

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI

16

ALS'DA VİRAL ANTİKORLAR
ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

(UZMANLIK TEZİ)
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ
DR.KEMAL ÖZALP
ANKARA,1987

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

ÖNSÖZ

Amyotrophic lateral Skleroz'un etyolojisine yönelik çalışmalar 1880'lerden bu yana geniş bir ilgi alanı oluşturmuş, son yıllarda özellikle yavaş virus enfeksiyonları üzerinde yoğunlaşmıştır. Buna karşılık virus izolasyonu yapılamamış ve farklı yöntemlerle yapılan araştırmalar, bazen biriyle çelişen sonuçlar vermiştir. Bu çalışmada daha önce yapılan araştırmaların ışığı altında; yavaş virus enfeksiyonuna yol açması muhtemel virusların etyopatogenezdeki rollerini araştırıp, bu konudaki tartışmalara yeni bir halka eklemek amaç edinilmiştir.

Çalışmalarım sırasında büyük yardımlarını gördüğüm Sayın Hocam Doç.Dr. Ceyla İRKEÇ ve Sayın Doç.Dr. Şemsettin USTAÇELEBİ'ye bu fırsatla teşekkür ederim.

Dr. Kemal ÖZALP

OCAK, 1987/ANKARA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
GEREÇ VE YÖNTEM	18
BULGULAR	25
TARTIŞMA	34
ÖZET	40
SUMMARY	41
KAYNAKLAR	42

GİRİŞ

Santral sinir sisteminin yavaş virus enfeksiyonları son yıllarda önemi artan, etyolojisi bilinmeyen, etkin bir tedavi şekli bulunmayan bazı dejeneratif ve demiyelinizan hastalıkları içine almaktadır. Bu gruba Amyotrofik Lateral Skleroz'un (ALS) yanısıra Creutzfeldt-Jakob (CJ), Kuru, Subakut sklerozan Panensefalit (SSPE), Progressif multifokal lökoensefalopati (PML), Progressif rubella panensefaliti (PRP), Parkinson hastalığı (PH) ve Multipl Skleroz (MS) gibi hastalıklar girmektedir. Bu gruptaki Hastalıklarda konvansiyonel veya konvansiyonel olmayan virusların etken olduğu yavaş virus hastalıklarının etyopatognetik rolü gösterilmiştir(1-4).

Dejeneratif ve demiyelinizan hastalıklarda yapılan virolojik ve immunolojik çalışmalar paramiksoviruslar, Herpes, papova ve enteroviruslar üzerinde yoğunlaşmaktadır(5-10). Serolojik çalışmaların yanısıra yapılan virus izolasyon çalışmaları kısıtlı bir hastalık grubunda ve ancak tripsinize beyin hücrelerinin endikatör hücrelerle bir arada kültüre edilmesi veya daha karmaşık hücre füzyon tetkikleri ile gerçekleştirilebilmiştir (2,8,11,12). Bunun nedeni virusun konakçı hücre ile moleküler düzeyde çok sıkı bir genetik ilişki kurması, ve mutasyona uğramasından kaynaklanabilir (13).

Amyotrofik lateral skleroz yaygın bir hastalık olmasına rağmen kamuoyunda bu hastalığa yakalanmış Başkan Henry A. Wallace, Boksör Ezzard Charles, Cazcı Charlie Mingus, Sinema oyuncusu David Niven ve Yorumcu Dimitri Shostakovic gibi ünlü kişilerin isimleriyle birlikte anılır (14).

ALS etyolojisinde'de endojen ve eksojen toksinler, nöronların biyokimyasal bozuklukları, genetik faktörler, immüno- lojik ve endokrin faktörler, yavaş virus enfeksiyonları ve motor nöronlarda DNA anormalliği üzerinde durulmuştur (15,16). Bu görüşler içerisinde en fazla ilgi toplayanlar virüslere ve DNA yapısına yönelik olan çalışmalardır.

Çalışmamızda ALS tanısıyla Gazi Tıp Fakültesi ve İstanbul Tıp Fakültesi Nöroloji kliniklerinde takip edilen 48 hasta, 20 diğer nörolojik hastalıklar (Alzheimer, MS, Serebrovaskular hastalık, Parkinson) ve 50 kontrol olgusunda viral antikörlerin sıklığı ve etyopatogenezdeki rollerini araştırmak amacıyla alınan serumlarında Poliovirus tip 1, kızamık virüsü ve Herpes simpleks virüsü tip 1'e (HSV tip 1) karşı antikörlerin varlığı kompleman birleşmesi yöntemiyle araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

ALS ya da diğer adıyla "motor nöron" veya "motor sistem" hastalığı, özellikle spinal kord ve medulla oblongata'nın ön boynuz hücreleri ile kortikospinal yolları tutan, daha çok orta-ileri yaşlarda görülen, ilerleyici, dejeneratif ve fatal bir hastalıktır. Klinik olarak sıklıkla üst ekstremitelerde ve bulbus innervasyonlu kaslarda atrofi ve fasi-kalasyon gibi alt motor nöron; alt ekstremitelerde ise spastisite ve hiperrefleksi gibi üst motor nöron belirti ve bulgularıyla karakterizedir (17,18). Motor nöronları ilgilendiren hastalıklar sınıflamasında "Primer motor sistem hastalıkları" arasında yer alır.

ALS bugünkü anlamıyla ilk kez 1869'da Charcot ve Joffroy tarafından tanımlanmıştır. Patolojik sürecin ileri ya da son dönemlerinde genelde alt ve üst motor nöronların büyük bir çoğunluğu tutulmakla birlikte, vakalar klinik tablonun başlangıç tarzına göre üç ayrı grupta incelenebilir.

I- Progresif bulber palsy (Duchenne): Medulla oblongata motor nöronlarının tutulması ile oluşan klinik tablodur.

II- Progresif muscüler atrofi (Aran-Duchenne): Spinal kord motor nöronlarının dejenerasyonuna bağlı gövde ve ekstremitelerde kaslarının tutulması ile karakterizedir.

III- Amyotrofik lateral Skleroz (Charcot) = Kortikospinal yollarının tutulmasına ait bulgulara ek olarak bulbus ve spinal kord innervasyonu kaslarda atrofi olur.

Vakalar ister üst motor nöron dejenerasyonu şeklinde pür spastik, ister alt motor nöron dejenerasyonu şeklinde pür atrofik formda başlasın, sonuçta bu iki klinik tablo birbirine eklenerek ALS ya da motor nöron hastalığı oluşmaktadır. Motor nöron hastalığı deyimini bazı yazarlar, temel patolojik değişimlerin motor nöronlarda olduğu gerekçesiyle tercih ederler.

ALS insidansı Kurland'a göre 100.000'de 1.4'tür. Prevalansın ise 100.000 kişide 2,5-7 arasında değiştiği belirtilmektedir. Erkeklerde kadınlara oranla ikiüç kat fazla görülür. Büyük bir çoğunlukla 50-70 yaşlarında başlar, çok seyrek olarak adolesan ve çocukluk döneminde görülebildiği gibi, daha geç dönemlerde de ortaya çıkabilir.

Epidemiyolojik ve Genetik özellikler: ALS'a sıklıkla sporadik olarak rastlanır. Bu formu dünyanın her bölgesinde ve her ırkında görülür. Buna karşılık dünyanın bazı bölgelerinde endemiktir. Hastalığın endemik olduğu yerler arasında Pasifik Okyanusu'nun batısında bulunan Mariana adalarından Guam (özellikle bu adanın Chomorro yerlilerinde) ve Japonya'nın Kii yarımadası sayılabilir. Bu bölgelerde hastalık diğer ülkelerdeki genel görülme sıklığına oranla 50-100 misli daha fazla görülmektedir. Guam tipi ALS vakalarının büyük çoğunluğunda klasik klinik tabloya ek olarak Parkinsonizm-

Demans komplekside görülür. Çok nadir'de olsa sporadik vakalarda ALS-Parkinsonizm-Demans şeklinde ortaya çıkabilir.

Endemik ALS'un dominant geçişli genetik bir kökenimi olduğu, yoksa hem genetik, hem yavaş virus, veyahutta özel bir diyet faktörü gibi çevresel etmenlere mi bağlı olarak ortaya çıktığı iyi bilinmemektedir. Diyet faktörü olarak en çok "Cycos circinal" denilen bir fındık türü üzerinde durulmuştur. Öte yandan Guam ve Kii'de yapılan araştırmalarda toprakta normalden çok miktarlarda manganez saptanmıştır. Manganez'in türlü nedenlerle hiperkalsemisi olan kişilerde aşırı emilimi sonucu endemik ALS'a yol açabileceği ileri sürülmüştür.

ALS en çok sporadik olarak görülmekle birlikte, endemik olduğu bölgeler dışında familyal nitelikte'de ortaya çıkabilir. Bir çok ailede dominant, resesif ve sekse bağlı resesif geçiş gösterdiği bilinmektedir. Hastalığın bu formu tüm vakaların yaklaşık % 10'unu kapsar.

Johnson ve arkadaşları otozomal dominant vakalara nazaran çok daha seyrek görülen otozomal resesif vakaları incelemişler. Bu tip ailelerdeki bazı fertlerde tipik Tay-Sachs hastalığı tespit etmişler. Gerek ALS'lu hastalarda, gerekse Tay-Sachs'lı hastalarda Hexosaminidase eksikliği bulmuşlar, fakat bu enzimin ne yolla azaldığını açıklayamamışlardır. Normal sinirlerdeki Hexosaminidase'in rolü'de bugün için henüz anlaşılmamıştır (14).

Etyoloji: Dejeneratif hastalıklarda en eski görüşlerden biri olan abiotrofi varsayımı ALS için de ileri sürülmüştür. Bunun anlamı muhtemelen hücre içi enzimatik yetersizlikler sonucu hücrenin erken yaşlanması ve canlılığını yitirerek işlev dışı kalmasıdır. Abiotrofi'nin tek başına bir neden olduğunu kabul etmek ne kadar zorsa, bu sürecin ALS etyolojisinde rol oynadığı ileri sürülen diğer tüm faktörlerle etkileşim içinde olabileceği o denli akla yakındır.

Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda etyoloji de endojen ve eksojen toksinler, nöronların biyokimyasal bozuklukları genetik faktörler, immunolojik ve endokrin faktörler, yavaş virus enfeksiyonları ve motor nöronlarda DNA anomaliliği üzerinde durulmaktadır (15).

Bu görüşler içinde en fazla ilgi toplayanlar viruslara ve DNA yapısına yönelik olan çalışmalardır. DNA anomalisi ve bunun sonucunda transkripsiyon ve translasyonun normal yapılamayışı, nöronal metabolit fonksiyonların bozularak hücrenin ölümüne neden olmaktadır (15). ALS'da motor nöronların uzun süre normal fonksiyon görmesi, sonra aniden 1-2 yıl içinde tamamen harabolmasının nedeni halen tam olarak aydınlatılamamıştır, ancak DNA hipotezi bu sonuca bir açıklık getirebilir. DNA'yı tamir eden enzimlerden birisinin aktivitesi genetik veya viral kökenli olarak azalır, meydana gelen hasarlı DNA uzun bir sürede motor nöronlarda birikecektir. Bu durum kendisini, bir grup protein sentezinde yapısal ve enzimatik eksiklik olarak gösterecektir. DNA onarımının giderek azalma-

sıyla, hücre dejenere olacaktır.

ALS'un ayrıca Kurşun, Civa ve Manganez gibi ağır metal-
lerle zehirlenme sonucu ortaya çıkabileceği öne sürülmüştür.
Gerçektende, özellikle kurşun zehirlenmesinde görülen nöronal
değişiklikler ALS'dakileri yakından taklit eder ALS etyolo-
jisinde karbonhidrat metabolizması bozuklukları, Gastrointes-
tinal emilim bozuklukları, kan ve beyin-omurilik sıvısında ami-
noasit ve nörotransmitter anormallikleri de ortaya atılan di-
ğer hipotezler arasındadır (17,18).

Viral teori çok tutulmasına rağmen, hastalığı maymuna
(Şempaze) nakletmek ve bu yolla bir ajan belirtmek mümkün ol-
mamıştır (14). Ayrıca ALS spinal kord'un dan elde edilen nö-
ronlarla yapılan çalışmalarda belirli bir virus izole edile-
memiştir. Yine de bir virusun ön boynuz hücrelerini etkileye-
rek onların aktif yaşam sürelerini kısalttığı ve hastalığında
bu hücrelerin erken yaşlanmasına bağlı olarak ortaya çıktığı
düşünülebilir.

Bir kısım araştırmacılar ALS'un kronik gidişli bir
poliomyelit olduğunu öne sürerler. ALS ve poliomyelit ön kök-
ler, bulber ve motor korteks nöronlarında harabiyette gitti-
ğinden, bazı yazarlar bu iki hastalık arasında kozal bir iliş-
ki kurmuşlardır (19). ALS'lu hastalarda poliovirus hem sant-
ral sinir sisteminden, hem de diğer dokulardan izole edileme-
miştir. ALS'da ajan patojenin muhtemelen sonradan mutasyona
uğramış latent poliovirusu olması gerekir. Fakat bu varsayım-
da histolojik görünüm ve virolojik çalışmalarla doğrulanmamış-

tır (14). Poliovirus hastalığına karşı bağımsız olan insanlarda, Laboratuvar hayvanlarında ve memelilerin sinir kültürleri içinde inatçı enfeksiyonlara neden olabilmektedir (20). ALS ve Guam-Parkinson-Demens kompleksinde influenza virusuna karşı antikörlerin arttığı (9,21), ancak kabakulak virusuna karşı antikörlerde artış olmadığı saptanmıştır (9). Öte yandan virus'un otopsi yapılan hastalarda izole edilememesi ve etiketli çekirdek sondaları ile yapılan hibridizasyon deneyleri nöronlardaki virusları açığa çıkarmakta başarısız kalması sebep arama çalışmalarını yoğunlaştırmıştır (14).

ALS'lu hastalarda sıvısal cevapta, serum ve BOS immün kompleks konsantrasyonunda ve immün interferon miktarında kontrollere göre önemli bir fark bulunmamıştır. Buna karşılık immün yanıtlarda gecikme dikkati çekmekte ve bunun patogeneizde rol alabileceği düşünülmektedir (22).

Son yıllarda virolojik çalışmalarda kullanılan nukleik asit hibridizasyon yöntemiyle virus nukleik asitlerinin küçük parçalarını dahi değerlendirmek mümkün olmuştur. Yöntem 15 ALS'lu ve kontrol olgusuna uygulanmış, ancak poliovirus RNA'sına benzer reaksiyon elde edilememiştir (23). Virus araştırma sonuçları çeşitlilik göstermesine rağmen, ALS'lu hastalarda normal kişilere göre daha önceki yaşlarda paralişik polio geçirme insidansının yüksek oluşu (24), immunolojik yanıtlarda değişikliklerinin gözlenmesi (25), ön köklerde (26), ve kaslarda (27) virusa benzer partiküllerin ve Jejunal mukozada viral antijenlerin gösterilmesi (28), halen etyoloji-

de virusların rolünün kuvvetle muhtemel olduğunu vurgulamaktadır.

Diğer yandan ALS'un Guam'da Parkinsonizm-Demens kompleksiyle birlikte görüldüğü vakaların Beyin-Omurilik sıvısında homovanilik asit düzeyinin düşük bulunması (29), ayrıca yavaş virus hastalığı olarak bilinen Creutzfeldt-Jacop hastalığında da amyotrofi görülmesi, yavaş-virus varsayımını değişik açılardan destekleyen bulgulardır.

Bütün bunlara rağmen ALS'de yapılan virolojik çalışmalar, hastalık için kozal bir ilişkiye varmak açısından henüz yeterli değildir. Farklı yöntemlerle yapılan araştırmalar bazen birbiriyle çelişen sonuçlar vermektedir. ALS etyolojisinin henüz karanlık oluşu, Poliovirus'u ile yapılan çalışmaların şaşırtıcı sonuçları viral nedenler ile ilgili çok sayıda araştırmayı gerektirmektedir. Literatürde ALS'la Poliovirus ve kızamık virusu arasında çeşitli araştırmaların varlığına rağmen Herpes simpleks virus'u ile ilgili bir araştırmanın olmayışı dikkat çekicidir.

Yavaş virus enfeksiyonları sonucu ortaya çıkan santral sinir sistemi hastalıkları; kuluçka süreleri yıllarca süren, seyri önceden tahmin edilebilen, uzun süre devam ettikten sonra ölümlle sonuçlanan, doğal konakçı dışında da ortaya çıkabilen, konvansiyonel veya konvansiyonel olmayan viruslar tarafından oluşturulan bir hastalık grubudur (3,13). Yavaş virus enfeksiyonları başlıca 3 grupta incelenmektedir (2).

I- A Grubu: Bu grupta C tipi RNA viruslarının neden olduğu Visna ve Maedi hastalıklarının yer almaktadır.

II- B Grubu: Bu grupta Dört nadir subakut spongiform ansefalopati (Scrapie, Vizonların bulaşıcı Ansefalopatisi, Kuru, Creutzfeldt-Jakob) yer almaktadır.

III- C Grubu: Bu grupta normalde akut enfeksiyonlara neden olan, ancak burada yavaş virus enfeksiyonu sonucu olağandışı bir davranış gösteren etkenler yer almaktadır. Bunlar arasında Kızamık, Kızamıkçık, Herpes, İnfluenza ve Polio gibi viruslara bağlı olarak gelişen ve santral sinir sisteminde dejenerasyon ve demiyelinizasyon yapan hastalıklar sayılabilir.

Çalışmamızda santral sinir sistemi ile ilgili çeşitli etkilerinden dolayı poliovirus tip 1, Kızamık virusu ve Herpes simpleks virus tip 1'in ALS'la ile ilişkilerini araştırdık.

Kızamık virusu: 140 nm büyüklüğünde, sarmal yapıda, tek iplikli, RNA (-), zarflı, fiziksel ve kimyasal etkenlerde inaktif olabilen bir virustur (30). İnsan, maymun ve köpek böbreği hücrelerinde ve devam ettirilen insan hücre doku kültürlerinde üretilebilir. İnsan ve maymunlarda hastalık yapabilir. Kızamık antijeni enfekte hücreler içinde floresan antikor tekniği ile gösterilebilir. Antijenler, kompleman birleşmesi deneyi ile varlıkları gösterilmeden çok önce, doku kültürü hücreleri içinde belirirler, Kızamık virusu sadece maymun alyuvarlarını aglutine eder. Virus, döküntüler çıktıktan 24 saat sonra ya da çıkmadan 1-4 gün önce,

kan veya nazofarinks salgıları doku kültürlerine ekilerek izole edilebilir. İnsan amnion veya böbrek hücre kültürleri virus izolasyonu için uygundur. Serolojik yöntemlerden kompleman birleşmesi (KB) ve hemaglutinasyon önlenim (HÖ) deneyi kullanılır. Antikorlar akut hastalıktan yıllarca sonra yavaş yavaş azalır (31). Fakat SSPE, MS gibi bazı hastalıklarda bu antikorların normal kişilere göre arttığı gösterilmiştir (32). Yine bu hastalarda beyin dokusundan kızamık virüsüne benzer etkenler izole edilmiştir (33).

Herpes virus grubu: Bu grupta Herpes simpleks virusu tip 1 ve tip 2, Epstein-Barr (EB), Sitomegalovirus ve Varicello-zoster virusları yer almaktadır.

Herpes simpleks virusu, 100-120 nm büyüklükte, ikoza-hedral yapıda, zarflı, çift iplikli bir DNA virusudur. Eter, formaldehid ve nötral kırmızısı gibi fotodinamik olarak aktif boyalarla inaktive olurlar. Tavşan, kobay, fare, hamster ve sıçanlarla döletli yumurtanın koriyoallontoisinde ürer. Virusun gelişmesiyle birlikte birçok presipitasyon antijeni yapılır. Aynı zamanda küçük, çözünebilir kompleman bağlayan antijenler de yapılır. Herpes simpleks virusu tip 1 (HSV tip 1) ve Herpes simpleks virusu tip 2 (HSV tip 2) antejenik olarak birbirine benzer. Tip 2 virusları tip 1 viruslarına göre ısıya daha duyarlı, ilaçlara daha dirençlidir (31).

HSV tip 1, keratokonjunktivit, meningoensefalit, Herpes labialis, ekzeme herpetikum gibi klinik görünümeler meydana getirir. Tip 2 ise genital herpes ve neonatal herpesse neden olur. Tip 1 trigeminal ve otonomik, tip 2 ise sakral gangli-onlarda latent kalabilir.

Virus herpetik lezyonlar gösteren dokulardan izole edilebilir, boğaz salgısında, tükürük ve dışkıda da bulunabilir. Herpes virusu bazı sağlıklı kimselerden de izole edilebildiği için, hastalık esnasında bu virusun izole edilmesi, bunun kesin etyolojik etken olduğunu göstermez. Virus izolasyonu için doku kültürüne, döletli yumurtaların koriyoallantoisine ve tavşan korneasına ekim yapılabilir. Doku kültürlerinde tipik çekirdek içi inklüzyon cisimcikleri; koriyoallantoik zarda lekeler ve tavşan korneasında opaklık görülmesi etken olarak herpes virusunu düşündürür. Virusun kesin olarak tanımlanması, virusun özgül herpes antiserumu ile nötrlenmesine dayanır. Serolojik olarak nötralizasyon deneyleri ve kompleman birleşmesi deneyi kullanılabilir. İlk enfeksiyonun 4.-5. gününde nötralizan ve komplemanı birleştiren antikolar belirir ve enfeksiyonun 2.-3.haftasında en yüksek seviyeye ulaşır. Bu antikolar sık sık tekrarlayan enfeksiyonlar sonucu hayat boyu devam edebilirler. Tanı için çift serumda antikoların titresinde 4 kat artış gösterilmesi gerekir (31).

KB deneyi ile yapılan çalışmalarda Parkinsonlu hastalarda Herpes simpleks tip 1 virusuna karşı antikoların arttığı saptanmıştır (6). 1964 yılında Multipl sklerozlu bir hastanın ortabeyninden herpes virusa benzer bir etken izole edilmiştir (34). Herpes tip 1 ve tip 2 arasındaki farklar daha iyi gösterildiğinde, bu izole edilen virusun HSV tip 2'ye uyduğu bildirilmiştir (35). Bu konudaki diğer çalışmalar gelişli sonuçlar vermiştir (36,37).

Poliovirus: Poliovirus'lar picornavirus grubunun enterovirus alt grubundan olan kübik simetrili çıplak RNA viruslarıdır. Büyüklükleri 25-30 nm arasında olan virusun parental RNA'sı mRNA olarak görev görür. Polioviruslarının antijenik yönden farklı 3 serotipi tip 1, tip 2, ve tip 3 olarak adlandırılır. Poliovirus tipleri arasında serolojik çapraz reaksiyonun çeşitli derecelerde varlığına rağmen her 3 tip nötralizasyon testiyle birbirlerinden kolayca ayrılırlar (38).

Polioviruslar insan ve maymun orjinli primer ve devamlı hücre kültürlerinde kolaylıkla üretilebilirler. Viruslar bu hücre kültürlerinde üredikleri zaman stoplazmanın daralması, hücrenin yuvarlaklaşması ve çekirdeğin elektron dens bir hal almasıyla karakterize sitopatik etki şekli oluştururlar (39). Virusların titrasyonu yine insan ve maymun orjinli hücre kültürlerinde plak yöntemiyle yapılabilir (40).

Enfekte hücrelerde parental RNA'nın messenger RNA görevi ile polisistronik polipeptid sentez edilerek, daha kısa polipeptid'ler haline çevrilir. Oluşan 3 polipeptid VP1, VP2 ve VP3 olarak adlandırılır. Bu proteinlerden biri RNA polimeraz işlevi görürken diğer ikisi virusun yapısını oluşturur.

Poliovirus serotipleri bazı antijenik benzerliklere sahiptir, hatta poliovirus tip 1 ve tip 2 az derecede de olsa diğer enteroviruslarla da çapraz reaksiyon gösterirler (38). Poliovirus serotiplerinin kompleman birleşmesi antijenleri mevcuttur ve hücre kültürlerinde rahatlıkla hazırlanabilir.

Virus'un formalin veya ısıyla inaktivasyonu çözünen kompleman birleşmesi antijenini ortaya çıkartır. Bu antijen çapraz reaksiyon veren antijendir ve her 3 poliovirus tipine karşı oluşan antikorları saptamakta kullanılabilir. Poliovirus antijenlerinde 2 ayrı tipe özgü antijenler ve bunlara karşı oluşan antikorlar kompleman birleşmesi testiyle saptanabilir. Bunlar N (Native) ve H (Heated) antijenleri olarak adlandırılırlar (39).

Polio enfeksiyonu sırasında H antijenine karşı antikorlar, N antijenine karşı oluşan antikorlardan daha önce oluşurlar. Hastalığın akut döneminde serumda yalnızca H antijenine karşı antikor mevcuttur, ancak 1-2 hafta sonra hem N, hem H antikorları saptanabilir. Buna karşın iyileşme döneminde yalnız N antikorları mevcuttur. Serumda yüksek kompleman birleşmesi antikorlarının saptanması son zamanlarda poliovirus enfeksiyonun geçirildiğini kuvvetle destekler (41).

Polioviruslar fiziksel ve kimyasal etmenlere karşı diğer viruslara göre daha dayanıklıdır. 1 molar $MgCl_2$ poliovirusunun ısıya karşı daha dirençli olmasını sağlar. Bu nedenle attanue aşılıların hazırlanmasında poliovirusların bu özelliğinden yararlanılır.

Poliovirusların konağa giriş yolu diğer enteroviruslar gibi oral yoldur. Virusun konakta ilk üreme yeri lenfoid doku ve sindirim yoludur. Bu ilk üreme sonucunda virus kana karışarak viremi oluşturur ve bu yolla merkezi sinir sistemine gider. Hastalığın inkübasyon dönemi ortalama 7-14 gün arasındadır.

dır. Polioviruslar ile oluşan enfeksiyonların % 99'u asemptomatik gelişir, ancak % 1 oranında nörolojik hastalık görülebilir. Bunlardan en önemlisi paralitik poliomyelittir. Flask paralizi şeklinde ağırlı gelişen akut hastalık özellikle alt ekstremiteleri etkiler. Nadir de olsa solunum kaslarının etkilenmesi sonucunda solunum güçleşir ve Trakeostomi gerekebilir. Bulbar poliomyelit özellikle solunum ve yutma kasları etkilendiğinde ortaya çıkar. Paralizi her üç virus tipiyle oluşabildiği gibi özellikle tip 1 ile oluşur. Poliovirusların oluşturduğu diğer nörolojik hastalık Aseptik menenjit'tir. Aseptik menenjitte doku zedelenmesi azdır ve paralizi mevcut değildir. Hastalığın en önemli semptomları ateş, başağrısı ve meningial irritasyona bağlı ense sertliğidir. Beyin omurilik sıvısında protein ve lenfosit sayısı artar. Aseptik menenjitin prognozu iyidir ve genellikle hastalar tamamiyle iyileşir (38,39).

Paralitik poliomyelitin veya Aseptik menenjitin polioviruslara bağlı olarak geliştiğinin tanımlanabilmesi için laboratuvar testlerine gereksinim vardır. Virus izolasyonu ve serolojik testler tanıya yardımcı olan en önemli laboratuvar yöntemleridir. Hastalığın başlangıcında virus nazofarinksten, feçesten ve kandan izole edilebilir. Ancak hastalığın ilerlemiş devresinde virus izolasyonu için yalnızca feçes kullanılır. Beyin omurilik sıvısı poliovirus izolasyonu için iyi bir materyal değildir ve bugüne-kadar beyin omurilik sıvısından polioviruslar nadiren izole edilmişlerdir.

Hastalığın serolojik olarak tanısında nötralizasyon ve kompleman birleşme testi en sık olarak laboratuvarlarda kullanılan testlerdir. Hastalığın akut ve iyileşme dönemlerinde alınan çift serum örneğinde antikor artışının gösterilmesi kesin tanıya yardımcı olur.

Polioviruslar invitro olarak bazı antiviral ajanlara duyarlık göstermelerine rağmen bugün için invivo kullanılabilecek herhangi bir antiviral ilaç mevcut değildir. Polio aşılarının pratiğe geçirilmesinden sonra özellikle batılı ülkelerde hastalığın insidansında önemli derecede azalma saptanmıştır. Daha önceleri inaktif (salk) olarak kullanılan aşının yerini bir çok ülkelerde her üç poliovirus tipini içeren canlı attanue (sabin) aşısı almıştır. Trivalan sabin aşısı oral olarak kullanılmakta ve Ig A türü antikorların özellikle bağırsakta korunmada rol oynamasını sağlamaktadır.

Amyotrofik lateral skleroz yaşlanmakta olan sinir sistemine ait dejeneratif hastalıklar triadının (diğer ikisi Alzheimer ve Parkinson) bir bölümünü oluşturduğundan nörolojik araştırmalar için özel bir ilgi alanıdır (14). Bu hastalarda yapılan virolojik çalışmalar etyolojideki karanlık noktaları henüz aydınlatmamıştır ve farklı yöntemlerle yapılan araştırmalar bazen birbiriyle çelişen sonuçlar vermektedir. Bu açıdan ALS'da virusların rolü henüz kesinlik kazanmamakla birlikte oldukça karmaşık bir durum arz etmektedir. Diğer yandan Poliovirusu, kızamık virusu ve HSV tip 1

santral sinir sistemi patolojilerine sebep olabilmekte ve bazı santral sinir sistemi hastalıklarında yüksek titrasyon göstermektedir.

Çalışmamızda henüz etyolojisi karanlık olan ALS'da viral antikörlerin sıklığı ve etyopatogenezdeki rollerini araştırmak amacıyla hasta serumlarında poliovirus tip 1, HSV tip 1 ve kızamık virusuna karşı antikörlerin varlığı araştırılmıştır. Diğer nörolojik hastalıklar (Alzheimer, Multipl skleroz, Parkinson, Serebrovasculer hastalık) ve kontrol olgularla karşılaştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1983 ve 1986 yılları arasında yaşları 40 ile 60 arasında değişen ALS'lu 48 hasta, yaşları 30 ile 70 arasında değişen diğer nörolojik hastalıklar (Alzheimer, Parkinson, Multiple Skleroz, Serebrovasculer hastalıklar) nedeniyle takip edilen 20 hasta ve 50 normal kişiden kan alınarak serolojik testler için serumları ayrıldı. ALS'lu hastaların 28'i, diğer nörolojik hastaların 15'i ve kontrol grubu olgularınının 30'u erkekti. Hastadan 5 cc kan alınıp serolojik tüplere kondu ve 1200 rpm. de santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serumlar ağzı kapalı tüplere konarak -20°C de serolojik deneyler yapılana kadar saklandı. Bütün serumlar kompleman birleşmesi deneyinden önce 56°C 'da 30 dakika'da inaktive edilerek deneye alındılar.

Hücre kültürleri, viruslar ve kontrol serumlar

Poliomyelitis virusu tip 1 orijinal olarak NIH, Bethesda, Maryland, ABD'den sağlandı ve Hep-2 hücrelerinde üretildi. Kızamık virusu (Edmonston 84 F suşu) NIH, Bethesda, Maryland. ABD'den sağlandı ve Vero hücre kültürlerinde üretildi. HSV tip 1 (mayo suşu) ise yine NIH, Bethesda, Maryland, ABD'den temin edilerek Hep-2 hücre kültürlerinde üretildi.

Hep-2 (Human epidermoid carcinoma devamlı hücre kültürü) ve Vero (devamlı maymun böbrek hücre kültürü) hücreleri

kullanıldı. Hep-2 hücreleri orijinal olarak Flow Lab. Irvine. Iskoçya'dan temin edildi. Hücreler 5-6 gün ara ile pasaja tabii tutuldular.

Hücre kültürleri için MEM (minimal assential medium) vasatı, % 10 fötal daha serumu ile milimetre de 100 ünite penisilin, 100 mikrogram streptomisin ilavesiyle kullanıldı (42).

Hücreler 200 cc.lik hücre kültürü (Jena gloss) şişelerinde üretildi. Hücre kültürü vasatlarının PH'ları, gerek-tikçe % 7.8'lik NaHCO₃ ile nötral PH'ya ayarlandı.

Poliomyelitis virusu tip 1, Kızamık virusu ve HSV tip 1 normal ve immun kontrol serumları NIH, Bethesda, Maryland, ABD'den sağlandı.

Poliomyelitis virusu tip 1, kızamık virusu ve HSV tip 1
KB antijenlerinin hazarlanması

Poliomyelitis virusu tip 1 ve HSV tip 1 virusları Hep-2 hücrelerinde üretilerek, kızamık virusu ise vero hücre kültürlerinde üretilerek daha önce bildirilen standart yöntemlere göre antijenleri hazırlandı (43,44). Hazırlanan antijenlerin pozitif kontrol serumları "Chess Board" yöntemi kullanılarak titreleri mikroteknik yöntemiyle tayin edildi (44).

Deneylerde kullanılan solusyonlar

Veronal Buffer (VB): Bu solusyon içerdiği Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ iyonları nedeniyle kompleman birleşmesi deneyinde, komplemanın

yüksek serum sulandırımalarında bile tam olarak fikse edilmesini sağlamak amacıyla diluent olarak kullanıldı.

Hemolitik Serum: Koyun eritrositlerine karşı tavşandan elde edilen antikoyun eritrositleri antikorlarını içeren hemolitik serum, Refik Saydan Hıfzısıhha Enstitüsünden sağlandı.

Eritrositler: Kompleman birleşmesi deneyinde kullanılan koyun eritrositleri, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Bölümünden sağlandı. Alsever solüsyonunda saklanan koyun kanı, kullanılacağı zaman VB ile 200 rpm'de 10 dakika santrifüz edilerek 3 kez yıkandı ve üst sıvı tamamen berrak olduğunda paket eritrositler deneyde kullanıldı.

Hemolitik Sistem: Paket koyun eritrositlerinin VB içerisinde hazırlanan %4'lük süspansiyonu ile yine VB ile 1/100 oranında sulandırılmış hemolitik serumun eşit hacimlerde karıştırılmasıyla hazırlandı. 15 dakika 37°C de ya da 20 dakika oda ısısında bekletilerek duyarlılaştırıldıktan sonra deneyde kullanıldı.

Kompleman: Kompleman için erkek kobayın kalp kanı alınarak serumu ayrıldı. Küçük miktarlarda (0.2 ml) tüplere bölünerek -25°C de saklandı ve titre edildikten sonra uygun sulandırımında kullanıldı.

Mikroteknik Gereçleri

Kompleman titrasyonunda, kompleman birleşmesi deneyinde ve "CHESS BOARD" yöntemiyle kullanılan mikroteknik gereçleri şunlardır:

1- Mikrodiluter (Loop): 0.025 ml sıvı tutma yeteneğinde olan bir alettir.

2- Damlalık pipeti: Mikroteknik'te kullanılan ve 0.025 ml damla verme yeteneğinde olan özel pipetlerdir.

3- Test kağıtları (go-no-go): Loopları kontrol etmede kullanılan ve üzerinde bulunan daireler tam 0.025 ml sıvı emme yeteneğinde olan, özel emici kağıtlardır.

4- U tabanlı Pleytler: Tabanları U şeklinde (8x12) adet çukur içeren bu sistemde kullanılan polisteren yapısındaki özel pleytlerdir.

5- Test okuma aynası: Deneylerin değerlendirilmesinde kullanılan iç bükey (konkav) aynadır.

Kompleman titrasyonu :

Hemolitik aktivitenin ölçülmesine dayanan kompleman titrasyonu aşağıda anlatılan şekilde yapıldı.

1- U tabanlı mikropleyitin çalışılacak bütün çukurlarına 0.025 ml VB damlatıldı.

2- Test edilerek komplemandan loop ile 0.025 ml alınarak ilk çukura kondu ve seri dilüsyonu yapıldı (Kontrol hariç).

3- Bütün çukurlara tekrar 0.50 ml VB damlatıldı.

4- Daha sonra bütün çukurlara 0.025 ml hemolitik sistem damlatıldı.

5- Hemolitik sistemin kontrol çukuruna ise 0.075 ml VB ve 0.025 ml hemolitik sistem damlatıldı.

6- Mikropleyt 37°C de, 30 dakika karıştırmak suretiyle 1 saat bekletildi. Daha sonra +4°C ye kaldırılarak tam çökme sağlandıktan sonra sonuçlar değerlendirildi.

Değerlendirme

%50 hemoliz ve %50 çökmenin saptandığı kompleman sulandırımı 1 kompleman ünitesi olarak kabul edildi (Hemolitik Doz 50 = HD 50).

Esas kompleman birleşmesi deneyinde ise 4 ünit kompleman sulandırımı kullanıldı.

Kompleman Birleşmesi Deneyi (KB) (ESAS DENEY)

Bu deney; ALS, diğer nörolojik hastalıklar ve kontrol grubundan alınan serum örneklerinde KB standart yöntemlerine göre yapıldı (44,45).

Kullanılan materyaller:

- Veronal Buffer (ph:7.2)
- 4 ünite kompleman sulandırımı
- 2 ünite antijen
- İnaktive hasta ve kontrol serumlar
- Hemolitik sistem

Deneyin yapılışı:

- Test edilecek her serum için ayrılan bir sıra mikropleyt çukuruna 0.025 ml VB damlatıldı.

- Her hasta serumu örneğinden loop ile 0.025 ml alınarak ilk çukurlara kondu ve karıştırılarak diğer çukurlara seri dilüsyonları yapıldı.

- Serumların 1/2 sulandırımını içeren ilk çukurlara 0.025 ml VB, diğer sulandırım çukurlarına ise 0.025 ml antijen damlatıldı.

Böylece antijen içermeyen ilk çukurlar, hasta serumu kontrolü olarak değerlendirildi. Ayrıca antijen kontrol çukuru 0.025 ml VB ve 0.025 ml antijen konuldu.

- Kontroller dahil tüm çukurlara 4 ünite kompleman sulandırımından 0.025 ml damlatıldı. 4,2 ve 1 ünite kompleman içine 3 kontrol çukuru hazırlandı.

- 4 ünite kompleman kontrolü : 0.025 ml 4 ü. kompleman
+0.050 ml VB

- 2 ünite kompleman kontrolü: 0.025 VB + 0.025 ml 4 ü.
kompleman + 0.050 ml VB

- 1 ünite kompleman kontrolü: 0.025 ml VB + 2 ü.kompleman sulandırımı +
0.050 ml VB

- Mikropleyt karıştırıldıktan sonra +4°C de 1 gece bekletildi. Ertesi gün kontroller dahil tüm çukurlara 0.025 ml. hemolitik sistem damlatıldı. Hemolitik sistem kontrol çukuru ise 0.075 ml VB ve 0.025 ml hemolitik sistem içermekteydi.

Mikropleyt 37°C de 30 dakika karıştırılarak, 30 dakika karıştırılmadan toplam 1 saat inkübe edildikten sonra +4°C'ye kaldırılarak eritrositlerin çökmesi sağlandı ve sonuçlar değerlendirildi.

Değerlendirme

Antijen, antikor (hasta serumu) ve komplemanın 4 ve 2 ünite kontrollerinde tam hemoliz, hemolitik sistem kontrolünde tam çökme ve 1 ünite kompleman kontrolünde %50 çökme, %50 hemoliz sağlandığında değerlendirme doğru olarak gerçekleştirildi.

Özgül antikor içermesi dolayısıyla antijeni ve komplemanı tam olarak bağlayan ve hemoliz vermeyen test serumu sulandırılmaları pozitif olarak kabul edildi.

Hemoliz vermeyen en yüksek serum sulandırımı, o serumun kompleman birleşmesi antikor titresi olarak değerlendirildi.

Çalışmada istatistikî analiz ve önem kontrolleri Yates düzeltmeli Ki-kare ve Fisher'in kesin ki-kare testi kullanılarak yapıldı (46).

BULGULAR

Poliovirus tip 1, kızamık virusu ve HSV tip 1,e karşı antikorlar; ALS lu hastaların, diğer nörolojik hastaların ve kontrol grubu olguların serumlarında kompleman birleşmesi deneyi ile araştırılmış ve serumdaki KB antikorları 1/4 ve üzeri ile 1/16 ve üzeri olarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

ALS'lu hastalar, diğer nörolojik hastalar ve kontrol grubu olgularda serumda poliovirus tip 1 KB antikor titreleri Tablo I'de gösterilmiştir. Bu tabloya göre toplam nörolojik hastaların (ALS + diğer nörolojik hastalar) 1/4 ve üzerindeki antikor titreleri göz önüne alındığında kontrol grubuyla aradaki fark önemli bulunmuştur ($P < 0.01$). 1/16 ve üzerindeki titreler yönünden ise kontrol grubunda pozitif sonuç olmaması nedeniyle istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

Diğer nörolojik hastaların serumlarında kontrol grubuna nazaran 1/4 ve üzerindeki titre artışı önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$). Buna karşılık ALS'lu hastaların serumlarında kontrol grubuna nazaran 1/4 ve üzerindeki titre artışı önemli bulunmuştur ($P > 0.01$). Gerek ALS hastaların ve gerekse diğer nörolojik hastaların 1/16 ve üzerindeki titre artışının kontrol grubuyla karşılaştırması, 50 olguluk kontrol grubunda pozitif sonuç olmaması nedeniyle yapılmamıştır.

ALS,lu hastalar diğer nörolojik hastalarla karşılaştırıldığında ise gerek 1/4 ve üzerindeki KB antikorlarının artışı, gerekse 1/16 ve üzerindeki KB antikorlarının artışı önemli derecede yüksek bulunmuştur ($P < 0.01$).

TABLO I- AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZİS (ALS), DİĞER NÖROLOJİK HASTALIKLAR VE KONTROL GRUBU OLGULARDA SERUM'DA POLIOVİRUS TİP 1 ANTİKOR TİTRELERİ*

ANTİKOR TİTRESİ	< 1/4	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZİS (ALS) (n=48)	6 (12.50)	13 (27.08)	18 (37.50)	6 (12.50)	4 (8.33)	1 (02.08)
DİĞER NÖROLOJİK HASTALIKLAR (n=20)	3 (15.00)	12 (60.00)	3 (15.00)	2 (10.00)	-	-
KONTROL (n=50)	33 (66.00)	10 (20.00)	7 (14.00)	-	-	-

* PARANTEZ İÇİNDEKİ DEĞERLER %'LERİ GÖSTERMEKTEDİR.

TABLO II- AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZİS (ALS), DİĞER NÖROLOJİK HASTALIKLAR VE KONTROL GRUBU OLGULARDA POLİOVİRUS TİP 1'E KARŞI KB ANTİKORLARININ SEROPOZİTİFLİK ORANININ YAŞ GRUPLARINA GÖRE DAĞILIMI*

AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZİS			POLİO TİP 1
<u>YAŞ GRUPLARI (YIL)</u>	<u>TOPLAM SERUM SAYISI</u>		<u>ANTİKORLARI</u>
41-50	18		10 (55.55)
51-60	30		19 (63.33)

DİĞER NÖROLOJİK HASTALIKLAR

<u>YAŞ GRUPLARI (YIL)</u>	<u>TOPLAM SERUM SAYISI</u>	<u>POLİO TİP 1</u>
		<u>ANTİKORLARI</u>
31-40	2	1 (50.00)
41-50	3	1 (33.33)
51-60	6	1 (16.66)
61-70	9	3 (33.33)

KONTROL GRUBU

<u>YAŞ GRUPLARI (YIL)</u>	<u>TOPLAM SERUM SAYISI</u>	<u>POLİO TİP 1</u>
		<u>ANTİKORLARI</u>
6-10	7	- (00.00)
11-20	5	1 (20.00)
21-30	6	2 (33.33)
31-40	8	2 (25.00)
41-50	10	1 (10.00)
51-60	9	1 (11.11)
61-70h	5	- (00.00)

* PARANTEZ İÇİNDEKİ DEĞERLER %'LERİ GÖSTERMEKTEDİR.

Tablo II'de ALS'lu hastalar, diğer nörolojik hastalar ve kontrol grubu olgularda poliovirus Tip 1'e karşı KB antikörlerinin seropozitiflik oranının yaş gruplarına göre dağılımı incelenmiştir. Yaşları 40-60 arasında değişen ALS'lu hastalar, aynı yaş grubundaki diğer nörolojik hastalıklar ve kontrol grubuyla karşılaştırılmış, yaş grupları ile seropozitiflik oranı arasında istatistikî olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($P > 0.05$).

ALS'lu hastalar, diğer nörolojik hastalar ve kontrol grubu olguların polio öyküsü ve polio aşı öyküleri Tablo III de gösterilmiştir. Polio aşı öyküsü hastanın kendi ifadesinden kaynaklanmaktadır. Polio öyküsü yönünden ALS'lu hastalar diğer nörolojik hastalar ve kontrol grubu olgular arasındaki fark istatistikî olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.01$). Polio aşı öyküsü yönünden hastaların kendi ifadelerine başvurduğumuz için istatistiksel bir sonuç çıkartılmamıştır.

Tablo IV'de ALS'lu hastalar ve kontrol grubu olguların serumlarında kızamık virusu KB antikör titreleri gösterilmiştir. Bu tabloya göre ALS'lu hastaların serumlarında 1/4 ve üzerindeki antikör titreleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman aradaki fark önemsiz bulunmuştur ($p > 0.05$). 1/16 ve üzerindeki titreler yönünden ise pozitif sonuç olması nedeniyle karşılaştırma yapılmamıştır.

TABLO III- AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZİS (ALS), DİĞER NÖROLOJİK HASTALIKLAR VE KONTROL GRUBU OLGULARA POLİO ÖYKÜSÜ VE AŞI DURUMLARI*

<u>GRUP</u>	<u>SAYI</u>	<u>YAŞ (YIL) SINIRLARI</u>	<u>POLİO ÖYKÜSÜ</u>	<u>POLİO AŞI AŞISI</u>
AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZİS	48	41-59	23 (47.91)	0 (00.00)
DİĞER NÖROLOJİK HASTALIKLAR	20	31-70	2 (10.00)	11 (55.00)
KONTROL	50	(6-70)	0 (00.00)	35 (70.00)

* PARANTEZ İÇİNDEKİ DEĞERLER %'LERİ GÖSTERMEKTEDİR.

TABLO IV- AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZİS (ALS) VE KONTROL GRUBU
OLGULARDA KIZAMIK VİRUSU KB ANTİKOR TİTRELERİ*

ANTİKOR TİTRESİ	< 1/4	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZİS (n=15)	8 (53.33)	4 (26.67)	3 (20.00)	-	-	-
KONTROL (n=50)	29 (58.00)	13 (26.67)	8 (16.00)	-	-	-

* PARANTEZ İÇİNDEKİ DEĞERLER %'LERİ GÖSTERMEKTEDİR.

Tablo V'de ALS'lu hastalar ve kontrol grubu olgularının serumlarında HSV tip 1 KB antikor titreleri gösterilmiştir. Bu tabloya göre ALS'lu hastaların serumlarında 1/4 ve üzerindeki titre artışı kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$). 1/16 ve üzerindeki titre artışı yönünden kontrol grubunda pozitif sonuç olmaması nedeniyle karşılaştırma yapılmamıştır.

ALS'lu hastaların serumlarında poliovirus tip 1, kızamık virusu ve HSV tip 1'e karşı KB antikor titreleri Tablo VI'da karşılaştırılmıştır. KB antikor titreleri poliovirus tip 1 için 48 olguda, kızamık virusu için 15 olguda ve HSV tip 1 için 18 olguda araştırılmıştır. Poliovirus tip 1'e karşı 1/4 ve üzerindeki antikor titresi % 87.5 olguda saptanırken, kızamık virusuna karşı % 46.6, HSV tip 1'e karşı % 66.6 olguda saptanmıştır. Bu oranlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığı zaman poliovirus tip 1 KB antikorları, kızamık KB antikorlarına göre çok önemli derecede artış gösterirken ($p < 0.001$), HSV tip 1 KB antikorları ile karşılaştırıldığında fark önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). 1/16 ve üzerindeki titre artışı poliovirus tip 1'e karşı % 22.9 olguda saptanmış, kızamık virusuna karşı pozitif sonuç bulunamamış, buna karşılık HSV tip 1'e karşı % 27.7 oranında artış olmuştur. Poliovirus tip 1'e karşı artış kızamık virusu ile karşılaştırılmamış, buna karşılık HSV tip 1 ile karşılaştırıldığı zaman aradaki fark önemsiz bulunmuştur ($p < 0.05$).

TABLO V- AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZİS (ALS) VE KONTROL GRUBU OLGULARDA HSV TİP 1 KB ANTİKOR TİTRELERİ*

ANTİKOR TİTRESİ	<1/4	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZİS (n=18)	6 (33.33)	4 (22.22)	3 (16.67)	2 (11.11)	2 (11.11)	1 (5.56)
KONTROL (n=50)	3 (66.00)	10 (20.00)	7 (14.00)	-	-	-

* PARANTEZ İÇİNDEKİ DEĞERLER %'LERİ GÖSTERMEKTEDİR,

TABLO VI- AMYOTROFİK LATERAL SKLEROZİS'LU (ALS) HASTA SERUMLARINDA POLİOVİRUS TİP 1, KIZAMIK VİRUS VE HERPES SİMPLİKS VİRUS TİP 1 KB ANTİKOR TİTRELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI*

ANTİKOR TİTRESİ	< 1/4	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
POLİOVİRUS TİP 1 (n=48)	6 (12.50)	13 (27.08)	18 (37.50)	6 (12.50)	4 (8.33)	1 (2.08)
KIZAMIK VİRUS	8 (53.33)	4 (26.67)	3 (20.00)	-	-	-
HERPES SİMPLİKS VİRUS TİP 1 (n=18)	6 (33.33)	4 (22.22)	3 (16.67)	2 (11.11)	2 (11.11)	1 (5.56)

* PARANTEZ İÇİNDEKİ DEĞERLER %'LERİ GÖSTERMEKTEDİR.

TARTIŞMA

ALS gerek etyopatogenez, gerek tedavi konusunda nöroloji araştırmaları için özel bir ilgi alanı oluşturmaktadır. Alzheimer ve Parkinson ile birlikte yaşlanmakta olan sinir sistemine ait dejeneratif hastalıklardan meydana gelen triadı oluşturur. Bu üç hastalık özel nöron dizilerinin seçilerek hasara uğramasıyla, karakterize olup etkilenen sinir hücrelerinde morfolojik değişiklikler yer almakta ancak iltihabi ve damarsal bir anormallik bulunmamaktadır (14). Etkilenen sinir hücreleri en sonunda ortadan kalkmakta ve skar dokusu, gliosis bunların yerine geçmektedir. Her üç hastalıkta olguların çoğunda idiopatiktir. Genellikle her bir hastalık tek başına görülmekte, ancak nadir olarak kombinasyonlara rastlanmaktadır.

ALS'un sebebini arama çalışmaları yıllardır verimli olmamaktadır. Etiyoloji'de endojen ve eksojen toksinler, nöronların biyokimyasal bozuklukları, genetik faktörler, immunolojik ve endokrin faktörler yavaş virus enfeksiyonları ve motor nöronlarda DNA anormalliği üzerinde durulmaktadır. 10 yıldan fazla bir süreden beri dikkatler birkaç nedenle ilgili olarak muhtemel viral sebebe yönelmiştir. D.Carleton Gajdusek'e bazı kronik nörolojik hastalıkların etiolojisiyle ilgili çalışmalarından dolayı Nobel Tıp Ödülü verilmiştir. Gajdusek bu çalışmalarında hastalığın (ALS) kalıtsal olabileceğini belirtiyor, buna neden olarak da inatçı enfeksiyonları

(belki de bir virus) gösteriyordu (14). Bir yavaş virus enfeksiyonu olan Creutzfeldt-Jakob hastalığı amyotrofi-parezi-fasikülasyon gibi ALS'un bazı bulgularıyla karakterizedir.

ALS'lu hastalarda kızamık virusuna, Adena ve koksaki virüslere karşı antikorlar araştırılmış, sonuçta diğer nörolojik hastalıklar ve kontrollere oranla önemli bir fark bulunmamıştır (47). Bununla birlikte insan olmayan diğer canlılara ALS'u geçirme girişimleri sonuçsuz kalmıştır.

Bazı yazarlar ALS ve poliomyelit arasında yakın ilişki kurmuşlardır. Buna karşın ALS'lu hastalarda poliovirus hem santral sinir sisteminde hem de diğer dokularda izole edilememiştir (14,48). Poliovirus, hastalığa karşı bağımsız olan insanlarda ve laboratuvar hayvanlarında inatçı enfeksiyonlara neden olabilmektedir. ALS'da ve Guam tipi ALS'da influenza virusuna karşı antikorların arttığı (9,21) ancak kabakulak virusuna karşı antikorlarda artış olmadığı saptanmıştır. Otopsi çalışmalarında spinal kord'da virus benzeri partiküller görülmesi, doku kültür çalışmalarında virusun sitopatik etkilerinin izlenmesi ALS'un yavaş virus enfeksiyonu sonucu geliştiği teorisini desteklemektedir. Ancak virusun primer enfeksiyondan sonra konakta hangi mekanizma ile latent kaldığı henüz açıklık kazanmamıştır, ayrıca etiketli çekirdek sondaları ile yapılan hibridizasyon deneyleri sinirlerdeki virüsleri açığa çıkarmakta başarısız kalmaktadır (14).

Önemli olan diğer bir bulgu ALS'lu hastalarda kontrol-

lere oranla poliomyelit geçirme oranının daha sık olduğudur. Bu da immun sistemin gelişmekte olduğu devrede poliovirusu için latensiye yatkınlığı yansıtabilir. Hastalığın Primer enfeksiyondan yıllar sonra nörolojik semptomlarla ortaya çıkması virusun replikasyonunun yavaş ilerlemesini vurgulamaktadır. Viral RNA, nukleokapsidler ve diğer genetik ürünler yavaş yavaş birikip, viral genetik bilgi hücreden hücreye dendritik uzantılarla yayılmaktadır. Ancak daha öncede belirttiğimiz gibi virusun hangi mekanizma ile latent kaldığı iyi bilinmemektedir.

Polioviruslar; picornovirusların enterovirus alt grubundan kübik simetrili çıplak RNA viruslarıdır. Poliovirusun bir hücreyi enfekte etmesi, bu hücrede bulunan özgül reseptörlere bağlanması ile başlar. Bir hücrenin böyle bir olaya maruz kalabilmesi için bu özgül reseptörü içermesi ve dolayısıyla poliovirusu enfeksiyonuna duyarlı olması gerekir. Bu özellik insanlarda 19. kromozomda bulunan genetik bilginin kontrolü altındadır (30). Enfekte hücreye giren bir poliovirusunun RNA'sı kendi kendine mRNA görevi yüklenir. Enfeksiyonun başlangıcında hücre RNA'larına bağlı bulunan hücre polizomları yıkılırlar, fakat sonradan viral RNA idaresinde yeniden yapılırlar. Viral protein polizomlarda sentetize edilir ve böylece virus üremesi hücrenin nekrozuna kadar devam eder. Yani evvela hücrenin RNA ve protein sentezi inhibe edilmekte, sonra viral RNA ve protein senteziyle yeni virus partikülleri meydana gelmektedir. Bu olay virusun hücreye girmesini izleyen iki saat zarfında olmaktadır. Poliovirus

enfeksiyonunun akut döneminde serolojik testlerle H antijeni-ne karşı antikolar saptanır. Buna karşılık iyileşme döneminde yalnız N antikoları mevcuttur ve serolojik testlerde N antikoları tespit edilir. Bizim çalışmamızda kompleman birleşmesi reaksiyonu sonucu saptadığımız titreler bu N antikolarına aittir.

Poliovirusların antijenik yönden farklı üç serotipi (tip 1, tip 2-ve tip 3) arasına serolojik çapraz reaksiyon mevcuttur (38). Biz çalışmamızda yalnızca Poliovirus tip 1'e karşı antikor titrelerini saptadık. Bunun nedeni her üç serotip arasında çapraz reaksiyon olması; enfeksiyonun sonucu ortaya çıkan paralizinin ve asemptomatik enfeksiyonların her üç virus tipiyle oluşabilmesine karşın özellikle poliovirus tip 1 sonucu ortaya çıkmasıdır. Polioviruslar ile oluşan enfeksiyonların %99'u asemptomatik olarak gelişir, ancak %1 inde nörolojik hastalık oluşur.

Çalışmamızda ALS'lu hastaların serumlarında diğer nörolojik hastalıklara ve kontrol grubu olgulara göre poliovirus tip 1 antikoları önemli derecede artış göstermiştir. Bu bulgular viral bir etyolojiyi desteklemekle beraber birkaç şekilde yorumlanabilir.

1- Bu bulgumuz polio tip 1 virusunun ALS'la etyopatogenetik olarak ilişkili olduğunu gösterebilir. Nitekim 1980'den itibaren poliovirusunun ön kök, bulbus ve motor korteks nöronlarında kalabildiğine dair araştırmalar dikkati çekmektedir.

2- ALS'da saptanan antikor cevabındaki artış hastalığın etyolojisi ile direkt ilişkili olmadığı halde, ALS'da rolü olan bir faktör sonucunda görülebilir. Bu tür olaylar konakçının immun cevabının ayarlanması ile ilişkili olabileceği gibi konakçının belli bir hastalığa karşı olan eğilimi ile yani HLA doku gurupları ile de bağlantılı olabilir.

ALS'lu hastalarda çeşitli viral antikorlar aranmış olmasına karşılık Herpes viruslarla ilgili bir araştırmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu hastalarda viral çalışmalar daha çok enteroviruslar üzerine yoğunlaşmıştır. Bizim çalışmamızda ALS'lu hastaların serumlarında kontrol grubuna göre gerek 1/4 ve üzerinde, gerekse 1/16 ve üzerindeki HSV tip 1 KB antikorlarında önemli derecede artış bulunmuştur. Bu konu ALS etyopatogenezi açısından yeni bir görüştür.

HSV zarflı, çift iplikli bir DNA virusudur. 1975'lerden itibaren HSV tip 1'in trigeminal ganglion sinir hücrelerinde latent kalma yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Latent virusun hangi mekanizma ile nörolojik hastalık oluşturabileceği kesinlik kazanmamıştır. Herpes virusu-ALS arasındaki bu şaşırtıcı ilişki konusunda yorum yapabilmek için daha fazla serum örneğiyle çalışmaya gereksinim vardır.

ALS etyopatogenezinde latent bir virus olan kızamık virusunun rol oynayıp oynamadığını incelemek amacıyla serum örneklerinde KB antikor titreleri ölçülmüş ve kontrollere göre önemli derecede artmadığı saptanmıştır. Zarflı bir DNA virusu

olan kızamık virusunun oluşabilmesi için hücreden tomurcuklanarak olgunlaşması gerekir. Bu nedenle hücre membranına bazı viral antijenlerin yerleştirilmesi söz konusudur. Bizim çalışmamızın sonuçları kızamık virusunun ALS'lu hastaların etyopatogenezinde önemli olmadığını işaret etmektedir. Ancak kızamık virusunun multipl skleroz ve SSPE etyopatogenezindeki rolü literatürdeki çalışmalar (32) ile karşılaştırıldığı zaman bu konuda da tam bir yorum yapmak zorlaşmaktadır.

ALS'lu hastalarda viral antikolar üzerine KB yöntemiyle yaptığımız çalışmamızda poliovirus tip 1 KB antikolarının önemli derecede artmış olması literatürle uyumluluk göstermesine rağmen, hala bu hastalıkta kesin bir etyolojik sonuca varmak mümkün olmamaktadır. Bunun nedenleri arasında hastalığın nadir görülmesi, mortalite oranının yüksek olması ve konakta bu hastalıklara yatkınlık yaratan genetik faktörlerin tam olarak saptanamaması sayılabilir. Poliovirusunun yanısıra HSV tip 1 antikolarının da önemli derecede artmış olması bu konuya çalışmamızla birlikte yeni bir ufuk getirmiştir. Latent bir virus olan kızamık virusuna karşı antikor titrasyonlarında kontrollere göre önemli bir artış bulunmamıştır.

ALS gibi etyolojisi hala karanlık olan hastalıklarda; daha fazla hasta sayısı ve çok yönlü çalışmalara gerek vardır. Yakın bir gelecekte etyolojinin karanlık noktalarının mevcut bilgilerimizin ışığında açıklığa kavuşacağını ümit etmekteyiz.

ÖZET

1982-1986 yılları arasında Gazi Tıp ve İstanbul Tıp Fakülteleri Nöroloji kliniklerine başvuran ALS tanısı konmuş hastalardan alınan serum örneklerinde virusların etyopatogenetik rolü yönünden serolojik çalışmalar (KB) yapılmıştır.

Çalışmamızda ALS'lu hastalarda, diğer nörolojik hastalar ve kontrol grubuna göre poliovirüs Tip 1'e karşı artan titrelerde antikorlar saptanmıştır. Bu sonuçlar literatürdeki mevcut bilgilerle uyumludur. ALS'lu hastalarda Herpes simpleks virusu tip 1 antikorlarında da önemli derecede artma bulunmuştur. Bu konuda literatürde bir araştırmaya rastlanmamıştır. Kızamık virusuna karşı antikor titrelerinde kontrollere göre artma olmamıştır. Bu bulgular kızamık virusunun etyopatogeneze rolü olmadığı sonucunu vermektedir.

Poliovirüs tip 1 ve HSV tip 1 antikorlarının diğer nörolojik hastalıklara ve kontrol grubuna göre önemli derecede artmış olması, bu virusların ALS etyopatogenezinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bütün bunlara karşın çalışmada kullanılan serum adedinin az oluşu nedeniyle tam bir etyolojik sonuca varmak zorlaşmaktadır.

SUMMARY

Between the years of 1982-1986, serological studies were made on etyopatogenes viruse in the serom samples that were taken from the patients who applied the Neurology Clinics of Gazi and Istanbul Faculty of Medicine with ALS diagnosis. In this study, anticores with increasing titers against polioviruses type 1 were determined in the patients with ALS with respect to other neurological patients and the control group. These results are in accordance with the literature. In the patients with ALS increase of great importance were found in anticores of Herpes simplex viruses type 1. On this subject, no research is seen in the literature, There is no increase in anticore titers against chickenpox virus according to the control group. These results show that, chickenpox viruses are not effective on etyopatogenez.

Since there is an important increase in anticores of poliovirus type 1 and HSV 1 according to the ather neurological illnesses an the control group, It can be considered that these viruses might be effective on ALS etyopatogenezis. Finally, the inefficiency of the serum samples that were examined in the study makes it difficult to conchude in a real ethiological manner.

KAYNAKLAR

- 1- Gajdusek, D.C.: Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 197:943-960, 1977
- 2- Sutton, R.N.P.: Slow viruses and chronic disease of the central nervous system. *Post.grad Med.j.* 55:143-149, 1979
- 3- Katz, M., Koprowski, H.: Slow virus encephalopathies. *Scientific Approaches to clinical Neurology: Goldensohn, E.s., Appel, S.H. (eds.) Philadelphia, Lea and Febiger, Cilt 1, Bölüm 27, 1977, s.407-414*
- 4- Beck, E., Daniel, P.M., Matthews, W.B., ve ark.: Creutzfeldt-Jacob disease: the neuropathology of a transmission experiment. *Brain* 92: 699, 1969.
- 5- Dubois-Daleq, M.: Pathology of measles virus infection of the nervous system: Comparison with multiple sclerosis. *Int.Rev. Exp. Pathol.* 119:121-130, 1979.
- 6- Marttila, R.J., Rinne, N.K.: Herpes virus antibodies in patients with Parkinson's disease. *J.Neurol.sci.* 35:375, 1978
- 7- Mehta, P.D., Kane, A., Thormen, H.: Quantitation of measles-virus-specific immunoglobulins in serum, CSF and brain extracts from patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J.Immunol.* 118:2254-2261, 1977.
- 8- Padgett, B.L., Walker, D.L., Zurkein, G.M. ve ark.: Cultivation of papova like virus from human brain with progressive multifocal lenkoencephalopatı. *Lancet* I:1257-1260, 1971.
- 9- Lehrich, J., Oger, J., Arnason, B.: Neutralizing antibodies to poliovirus and mumps virus in amyotrophic lateral sclerosis. *J.Neurol.Sci.* 23:537, 1974.
- 10- Bartfeld, H., Dham, C., Donnenfeld, H. ve ark.: Immunological profile of amyotrophic lateral sclerosis patients and their cell-mediated immune responses to viral and CNS antigens. *Clin.Exp.Immunol.* 48:137-147, 1982

- 11- Agnorsdottir, G.: Subacute sclerosing panencephalitis. Recent Advances in Clinical Virology: Waterson, A.P. (ed.). Edinburgh, Churchill and Livingstone, 1977, s. 21-49
- 12- Cremer, N.E., Oshiro, L.S., Weil, M.L. ve ark.: Isolation of rubella virus from brain in chronic progressive panencephalitis. J.Gen.Virol. 28: 143-153, 1975.
- 13- Meulen, V.ter. Hall, W.W.: Slow virus infections of the nervous system: Virological, immunological and pathogenetic considerations. J.Gen.Virol. 41: 1-25, 1978.
- 14- Rowland, Lewis.P.: Looking for the cause of Amyotrophic lateral sclerosis. The New England Journal of medicine, 311: 379-381, 1984.
- 15- Bradley, W.6., Krosin, I.: A new hypothesis of the etiology of amyotrophic lateral sclerosis, the DNA hypothesis. Arch. Neural. 39: 677-680, 1982.
- 16- Allinquant, B., Malfoy, B., Schuller, E., Leng, M.: Presence of λ -DNA specific antibodies in crohn's disease, polyradiculo neuritis and amyotrophic lateral sclerosis. Clin. Exp. Immunol.: 29-36, 1984.
- 17- Adams, Raymond.D., Victor, M.: Principles of Neurology. 889-892, 872-873, 1985.
- 18- Gilroy, J., Meyer, J.S.: Medical Neurology. 209-213, 1979.
- 19- Campbell, A., Williams, E., Pearce, J.: Late motor neuron degeneration following poliomyelitis J.Neurology. 19: 1101, 1969.
- 20- Kurent, J., Brooks, B., Madden, P. ve ark.: CSF viral antibodies evolution in ALS and late post poliomyelitis progressive muscular atrophy. Arch.Neural. 36: 269, 1979.
- 21- Elizan, T.S., Hirono, A. ve ark.: Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonism-dementia complex of Guam. Arch.Neurol. 14: 356, 1968.
- 22- Bartfeld H., Dham, C., Donnenfeld, H. ve ark.: Immunological profile of amyotrophic lateral sclerosis patients and their cell-mediated immune responses to viral and CNS antigens. Clin. Exp. Immunol. 48: 137-147, 1982.

- 23- Kohne, D.E., Gibbs C.J., White L. ve ark.: Virus detection by nucleic acid hybridization: Examination of normal and ALS tissues for the presence of poliovirus. *J. Gen. virol.* 56: 223-233, 1981.
- 24- Poskanzer, D., Carter, H., Kaplan, G.: The frequency of preceding poliomyelitis in amyotrophic lateral sclerosis. *Motor Neuron Diseases: Research on Amyotrophic lateral sclerosis and Related Disorders: Norris, F., Kurland, L. (eds) New York, Grune and strotton: 286-289, 1969.*
- 25- Kott, E., Livini, E., Zamir, R. ve ark.: Celle mediated Immunit to polio and HLA antigens in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 29: 1040, 1979.
- 26- Pena, C.E.: Virus-like particles in amyotrophic lateral sclerosis: Electron microscopical study of a case *Ann. Neurol.* 1: 290-297, 1977.
- 27- Oshira, L.S., Cremer, N.E.: Virus-like Particles in muscle from a patient with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology (Minne ap.)* 26: 57-60, 1976.
- 28- Dertschuk, L.P., Cook, A.W.: Jejunal immunopathology in amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis. Identification of viral antigens by immunofluorescence. *Lancet* 1: 1119-1123, 1977.
- 29- Hoffman, P.M., Robbins, D.S., Nolte, M.I., Gibbs, C.J. Jr, Gajdusek, D.C.: Cellular Immunity in Guamanians with amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism dementia. *N. Engl. J. Med.* 680-685, 1978.
- 30- Serter, Fethi. Serter, Demir. *Klinik Viroloji* 166-182, 1980
- 31- Akman, M., Gülmezoğlu, E.: *Tıbbi Mikrobiyoloji.* 3. Bakım. Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-15- 678-682, 704-712, 752-759, 585-591. 1980.
- 32- Ammitzbou, T., Clousen, J., Fog, T.: Oligoclonal IgG and measles antibody in CSF of Multiple sclerosis patients. *Acta Neurol. Scand.* 56: 153-158, 1977.

- 33- Meulen, V. ter, Katz, M., Kochell, Y.M. ve ark: Subacute sclerosing Panencephalitis: In vitro characterization of viruses isolated from brain cells in culture. J. Infect. Dis. 126:11-17, 1972.
- 34- Gudnattir, M., Helgadottir, H., Bjarnosan, O. ve ark: Virus isolated from the brain of a patient with multiple sclerosis. Exp. Neural. 9: 85-95, 1964.
- 35- Nahmies, A.J., Dowdle, W.R.: Antigenic and biologic differences in herpes virus hominis. Progr. Med. Virol. 10:110-159, 1968.
- 36- Bray, P.F., Bloomer, L.C., Salmon, V.C. ve ark: Epstein-Barr virus infection and antibody synthesis in patients with multiple sclerosis. Arch. Neural. 40:406-408, 1983.
- 37- Norby, E.: Viral antibodies in multiple sclerosis. Progr. Med. Virol. 24: 1-39, 1978.
- 38- Melnick, Joseph. L. Virology: Enteroviruses, Polioviruses, Coxsackie viruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses edited by B.N. Fields et al Dower Press. New York. 739-749, 1985.
- 39- Dows, Bernard D., Dulbecco, Renato Eisen, Herman N., Ginsberg, Harold: Picornoviruses (microbiology) 11095-1109, 1980.
- 40- Timburn, Morog. C.: Notes on medical virology. 49-62, 1986.
- 41- Jawetz, E. Melnick, J.L., Adelberg, E.A.: Review of medical microbiology: Picornavirus Family (Enterovirus-Rhinovirus Groups) 386-390, 1982.
- 42- Grit, N.R., Bell, E.J.: Diagnostic methods in clinical virology_ 2 rd. ed., Oxford, Blackwell sci. Pub, 1979
- 43- Lennette, Schmidt: Diagnostic procedures for viral, Rickettsial and chlamydial infections, 1984.
- 44- Grits, N.R., Bell E.J., Follett, E.A.C. Urguhart G.E.D., en. a) Cell culture. pp.60-80, b) Complement fixation test. pp.95-116, c) Reagents and methods pp.215-223, In: Diagnostic methods in clinical Virology, Black Well Scientific Publication, 1979.

- 45- Joseph, J.M., Viral and Rickettsial diagnostic procedures,
In: Frankel, S., Reitman, S., Sonnenwirth, A.C., eds. Grand
Wohl's Clinical Laboratory methods and Diagnosis, pp.
1595-1647, C.V. Mosby Company-1970.
- 46- Smblođlu, K.: Sağlık Bilimlerinde Araştırma Teknikleri
ve İstatistik-Ankara Matis Yayınları, 1978.
- 47- Koscsak, R.J., Carp, R., Vilcek, J.T., Donnenfeld, I.,
Barfeld, H.: Virological studies in Amyotrophic lateral
sclerosis. Muscle Nerve 93-101, 1982.
- 48- Kohne, D.E., Gibbs, C.J., White, L., Tracy, S.M., Meinke, W.
Smith, R.A. Virus detection by nucleic acid hybridiza-
tion: examination of normal and ALS tissues for pre-
sence of poliovirus. J.Gen.Virol 223-233, 1981.