasyonu temin edilir. Sonra positif (yani kuduz virüsü ihtiva eden) bir impresyon preparatında, önce muayene edilecek serum 30 dakika kalır, sonra anti-kuduz gama globulin konjugatı ilâve edilir. Eğer bir numunede antijen aranıyorsa o zaman malum bir müsbet serum kullanılır.

Bu testte üç komponent vardır : 1) antijen (virus veya bakteri olabilir), 2) antikor (insan veya hayvan serumu), 3) Fluoresceine + kullanılan seruma karşı başka bir cinste hayvanda hazırlanmış gama globulin.

Antikor araştırılan serum müsbetse bu antikorlar antijenle birleşir ve preparatın yıkanması esnasında yerlerinde kalırlar. Sonradan ilâve edilen conjugate de serumla birleşeceğinden mikroskopta floresans görülür. Serumda antikor yoksa antijenle birleşemeyeceğinden preparatın yıkanması anında kaybolur, sonra ilâve edilen conjugate ile de birleşemeyeceğinden mikroskopta floresans görülmez. Bu metolla serumun titre edilmesi de mümkündür.

FA testlerinde floressin, kompleman birleşmesi testindeki kompleman gibi vazife görmektedir.

Direkt ve indirekt metodlardaki prensipler başka sistemlere de tatbik edilebilir. Doku kültürlerinde de prensip aynıdır; yalnız fare beyni materyeli yerine (RMB ve NMB) doku kültürü süspansiyonu kullanılır. Bu suretle doku kültüründe de FA testi ile titraj yapılabilir. Meselâ Flury HEP virus suşunun tavuk embriyo hücreleri doku kültüründe, challenge'den sonra floresan boya ilâvesi suretiyle titrajı mümkündür.

Lokal yara tedavisi :

Kuduz hayvan ısırması ile hasıl olan yaraların lokal tedavisi kuduz virusunun santral sinir sistemine girmesine mâni olabilir ve hatta virusu yara içinde öldürebilir. Son zamanlarda yapılan tecrübeler, sıyrık, laserasyon ve sathi ısırıkların musluk suyu ve sabun veya kimyasal bir madde ilâve edilmiş su ile yıkanması, yahut kuduz antiserumu ile silinmesi veya yıkanmasının değerini ortaya koymuştur. Bu usuller kuduz tehlikesini büyük nisbette azaltır ve bilhassa aşının gecikmesi halinde çok mühimdir. Bu lokal tedavinin müessiriyetini göstermek üzere kobay ve sıçanlar kuduz virusu ile enfekte edilmiş ve inokülasyondan sonra muhtelif fasılalarla ve muhtelif metodlarla tedavi edilmişlerdir. Bir grup ta kontrol olarak tedavi edilmeden bırakılmıştır. Neticelerin istatistik analizi, bazı maddelerin lokal tatbikinin müessiriyetini göstermiştir. Procaine hydrochloride gibi yağda eriyen lokal anestetikler motor sinirleri bloke ederek koruyucu rol oynamaktadırlar. Benzolkonium hem blokaj yapar, hem de virusu öldürür. Hayvanlarda adale içi zerkedilen virusun titresini süratle düşer, fakat inokülasyon yerinde 48 - 96 saat canlı kalır. Bloke edici ajan virusun sinire geçmesini önleyerek virus titresinin enfeksiyon eşliğinden aşağı düşmesini temin edebilir.

Diğer bir tecrübeye quaterner amonyum bileşikleri = zefiran, etil alkol, lokal anestetikler, antihistaminikler ve trankilizanların, tabanlarından enfekte edilen farelerde kuduz virusunun yayılmasını önleme tesirleri tetkik edilmiştir. Yalnız bazı quaterner amonyum bileşikleri (zefiran) ve etil alkol virusun yayılmasını önlemiştir. Mekanizma bilinmemekle beraber bazı amonyum bileşiklerinin inokülasyon yeri ve etrafında virüsü inaktive ettikleri kabul edilir. Bu inaktivasyon invitro olarak ta vukubulur. Etil alkolün ise invitro virüsün olmayan konsantrasyonları dahi invivo müessir bulunmuştur. Ayrıca canlı kalan fareler bağışıklık kazanmışlardır.

Lokal olarak inoküle edilen kuduz serumu ve gama globulinin tabandan enfekte edilen farelerde tesiri aranmış ve şu neticeler alınmıştır: Anti-kuduz serum ve daha az olarak gama globulin kuduz virusunun zerkesildiği yere verilirse enfeksiyondan 1 saat sonraya kadar koruyucu tesir göstermektedir. Enfeksiyondan 3 saat sonraya kadar kısmi bir koruma olmakta, fakat 6 saat sonra hiç müessir olamamaktadır. Diğer tabana 1 saat sonra yapılan koruyucu zerk te kısmen faydalı olmakta, fakat 6 saat sonraki zerk hiç tesir etmemektedir (7) (18) (19).

Bütün ısırık yaralarının derhal lokal tedavi görmeleri icabeder. Yaranın sabun veya deterjanla temizlenmesi yerine, ısırık yeri müessir olduğu takdirde derin yaralarda nitrik asit kullanılabilir. Tecrübelerde 3 saat içinde yapılan nitrik asit tatbiki iyi netice vermiştir. Bunun dezavantajı, ağırlı oluşu ve meselâ yüzdeki yaralarda kullanılmayışıdır. Deterjan veya tuzlu su solüsyonları ile yıkamak veya silmek te iyi netice verir. Yaranın yıkanması devamlı olmalı, en az 5 dakika sürmeli, aceleden ve travmadan kaçınılmalıdır. Yaranın hafif bir tazyikle kanatılması faydalı olabilir. Isırık yaraları hemen dikilmemelidir. Vak'a ne kadar geç gelirse gelsin ısırık yaralarına lokal tedavi yapılmalıdır. Yarada kabuk varsa yeni bir travmaya sebep olmamak için kaldırılmamalı, serum enfiltre edilmelidir. Yara yı oyup çıkarmak ta emin bir usul değildir, travmayı arttırır. Geç gelen veya derin olan ısırık yaralarında, iyi yıkanamaması sebebiyle, serum kullanılması şarttır. Lokal serum tatbikinde de hassas şahıslarda önceden desansibilizasyon gerekir. Lokal olarak tatbik edilen serumun yalnız lokal olarak tesir ettiği, sistemik tesiri olmadığı fare tecrübeleri ile gösterilmiştir. Yaraların toz halindeki gama globulinle tedavisi tecrübeleri kobaylarda yapılmış ve bu usul sabun-su ile

veya kimyasal deterjanlarla yıkamaktan daha müessir bulunmuştur. Yanlız at serumuna karşı hassasiyet yaratabileceğinden bu toz gama globulinin sığır serumundan hazırlanması daha uygundur.

Işırık yaralarından giren virüs orada 72 saat kalabilir, fakat çoğalmaz. Santral sinir sistemine giden virüsler orada çoğalarak periferiye dağılır. Giriş yerinde virüsün uzun zaman kaldığı dikkate alınarak geç gelen vak'alarda dahi lokal tedavi yapılması gerekir. Lokal tedavi ile kısmî nötralizasyon olarak inkübasyon devresi uzatılır ve spesifik metodun tatbiki için zaman kazanılmış olur. İnsanda inkübasyon devri, lokal tedavi tecrübeleri yapılmış olan laboratuvar hayvanlarındakinden daha uzun olduğundan, lokal yara tedavisi insanda, laboratuvar tecrübelerinde gösterilenden daha müessir ve faydalıdır.

İnsan kuduzunun spesifik profilaksisi, kuduz aşıları ve tesir dereceleri :

Kuduz aşılarının hususiyeti, diğer aşıların aksine kuduz virüsü ile enfeksiyondan sonra yani enkübasyon devrinde verilmesidir. Hastalığın ekseri uzun bir kuluçka devri (ortalama 77 gün) olması bu aşıdan faydalanılmasına imkân verir. Kuduz aşılarında bulunması gereken özellikler, a) yüksek derecede immünojen; b) stabil, ve c) zararsız olmalarıdır. Hâlen mevcut ve kullanılmakta olan aşılar bu özelliklerin tamamını haiz değildirler.

Kuduz aşılarının reaktöjen vasfı, aşı virusunun kendinden (laboratuvar enfeksiyonu veya sabit virüsle hasıl olan ensefalomiyelit) veya aşıdaki yabancı maddelerden (nöro-paralitik hastalıklar, şoklar, lokal ve allerjik reaksiyonlar) husule gelir. Aşı virusunun zararlı tesiri, aşıya fenol, eter, betapropiolactone gibi inaktive edici maddeler ilâvesi ile yok edilir. Areaktöjeniteyi temin için gerekli bir husus ta aşıdaki yabancı maddeleri muhtelif eriticilerle bertaraf etmek veya daha iyisi aşı virusunu zararlı madde ihtiva etmeyen bir ortamda üretmektir. Kuduz virusunun çoğalmada rol oynayan kısmı merkezindeki nükleik asittir(12). Bunu saran protein kapsülü immünojen vasfı haizdir. Aşının inaktivasyonunda ideal olan, nükleik asidi tahrip etmektir. Ultraviyole ile bu temin edilir. Fenol ise protein kapsüle de zarar verir. İyi bir aşı hazırlamak için virüsün yanlız proteinini alarak saflaştırmak gerekmektedir.

Kuduz aşıları, 1) beyin aşıları, 2) yumurta aşıları, 3) doku kültürü aşıları olarak sınıflandırılabilir.

Pasteur'ün ilk beyin aşısı ve modifikasyonları şu gelişme safhalarını geçirmişlerdir :

1 — Canlı kuduz aşısı (Högyes, Phillips). Bu aşıda virusun nisbî zararsızlığı dilüe edilmesi ve dozların azaltılması sayesinde.

2 — Attenüe kuduz aşıları (Fermi, Alivizatos. Hempt, liyofilize fenollü kuduz aşısı). Bu aşılar da virusun enfektivitesi fenol veya eterle atenüe edilmiştir.

3 — İnaktive kuduz aşıları (Semple, Hempt - Nikolitsch, liyofilize fenol aşısı, Mersonine aşısı ve ultraviyole ile inaktive edilmiş aşı).

Halen birçok memleketlerde fenollü kuduz aşıları, bilhassa Semple tipi aşı kullanılmaktadır. Fenollü kuduz aşılarının başlıca avantajları, a) nihai müstahzar olarak hazırlanmaları ve kullanılacağı anda özel bir hazırlama usulü gerektirmemeleri, b) immünojen özelliklerini, +4°C de saklandıkları takdirde 6 ay muhafaza edebilmeleri, c) önceden hazırlanabilmeleri sayesinde immünojenik özelliklerini iyice kontrole ve uzak bölgelere nakillerine imkân vermeleridir. Bununla beraber fenollü aşılar kâfi derecede stabil değildirlir; saklanma esnasında, 20°C de ve donma ile immünojenik özelliği azalır; alçak veya yüksek ısıda muhafaza ve nakle dayanmazlar. Bu sebeple RSSCB de fenollü aşılardan liyofilizasyonu cihetine gidilmiştir. Fenollü aşı % 0,5 jelatin ve % 7,5 glikozla, donmuş halde kurutulur (freeze dried). Liyofilize fenollü aşılardan immünojenik özellikleri daha uzun süre sabit kalır. Bu husus Hündistan ve Amerikada da teyit edilmiştir. Fenolize kuduz aşılardan istihsalinde modern bir usul de yeni doğmuş hayvan beyini kullanılmasıdır. RSSCB de yeni doğmuş sıçan beyinden fenolize aşı hazırlanmaktadır.

Yumurta aşılardan, 1) Ördek embriyonunda Pasteur suşu ile hazırlanan ve betapropiolactone ile inaktive edilen, 2) Tavuk embriyon dokusunda Flury HEP virus suşu ile hazırlanan ve canlı olan aşılar dır. Canlı yumurta aşısı insanlarda şimdilik yalnız profilaktik olarak kullanılmaktadır.

Doku kültürü aşılardan henüz tecrübe safhasındadır. Son zamanlarda aşağıdaki doku kültürü aşılardan insan immünizasyonu için tavsiye edilmektedir (9) :

1) Flury HEP suşu ile tavuk embriyonu ve Suriye hamsteri böbrek hücre kültürlerinde hazırlanan canlı aşı,

2) Flury HEP ve CVS suşları ile diploid hücre kültüründe hazırlanan canlı ve inaktive aşı,

3) CVS suşu ile Suriye hamsteri böbrek hücre kültüründe hazırlanan inaktive aşı,

4) Sad suşu ile Suriye hamsteri böbrek hücre kültüründe ve koyun embriyonu böbrek hücre kültüründe hazırlanan atenüe aşı.

Kuduz aşılarının tesir derecesi : McKendrick ve Veeraraghavan'ın istatistiklerine göre ısırılmış ve tam bir kuduz aşısı şeması tatbik edilmiş şahısların % 0,33 ünde hastalık husule gelmektedir. RSSCB deki tecrübelerle göre, enkübasyon süresi 45 günden uzun olan vak'alarda aşı müessir olmaktadır. Tehlikeli bölgelerdeki ısırıklar ve vahşi hayvan, bilhassa kurt ısırıklarında kuduz aşısı kâfi derecede müessir olamamaktadır. Enkübasyon devri 2-4 haftadan kısa olan vak'alarda kesif bir aşı şeması dahi aktif immünite verememektedir. Aşının müessiriyeti hiperimmün kuduz serumu veya gama globulinin teşriki ile arttırılmaktadır (8) (20).

RSSCB de prüfiye ve konsantre kuduz serumu istihali 1955 te başlamıştır. Kuduz serumu, önce fenollü koyun veya tavşan beyin aşısı, sonra sabit viruslu beyin süspansiyonu ile aşılana atlardan elde edilir. Bu serum soğukta etil alkol ile konsantre edilerek pür gama globulin fraksiyonu ayrılır. Gama globulin, amonyum sulfatla konsantre edilen serumdan daha aktiftir. Tecrübeler, gama globulin veya gama globulin + aşı kombinasyonunun çok müessir olduğunu, yalnız aşı verilmesinin tesirsiz olmakla kalmayıp enfeksiyonu arttırdığını göstermiştir. Farelerde enkübasyon süresi ortalama 12 gün olduğundan bu kısa sürede aşı müessir olamamaktadır. RSSCB de 1957 - 1961 arasında kuduz kurt tarafından ısırılan ve kombine tedavi gören 79 kişide % 100 koruma elde edilmiştir. Yalnız aşı almış 3 kişi ise 12 - 14 günlük bir enkübasyondan sonra kuduza tutulmuşlardır.

Aşı ile gama globulin aynı zamanda verilirse aşı immünitesi aşikâr derecede inhibisyona uğramaktadır. Devamlı ve kesif pasif ve aktif bağışıklık husulü için kâfi miktarda serum ve tam bir aşı şeması tatbiki lâzımdır.

ABD de maymunlara sokak virusu zerkinden sonra serum, serum ve aşı, yalnız aşı verilerek yapılan tecrübelerde, serumları alınıp titre edildiği zaman şu hususlar tesbit edildi: Yalnız serum alanlarda 24 saat sonra antikor vardı ve 7-10 gün devam etti; yalnız aşı

alanlarda 10 güne kadar antikor yoktu, sonra yükseldi; serum ve aşı alanda antikor erken meydana gelip gittikçe yükseldi. Aşı dozunu azaltma tecrübelerinde, serum ve 7 gün aşı verilenlerde antikor önce yükselip sonra düştü; yalnız aşı verilende ise yükseldi. Serum ve 14 gün aşı verilende antikorlar erken yükseldi ve devam etti. Görüldü ki, serumdan sonra verilen 7 doz aşı, serumun aşıya karşı interferens göstermesi ile tesirsiz kalıyor. Bu interferensi yenmek için, serumdan sonra en az 14 doz aşı ve 14 veya 21 günlük aşı şemasının son dozundan sonraki 10. ve 20. günlerde birer bustır doz verilmelidir.

Kuduz aşısının liyofilizasyonu :

RSSCB de hazırlanan Fermi aşısının bir kısmı liyofilize edilmektedir. Bunun için, pH 7.2 fosfat tampon mahlülündeki % 20 beyin süspansiyonuna eşit hacimde % 1 jelatin ve % 15 glikoz veya sakkaroz solüsyonu ilâve edilerek 1,5 cc miktarında ampüllere tevzi edilir. —70°C de dondurulur ve 100 mikron vakumda oda hararetinde 24 - 72 saat kurutulur. Aşı kullanılacağı zaman fizyolojik tuzlu su ile sulandırılır. Kuru aşıda kudret ve zararsızlık testleri yapılır. 37°C de 7 gün saklanan aşının kudretini muhafaza etmesi icabeder. Kuru aşı - 4°C de 1,5 sene, 37°C de 2 hafta dayanır.

Non-allerjik kuduz aşısı (sıçan aşısı) :

Yetişkin hayvan beyinlerinden hazırlanan aşılar da bulunan bazı allerjen maddeler ensefalit ve nöro-paralitik aksidana sebep olmaktadır. Tavuk embriyonundan hazırlanan aşılar ise tavuklarda bulunan latent virüsleri ihtiva edebilmektedir. Koyun ve kobay beyni de ensefalitojenik bulunmuştur. Bu vasıf tavşan beyininde daha azdır. Yapılan tecrübelerde meme emen sıçan yavrularının beyinlerinin ensefalit yapmadığı görülmüştür.

Meme emen yavru sıçan beyininden non-ensefalitik aşı hazırlamak için, 4 - 7 günlük bebe sıçanlar, tavşan beyininde üretilmiş sabit Pasteur virüsü ile (1/100 dilüsyonunda) beyiniçi 0,03 cc zerk suretiyle enfekte edilirler. Üçüncü gün hastalanan (konvülsiyon, meme emmeme, yana yatma) bebe sıçanlar eterle öldürülüp % 5 fenolde müteaddit defalar yıkanır ve steril boksa alınır. Steril şartlarda baş derisi çıkarılır ve beyin dışarı alınır. Her beyincikten yapılan sterilite testi 5 gün takip edilir. Steril olan beyinler bir araya getirilip ho-

mojenize edilir. Bir beyin 0,5 - 0,7 gr gelmektedir. Eğer likit aşı yapılacaksa % 1 fenollü fizyolojik tuzlu su ile % 5 süspansiyon olacak şekilde sulandırılır. 22°C de 8 gün inaktive edilir. 3 cc olarak ampüllere tevzi edilir. Kuru aşı hazırlanacaksa distile suda % 1 fenol solüsyonu ile % 20 süspansiyon yapılır. 22°C de 14 gün bekletilerek inaktive edilir. Sonra aşıya distile suda % 15 sakkaroz ve % 1 jelatin ihtiva eden stabilizan madde eşit miktarda ilâve edilir. 6 cc lik ampüllere 1,5 cc olarak tevzi edilir. —45° - —50°C de muhafaza edilir. 18 saat sonra aşı kurutma cihazına konur. Burada 26° - 28°C de 36 saat kurutulduktan sonra ampüller vakumda kapatılır. Bundan sonra aşı titre edilir, ensefalopatojeni ve tromboplasti yapıp yapmadığı araştırılır. Bu aşının tromboplasti ve ensefalit yapmadığı tecrübelerle gösterilmiştir. Ensefalopatojenite, 450 gr. lık kobayların beş muhtelif yerine derialtı 0,2 cc zerk suretiyle araştırılır. Hazırlanan 24 seri aşı 240 kobayda tetkik edilmiş, hiç ensefalit görülmemiştir. 94 kobaya yetişkin fare beyni zerkesilmiş, 58 i ensefalitten ölmüştür.

Kuru aşı fizyolojik tuzlu su ile sulandırılarak tatbik edilir. Aşı seması Fermi'de olduğu gibidir. 1963 te Moskova'da 703 kişi sıçan aşısı ile mulitelif miktarlarda aşılandı. 160 kişiye de Fermi aşısı verildi. Lokal reaksiyonlar sıçan aşısında % 27,7, Fermi'de % 30 idi. Genel reaksiyonlar sıçan aşısında % 2,7, Fermi'de % 8 bulundu. Fermi yapılanların birinde de şok görüldü.

Maruziyet - öncesi immünizasyonu (Pre-exposure immünization) :

Veterinerler, köpek alım satımı yapanlar ve hatta posta müvezileri (Detroit'te bir senede 7000 postacı ev köpekleri tarafından ısırılmıştır) gibi devamlı olarak tehlikeye maruz kalanlar enfeksiyonu almada evvel immünize edilmeli ve bu bağışıklık maruziyet devamınca idame edilmelidir. Bu gaye için mevcut herhangi bir inaktive aşı kullanılabilir. Eğer sinir dokusu ihtiva etmeyen bir aşı varsa tercih edilir. Şu basitleştirilmiş şemanın, daha fazla verilecek doz kadar iyi netice verdiği görülmüştür. 2 - 4 hafta ara ile 2 doz aşı ve 4 - 6 ay sonra tek bir bustır doz. Şunu belirtmek lâzımdır ki bazı şahısların serumlarında herhangi bir şema ile dahi virus nötralizan antikorları husule gelmez. Bu sebeple, enfeksiyon vukuundan evvel aşılana bütün şahıslardan, bustır dozdan 1 ay sonra kan alınması ve serumlarında spesifik antikorların aranması şarttır.

Eğer antikor mevcutsa bu şahıslara, tehlikeye maruz kaldıkları müddetçe her 2 senede bir, 1 bustır doz verilir. Bu arada enfeksiyon alınır ve bu hafif veya orta derecede ise, 5 gün ara ile 2 bustır doz verilir. Eğer enfeksiyon şiddetli ise tam bir serum ve aşu (21 doz) tedavisi yapılır. Eğer şahsın serumunda antikor yoksa tekrar 1 bustır doz yapıhp şahsın serumu kontrol edilir (11).

Transpolar bölgelerdeki «Dikovanie» hastalığının ekolojisi :

Transpolar bölgelerde arktik tilkilerde, adi tilkilerde, köpek ve diğer hayvanlarda görülen ve klinikman ensefalomiyelite, kuduza benzeyen Dikovanie = running wild hastalığı yakın zamanlara kadar iyice tetkik edilmemişti. RSSCB nin muhtelif yerlerinde vahşi ve ehli hayvanlar arasında periyodik kuduz epizootileri ve bazen insanlarda kuduz vak'aları görülmesi, enfeksiyonu tabii mihrakında aktive eden mekanizmanın biran evvel tetkikini icabettirdi. 1955 - 1962 yıllarında RSSCB nin kuzey bölgesinde dikovanye hastalığının tabii mihraklarında muntazam gözlemler yapıldı. Dikovanye hastalığı görülen muhtelif cins hayvanlardan, tavşan, kobay, beyaz fare, pamuk sıçanı, köpek ve arktik tilkiler için patojen bulunan 76 suş izole edildi. Bu suşlar biyolojik ve antijenik karakterleri itibariyle sokak kuduz virusuna müşabih, fakat kürkli hayvanların ensefalomiyeliti, Aujesky hastalığı, distemper ve diğer hastalık amillerinden farklı bulundu. İlk defa olarak dikovanye hastalıklı hayvanların beyin hücrelerinde Negri'ye benzer sitoplazmik inklüzyon cisimcikleri tesbit edildi. Müteaddit epizooti ve inter-epizooti devrelerinde sıhhatli muhtelif kuş ve hayvanlar öldürülerek virolojik muayeneler yapıldı. Neticede, transpolar bölgelerde kuduz virusunun arktik tilkiler tarafından idame edildiği görüldü. Sıhhatli arktik tilkilerin beyinlerinden epizooti mevsimlerinde % 50 - 75 ve morbiditenin az olduğu yıllarda % 5 - 6 nisbetinde dikovanye virus izole edildi. Bu suretle, arktik tilkilerin, semptomsuz olarak enfekte olan kronik virus portörü oldukları fikrine varıldı. Diğer hayvan cinsleri, hastalığın aktive olduğu epizooti devrelerinde enfekte olmaktadırlar. Kütleli olarak tetkik edilen kemiricilerde virus bulunmamıştır. Periyodik dikovanye epizootileri, arktik tilkilerin adetlerinin arttığı ve hayvanlar arasında temasın fazlaştığı senelerde enfeksiyonun aktive olması ile husule gelir. Bu sırada virus hayvanların tükrük bezlerinde de bulunur. Bilhassa genç, hassas hayvanların çoğaldığı bu mevsimler hastalığın aktivasyonunda büyük rol oynar (10).

L I T E R A T U R E

- 1 — Laboratory Techniques in Rabies. Wld Hlth Org. Monograph series No. 23
- 2 — Dean, D.J., Sherman, I. : The NYLAR test for measuring potency of antirabies vaccines. Document of WHO meeting of rabies research workers. Geneva, 7-11 October 1963. Agenda item 3.3
- 3 — Lépine, P., Atanasiu, P. : Research on antigenicity, growth dynamics and morphology of rabies virus in tissue culture. *Ibid.*, Agenda item 3.1.2
- 4 — Habel, K. : Further studies with rabies virus grown in chick embryo tissue culture. *Ibid.*, Agenda item 3.1.2
- 5 — Expert Committee on Rabies, Fourth Report. Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser. 1960, 201
- 6 — Goldwasser, R.A., Klissling, R.E., Carski, T.R. : Fluorescent antibody staining of rabies virus antigens in the salivary gland of rabid animals. Bull. Wld Hlth Org. 1959. 20, 579 - 588
- 7 — Local treatment of rabies-infected wounds. WHO Chronicle, Vol. 18, No. 7, July 1964
- 8 — Selimov, M.A. : Specific prophylaxis of rabies in man. Antirabic gamma globulin, combined immunization with vaccine and gamma globulin, its effectiveness. Document and conference given at the Seminar.
- 9 — Selimov, M.A. : Specific prophylaxis of human rabies. Antirabic vaccines and their effectiveness. *Ibid.*
- 10 — Kantorovic, R.A. : On the ecology of «Dikovanie» in the transpolar regions. Document of WHO meeting of rabies research workers, Geneva, 7-11 October 1963 Agenda item 3.7
- 11 — Habel, K. : Pre-exposure immunization. The Rabies Seminar Working paper No. 1
- 12 — Kaplan, M. : Basic characteristic of the rabies virus. The Rabies Seminar Working paper No. 2
- 13 — Kaplan, M. : Fluorescent rabies -antibody test. The Rabies Seminar Working paper No. 3
- 14 — Kaplan, M. : Clinical manifestation of rabies in animals. The Rabies Seminar Working paper No. 5
- 15 — Mirchamsy, M., Razavi, J., Bahmanyar, M. : Preparation of antirabies serum from the mule. The Rabies Seminar Working paper No. 7
- 16 — Preparations of solutions for the fluorescent antibody test. The Rabies Seminar Working paper No. 8

- 17 — Semlnova, B.V. : The clinical picture and treatment of Hydrophobia. Document given at the Seminar.
- 18 — Report of the WHO meeting on rabies research, Paris, 9 - 13 May 1961
- 19 — Report on the WHO meeting of rabies research workers, Geneva, 7 - 11 October 1963
- 20 — Veeraraghavan, N. : The value of % 5 Semple vaccine in human treatment; comparative mortality among the treated and untreated. *Ibid.* Agenda item 3.5
- 21 — Wiktor, T.J., Fernandes, M.V. and Koprowski, H. : Potential use of human diploid cell strains for human vaccine. *Ibid.* Agenda item 3.1.2
- 22 — Vanag, K.A. : Antigenic structure of the street rabies virus. *Ibid.*
- 23 — Vanag, K.A. : The ultrastructure and nature of Negri bodies. *Ibid.*