(Mikrobiyol Bült, 24: 321-326, 1990)

İNDİREKT FLUORESAN ANTİKOR TEST İLE ANTİNÜKLEER ANTİKOR SAPTANMASINDA ÇEŞİTLİ HÜCRE KÜLTÜRÜ ANTİJENLERİNİN KULLANILMASI*

USE OF VARIOUS CELL CULTURE ANTIGES IN INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TEST FOR DETECTION OF ANTINUCLEER ANTIBODY

Ömer KOCABEYOĞLU, Gürol EMEKDAŞ***, Nevin YÜCEL****
Nurettin ÖZCAN*****

Özet: Serumlarda İndirekt fluoresan antikor test (IFAT) ile antinükleer antikor (ANA) saptanmasında antijen olarak lamlar üzerinde üretilen Vero, BHK-21 ve Hep-2 hücre kültürlerinden yararlanıldı. Bu antijenler kullanılarak KB IFAT ANA test kitleri (Virgo) ile 1/20 titrede pozitif bulunan 55 serum örneğinde aynı titrede ANA araştırıldı. 50 serum (% 91) Vero antijenleriyle, 46 serum (% 83) BHK-21 antijenleriyle ve 44 serum (% 80) Hep-2 antijenleriyle 1/20 titrede pozitif bulundu. Lamlar üzerinde üretilen Vero hücre kültürlerinin IFAT ile ANA araştırılmasında antijen olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Summary: Cell culture antigens were prepared from Vero, BHK-21 and Hep-2 cells which were propagated on slide, for detection antinucleer antibody (ANA) in sera with indirect fluorescent antibody test (IFAT). ANA were investigated in 55 sera which were positive at 1/20 titer with KB IFAT ANA test kits (Virgo), by using these cell culture antigens. 50 sera (91%) with Vero antigens, 46 sera (83%) with BHK-21 antigens and 44 sera (80%) with Hep-2 antigens were found positive at 1/20 titer. As conclusion Vero cell culture which is propagated on slide can be used as antigen for detection of ANA with IFAT.

---

* 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi'nde (19-21 Eylül 1989, İstanbul) tebliğ edilmiştir.

** Doç. GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi.
*** Yrd. Doç., GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi.
**** Yük. Lis. Öğr., GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı.
***** Prof., GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Başkan Vekili.

GİRİŞ

Yıllar boyunca normal sağlıklı bireylerin self tolerans sonucu kendi antijenlerine karşı bağışık yanıt oluşturmadıklarına inanılmış (9), ancak hücre immünolojisi, moleküler biyoloji ve genetik alanındaki son gelişmeler otoimmünite hakkındaki düşünceleri önemli ölçüde etkilemiştir (8). Günümüzde vücudun kendi doku antijenlerine karşı fizyolojik olarak bir dereceye kadar bağışık yanıt verebileceği kabul edilmektedir (9). Bazı bilim adamları otoantikorların, biyolojik görevi olduğuna inanmaktadır. Bunların parçalanmış hücre ürünlerinin taşınma ve tahribinde yardımcı olduğu düşünülmektedir (6).

Otoimmün cevabın önceleri düşünüldüğü kadar seyrek olmadığı ve aynı zamanda tüm otoimmün cevabın zararlı olmadığı anlaşılmıştır (8). Birçok patolojik olayda ve enfeksiyon hastalıklarında otoantikorlar oluşabilir, ancak bunlar geçici olup bireye zarar vermezler (2). Diğer taraftan bu geçici otoimmün cevap, suppressif hücreler tarafından süratle kontrol altına alınmaktadır. Bu kontrol mekanizmasının bozulması sonucu otoreaktif lenfosit klonları çoğalmakta ve fazla miktarda otoantikor oluşmaktadır (9). Normalde geçici olabilen otoimmün cevabın sürekli olması patolojik olaylara neden olur (2). Bu şekilde gelişen hastalıklara otoimmün hastalıklar denir (2, 6, 9).

Otoimmün hastalıklarda oluşan çeşitli otoantikorlardan biri de antinükleer antikor (ANA)'dur ve görülme oranı % 8 - % 99 arasında değişmektedir (6). Bazı ilaçlar da ANA oluşumuna neden olmaktadır (7). ANA saptanmasında IFAT kullanılmakta (1, 3, 4, 5, 6) ve bu testte antijen olarak fare ve rat karaciğer kesitlerinden yararlanılmakta (3, 5, 6, 8) ve bunların ticari kitleri (Scimedx) bulunmaktadır. Ayrıca ANA saptanmasında Hep-2, KB ve BHK-21 devamlı hücre kültürlerinden de yararlanılmakta ve bunların ticari kitleri bulunmaktadır (KB Virgo; Hep-2 Scimedx, Virgo; BHK-21 Behring).

Bu çalışmada KB (Virgo) IFAT ANA kitleri ile 1/20 titrede pozitif bulunan 55 serum örneğinde Vero, BHK-21 ve Hep-2 hücre kültürlerinden hazırlanan antijenler kullanılarak ANA araştırılmış ve hangi hücre kültürü antijenlerinin ANA araştırılmasında daha uygun olacağının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

A) SERUMLAR: Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na otoimmün hastalık şüphesiyle

gönderilen ve ANA KB IFAT kitleri ile 1/20 titrede pozitif bulunan 55 serum örneği ayrılmış ve kullanılıncaya kadar –40°C de saklanmıştır.

B) ANTİJENLER: Vero, BHK-21 ve Hep-2 hücreleri petri kutularına yerleştirilmiş lamlar üzerinde 37°C de CO_2'li etüvde üretilmiş ve antijen olarak kullanılmıştır. Vero ve Hep-2 hücre kültürlerinin üretilmesinde % 10 dana serumlu Eagle MEM (Gibco) ve BHK-21 hücre kültürünün üretilmesinde % 10 serumlu Glaskow MEM (Gibco) besiyerleri kullanılmıştır. 2 nci günde lam yüzeyinin % 30-50'sinin hücrelerle kaplandığı görüldükten sonra, etüvden alınan petri kutularından lamlar çıkarılmış PBS ile yıkandıktan sonra oda ısısında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra metil alkol ile 10 dakika tesbit edilen preparatlar, hava almayacak şekilde naylon torbalara yerleştirilmiş, kullanılıncaya kadar 4-8°C de saklanmıştır.

C) ANA IFAT'IN UYGULANIŞI: Üzerinde tesbit edilen hücre kültürü antijenleri bulunan her lam, sellülozik siyah boya ile 6'ya bölünmüş, ve herbir bölme bir serum örneği için kullanılmıştır. Hücre kültürü antijenlerine 50 şer mikrolitre 1/20 dilüye serum ilave edilip nemli ortamda 37°C de 30 dakika bekletildikten sonra, içerisine magnetik karıştırıcı konmuş yıkama apareyinde arada bir defa değiştirilen PBS içerisinde yıkama işlemi yapılmıştır.

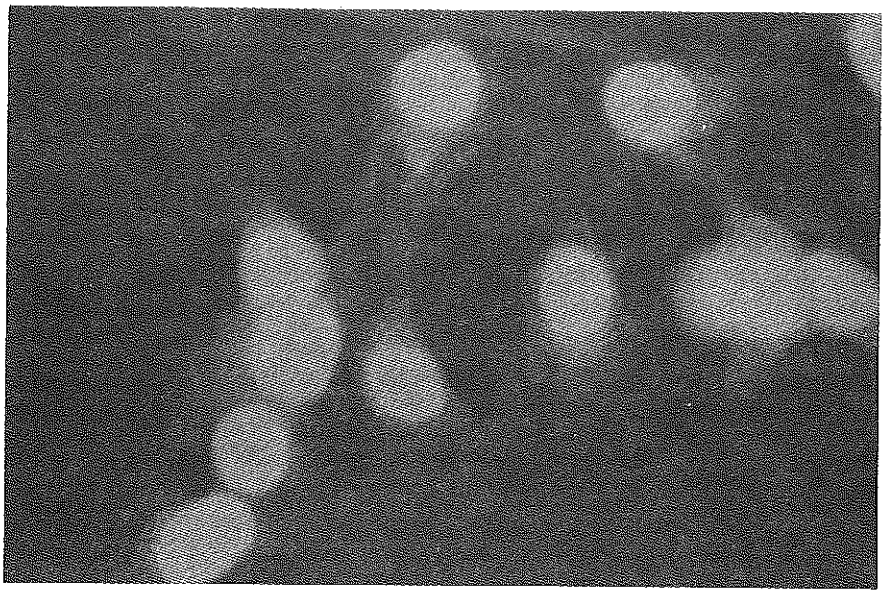
FITC ile işaretli antihuman IgG (Behring Lot. 128813 C) 1/30 dilüye edilerek, final konsantrasyon 10^{-4} olacak şekilde Evans blue (Sigma lot. 28 F 6099) eklenmiş ve yatay durumdaki lamlar üzerindeki her bölmeye 50 mikrolitre konulup hafifçe yayılarak, 37°C nemli ve karanlık ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Yıkama işlemi bu defa karanlık ortamda yukarıda belirtildiği şekilde tekrarlanmıştır.

Lamlar üzerine kaplama solüsyon (1 kısım gliserin + 9 kısım PBS) damlatılıp lamel kapatılarak Nikon Optiphot 100 W Hg fluoresan mikroskopta 40 X objektif kullanılarak incelenmiştir. Hücre nükleuslarında, periferik, diffüz, benekli veya nukleus'da görülen sarı-yeşil fluoresans pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

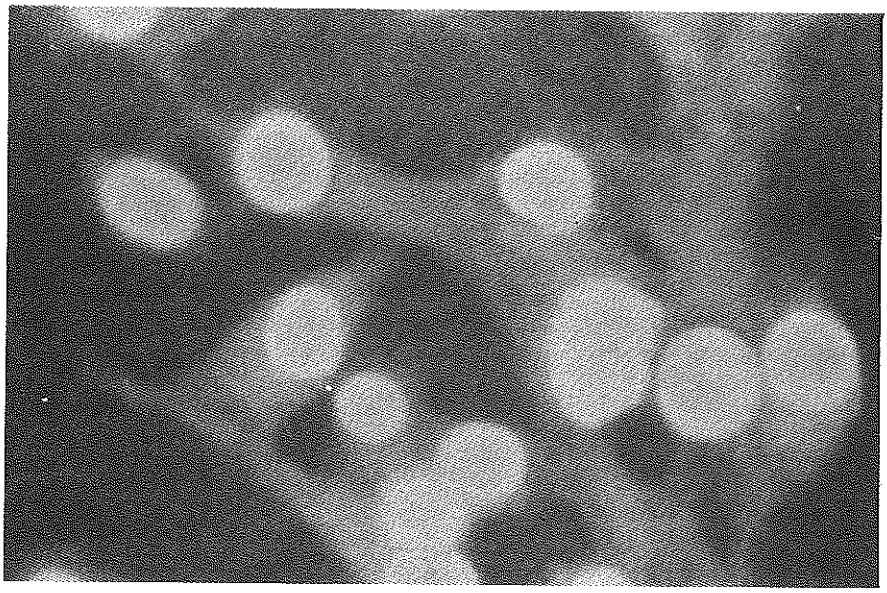
BULGULAR

KB ve Vero hücre kültürü antijenleri ile IFAT ANA pozitifliği Resim 1 ve Resim 2'de görülmektedir.

KB IFAT ANA pozitif bulunan 55 serumun Vero, BHK-21 ve Hep-2 hücre kültürü antijenleri ile alınan sonuçlar Tablo 1'de görülmektedir.



Resim 1: **KB IFAT ANA pozitif sonuç (600 X)**



Resim 2: **Vero IFAT ANA pozitif sonuç (600 X)**

Tablo 1

KB IFAT İle ANA Pozitif Bulunan 55 Serumun Değişik Hücre Kültürü Antijenleri İle Elde Edilen Sonuçları

Çalışılan Hücre Kültürü	Pozitiflik Oranı		
	Pozitif	Negatif	Toplam
VERO	50 (91)	5 (9)	55 (100)
BHK–21	46 (83)	9 (17)	55 (100)
HEP–2	44 (80)	11 (20)	55 (100)

( ) = % oranlarını ifade eder.

Tablo 1'de görüldüğü gibi, KB IFAT ANA pozitif bulunan 55 serumdan 50'si (% 91) Vero, 46'sı (% 83) BHK-21 ve 44'ü (% 80) Hep-2 hücre kültürü antijenleri ile pozitif sonuç vermiştir. Vero hücre kültürü ile elde edilen sonucun daha uyumlu olduğu gözlenmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Serumda ANA araştırılmasında IFAT testi yaygın olarak kullanılmaktadır (3, 5, 6, 8). Bu testte antijen olarak genelde rat karaciğer kesitlerinden yararlanılır (3, 8). Çeşitli hücre kültürlerinden hazırlanan ticari ANA kitleri bulunması ve bunların fiatlarının pahalı olması bizi, laboratuvarımızda bulunan çeşitli hücre kültürlerini bu amaçla kullanmaya yöneltti. 48 testlik KB IFAT kit fiatı 693.000 TL. olarak bildirilmiştir. Bu durumda tek dilüsyon için bir ANA testinin maliyeti 17.000 TL.dır. Oysa çalışmamızda FITC ile işaretli antihuman IgG konjugat fiatı da dahil bir testin maliyeti maksimal 1.000 TL.dır.

Çalışmada kullanılan Vero, BHK-21 ve Hep-2 hücre kültürleriyle alınan sonuçların KB IFAT ANA sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, en uyumlu sonucun Vero hücre kültürüyle alındığı ve KB IFAT ANA kiti ile alınan sonuçlarla % 91 oranında uyumlu olduğu saptanmıştır.

Vero hücre kültüründen antijen hazırlanması kolay, ucuz ve pratik bir yöntemdir. Ayrıca bu yöntemde pahalı bir alet olan kriyostata ihtiyaç bulunmamaktadır.

Sonuç olarak; IFAT ile ANA araştırılmasında lamlar üzerinde üretilen Vero hücrelerinin antijen olarak kullanılabileceği ve değişik orijinli hücre kültürleri kullanılarak benzeri araştırmalar yapılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmadaki yardımlarından dolayı Lab. Hüsne BEKTAŞ ve Lab. Zülfü GÖNÜLLÜ'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Aksöz N, Gülmezoğlu E: Kanserli hasta serumlarında immünofloresans yöntemi ile otoantikorların araştırılması. Doğa Bilim Dergisi, 2 (1): 6-8, 1977.
2. Bier OT, Silva WD, Götze D, Mota I: Fundamentals of Immunology, p. 364-396. 1981, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.
3. Johnson GD, Dorling J: Immunofluorescence and immuno-peroxidase techniques. p. 106-129. In Thompson RA (Ed), Techniques in clinical immunology, 1981, Second edition, Blackwell scientific publications, Oxford, London, Boston.
4. Johnson GD, Holborow EJ, Glynn LE: Antibody to smooth muscle in patients with liver disease. The Lancet, 10: 878-879, 1965.
5. Mengü F, Gülmezoğlu E: Otoimmün hastalıkların tanısında kullanılan testler. Mik Bült, 11 (3): 441-449, 1977
6. Roitt I: Essential immunology. Second edition., Blackwell scientific publications, Oxford, p. 211-242, 1974, London.
7. Schwartz RS: Progress in clinical immunology. Vol. 4, 1980, Grune and Stratton, p. 1-21, New York.
8. Stites DP, Stobo JD, Wells JV: Basic clinical immunology. Sixth edition, p. 128-158, Appleton lange, California.
9. Tizard JR: Immunology: an introduction. p. 396-410, Saunders college publishing, 1984, Philadelphia.