

**BACİLLUS ANTHRACİS'İN PROTEOLİTİK OLMAYAN, AVİRULAN,
KAPSÜLSÜZ MUTANT SUŞU (29/1a) İLE HAZIRLANMIŞ SAPONİNLİ
VE ALUMİNİUM HİDROKSİTLİ AŞILARIN DAYANMA MÜDDETLERİ
VE BAĞIŞIKLIK SÜRELERİNİN TAYİNİ (*)**

Dr. M. Nabi E M R E (**)

G İ R İ Ő

Değişik memleketlerde istihsal edilen anthrax aşılarının kalite-leri arasında oldukça farklar vardır. Genellikle hazırlanan aşılardan çoğu hayvanlarda 6 - 12 ay kadar süren yüksek seviyede bağışıklık verirken bazı aşılardan bağışıklık verme süreleri oldukça kısadır. 30 yıldan beri virulan suşlardan ayrılan kapsülsüz attenué suşlarla hazırlanan aşılardan kapsüllü Pasteur suşları ile hazırlanan aşılardan yerini almıştır. Bu kapsülsüz suşlar yüksek bağışıklık kudreti ve kolayca sporlanması gibi avantajlara sahiptir.

Sterne (21), Sterne ve Robinson (22) avirulan olarak vasıflandırdıkları kapsülsüz attenué suşla hazırladıkları aşının tatbiki ile sığır ve koyunlarda yüksek seviyede anthrax'a karşı bağışıklık elde edildiğini bildirmişlerdir. Sterne ve arkadaşları (23) bu suşla hazırlanan aşıya saponin ilâve edilmek suretiyle bağışıklık süresinin 6 - 12 ay kadar uzatılabileceğini yaptıkları denemelerle göstermişlerdir. Sterne (24) B. anthracis'in avirulan kapsülsüz (34 F₂) suşu ile hazırlanan bu aşının koyun, keçi ve sığırlara tatbikinden en çok bir hafta sonra bağışıklığın başlayacağını ve 10 - 14 üncü günlerde bağışıklık nisbetinin

(*) Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumunun VHAG - 86 No.lu : Projesine göre ve Kurumun desteği ile yapılmıştır.

(**) Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde Lab. Şefi.

zirveye ulaşmasıyla bir yıl kadar devam edeceğini, yalnız tek tırnaklı hayvanlarda tam bir bağışıklık elde edebilmek için aşılardan sonra 4-6 haftanın geçmesi lâzım geldiğini bildirmiştir, Spears ve Davidson (20) İngiltere'de Sterne suşuyla hazırlanan aşılardan çift tırnaklı ve tek tırnaklı bütün hayvan nevrilerinde kullanılabileceğini ve bir yıl süreli bağışıklık vereceğini bildirmişlerdir.

Yurdumuzda avirulan kapsülsüz 34F₂ suşuyla Sterne metoduna göre anthrax aşısı istihsaline 1953 yılında başlanılmış ve tatbikata konulmuştur. Bu aşı 1954 yılında modifiye sığırlar için dozda enaz 10 milyon, koyun ve keçiler içinde dozda enaz 5 milyon spor ihtiva edecek şekilde ayarlanmıştır. Koyunlar için dozda 5 milyon sporla bir yıl bağışıklık elde edilebileceğini Avcıl ve Emre (3) yaptıkları denemelerle ortaya koymuşlardır. Milyonlarca hayvan aşılanmasına rağmen yılda bir tatbik edilen bu aşının bağışıklık vermediği veya aşılı yerlerde hastalık çıktığına dair hiç bir şikâyet gelmemiştir. Bornova Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde (2) yapılan çalışmalarda Max - Sterne anthrax aşısıyla aşılanan koyunların bir yıl bağışıklık vermekte oldukları, epruvasyonlardan sonra kontrollerin ölmesi ve aşıların hayatta kalması neticesi ortaya konulmuştur. Bağışıklık yönünden çok memnuniyet verici neticeler vermesine rağmen bu aşının tatbikatından sonra bazı koyun ve keçilerde ödemlere sebebiyet vermesi ve aynı zamanda istihsalinde pahalıya mal olması sebebiyle daha emin ve ekonomik bir aşı elde etmek gayesi ile Emre ve Durukan tarafından (4) Proteolitik olmayan mutant suşlar izole edilmiştir. İzole edilen proteolitik olmayan, avirulan, kapsülsüz mutant (29/1a) suşla hazırlanan saponinli ve aluminium hidroksitli aşılardan Sterne aşısına nazaran daha emin ve ekonomik oldukları tesbit edilmiştir.

Van - Ness ve arkadaşları (28) Sterne aşısı ile aşılanan hayvanlarda 8 gün sonra kuvvetli bir bağışıklığın husule geldiğini bildirmişlerse de Lindley (15) Sterne aşısından süre yönünden memnuniyet verici neticeler alınmasına rağmen bazı hayvanların aşılardan 21 gün sonra dahi anthrax'tan öldüğünü iddia etmektedir.

Sokol (19) B. anthracis'in kapsülsüz variantları ile hazırladıkları Aluminium Hidroksitli aşı ile 7 koyun, 3 kuzu ve 2 keçi aşıladığını ve kuvvetli virulan bir suşla eprüveden sonra aşılanmamış kontrollerin 2-3 günde ölmesine rağmen aşıların hayatta kaldığını, yalnız bu aşının injeksiyon yerinde hafif bir ödem husule getirdiğini

bildirmektedir. Gulrajani ve Arkadaşları (9) B. anthracis'in kapsülsüz avirulan suşlarından hazırlanan kültür filtratları ile Alum'lu, sodium alginatlı, Aluminium hidroksitli ve Liquid parafin - lanolin'li adjuvanlarla 5 çeşitli aşı hazırlamışlar ve bunlardan alum ve aluminium hidroksitli aşuların aynı suşla hazırlanan sporlu aşular gibi fare, kobay ve tavşanlarda bağışıklık verdiğini tesbit etmişlerdir. Szent Ivanyi (27) aluminium hidroksit gel'e adsorbe edilmiş kapsülsüz B. anthracis suşlarıyla hazırlanan aşuların koyunlarda 6,5 ay bağışıklık vermekte olduğunu bildirmiştir. Kolesov ve Mikhailov (12) Rusya'da kullanılan B. anthracis'in Sh - 15 suşu ile hazırladıkları %20 glyserinli, Aluminium hidroksitli aşularla aşılanmış hayvanlarda 7. günde başlayan bağışıklığın 6,5 ay devam ettiğini, yine Kolesov (13) Sh - 15 suşunun B. anthracis'in bir çok attenué suşları arasında aşı istihali için en iyisi olduğunu, gerek glyserinli süspansiyonun ve gerekse liyofilize şeklinin saklanmakla uzun zaman, morfolojik ve immunojenik durumunu muhafaza ettiğini bildirmektedirler. Kolesov ve arkadaşları (14) STİ ve GNKİ anthrax aşularının liyofilize etmek suretiyle kullanılabileceğini, kullanılacağı zaman 1 ml.'ine 40 - 50 ml. su katarak çalkanıp tatbik edilebileceği, at, sığır, koyun ve domuzların aşılanmalarında hiç bir zararlı etkinin olmadığını ve bağışıklığın en az 6 ay devam ettiğini bildirdiler.

Molnár (17) koruyucu antijen ihtiva eden aluminium hidroksitli bir aşı ile aşıladıkları koyunları, aşılamadan 21 gün, 3 ay ve 7 ay sonra virulan anthrax'ın 15.000 - 75.000 sporu ile eprüve ettiklerinde bir tanesi hariç hepsinin hayatta kaldığını tesbit etti. Klein ve arkadaşları (11) koruyucu antijenle aşılanan kobayların B. anthracis'in virulan bir suşu ile eprüve edildiğinde, aşılanmamış kontrol kobaylara nazaran 1000 def'a daha fazla dirençlik gösterdiğini, halbuki canlı sporlu aşularla aşılananlarda bu nisbetin ancak kontrol-lara nazaran 10 - 15 misli olduğunu tesbit etmişlerdir.

Yurdumuzda istihsal edilmekte olan Max-Sterne anthrax aşısı +4°C. de buz dolabında veya serin ve karanlık yerlerde saklanmak suretiyle 1 yıl içerisinde kullanılmaktadır. Guereio ve Nobili (8) liyofilize edilmiş saponinli aşının gerek oda derecesinde ve gerekse buz dolabında saklanmasıyla 12 ay immunogenik etkisini muhafaza ettiğini, halbuki liyofilize edilmemiş olarak saklanan aşuların aynı zamanda bazı faydalı etkilerini kaybettiğini bildirmişlerdir. Jacotot ve Virat (10) kapsülsüz anthrax basillerinin formülle öldürülmesi ve

parafin likit ilâvesiyle elde ettikleri aşuların ancak oda derecesinde 3 ay, +4°C. de 6 ay durumunu muhafaza ettiğini ve bu aşının koyunlarda 4 - 6 ay bağışıklık verdiğini bildirmişlerdir. Grosso ve Perez (7) Sterne suşuyla hazırladıkları gliserinli, tuzlu, sulu, ve gliserinli saponinli aşuların soğukta saklanmasıyla 2,5 yıldan fazla durumunu muhafaza ettiğini, halbuki aluminium hidroksitli aşuların ise bu zamandan önce bağışıklık kudretlerinden kaybettiğini bildirdiler. Alboiv ve arkadaşları (1). B. anthracis sporlarını 4, 25 ve 100°C. de değişik çevre şartlarında ve değişik zamanlarda bekletilerek muameleye tabi tuttuktan sonra yaptıkları tecrübelerde liyofize edilmiş sporların, edilmemişlere nazaran ısıya daha hassas olduklarını tesbit etti.

Sterne (25), (26) yaptığı çalışmalarda kobayların bağışıklık testlerinde rahatça kullanılabileceğini, buradan alınan neticelerin koyunlarda yapılan testlerle paralel gideceğini bildirmiştir. Keza Personius ve arkadaşları (18) Sterne suşuyla hazırlanan anthrax aşısının bağışıklık denemelerinin kobaylarda yapılabilmesi için bir metod ortaya koymuş ve eprüveden sonra aşıli kobayların büyük bir kısmının hayatta kaldığını görmüştür. Saha tatbikatında kullanılan dozla aşıladığı 26 koyundan, 1 - 3 ay ara ile yaptıkları eprüvelerden sonra 25 koyunun hayatta kaldığını, eprüve edilen aşılanmamış 21 kontrol koyundan 20 sinin öldüğünü tesbit etmiştir. Grosso ve Perez (6) Sterne suşuyla hazırlanan aşuların 300 gram ağırlığındaki genç kobaylarda bağışıklık testlerinin yapılabileceğini tecrübelerle göstermişlerdir. Lolin (16) avirulan kapsülsüz 34 F₂ aşısı suşunun 0,05 ml. ile deri altı enjeksiyon yapılan kobayların 64 gün sonra uygulanan eprüvasyona dirençlik gösterdiklerini ve bu hayvanlarda aralıklı yapılan testlerde kanlarındaki leucocyt sayılarında bir artmanın olduğunu tesbit etti.

Wright ve arkadaşları (29) ultraviole ışınlarına maruz tuttıkları B. anthracis'in Vollum suşundan proteolitik olmayan mutant suşlar elde etmişler ve ana suştan daha uzun bir üretilme devresinde dahi bu suştan elde ettikleri koruyucu antijenlerin tahrip olmadığını tesbit etmişlerdir. Yine Wright ve arkadaşları (30) B. anthracis'in 6 virulan suşundan proteolitik olmayan mutant suşlar izole etmişler ve bunlardan, modifiye 599 vasatında anaerobik şartlar altında üretilmekle, normal suşla elde edilenden takriben 5 misli daha fazla koruyucu antijen istihsal edilebileceğini göstermişlerdir. Fubra (5)

N. EMRE

Sterne suşundan elde ettiği proteolitik olmayan mutant suşun, kobaylarda yapılan mukayeseli bağışıklık denemelerinde, orijinal Sterne suşuna nazaran 10 - 1000 misli daha fazla bağışıklık kudretinde olduğunu bildirmiş isede, aynı metodla Emre ve Durukan (4) Sterne suşundan ultraviole ışınlarına maruz tutarak elde ettikleri proteolitik olmayan mutant suş'un (29/1a) esas Sterne suşuna nazaran 2 - 5 misli daha fazla bir bağışıklık kudretinde olduğunu tesbit etmişlerdir. Bu suştan hazırlanan saponinli ve aluminium hidroksitli aşılarda aşılanmış koyunların eprüveye dirençlik gösterdikleri ve bu aşılardan orijinal Max-Sterne anthrax aşısına nazaran kobay, koyun ve keçiler için tatbikatta daha emin olarak kullanılabileceği tecrübelerle ortaya konulmuştur.

Yukarıdaki bilgilerin ışığı altında yurdumuzda istihsal edilen Max-Sterne anthrax aşısından, ön çalışmalarda daha emin ve üstün bağışıklık kudretine sahip olduğu görülen proteolitik olmayan mutant suşla hazırlanan saponinli ve aluminium hidroksitli aşılardan tatbikata konulabilmesi ve hangisinin daha üstün olduğunu tesbit için koyunlarda bağışıklık sürelerinin tayini ile aşılardan dayanma müddetlerinin tesbitine ihtiyaç olduğundan bu çalışma ele alındı.

MATERYAL VE METOD

Çalışmalarımızda *B. anthracis*'in proteolitik olmayan, avirulan, kapsülsüz mutant (29/1a) suşu ile avirulan, kapsülsüz Sterne (34 F₂) suşu kullanıldı.

Mutant suşla hazırlanan konsantre aşının zararsızlık kontrolü için 2 baş keçi, aşılardan bağışıklık sürelerinin tesbiti için 1 - 2 yaş arasında 36 baş akkaraman ve 36 başta merinos koyun ile aşılardan dayanma müddetlerinin tesbiti maksadıyla, Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde yetiştirme ortalama herbiri 400 - 600 gram ağırlığında 234 baş kobay kullanıldı.

Proteolitik olmayan, avirulan kapsülsüz mutant (29/1a) suşundan liyofilize edilmiş bir ampül açılıp %0,5 Bira mayası ekstraktı ile sulandırılarak çoğaltmak maksadıyla yatık besleyici agarlara, proteolitik olup olmadığını kontrol için sütlü agara ve saflık kontrolü içinde aerop ve anaerop şartlar altında ekimleri yapıldı. 37°C. de 20 - 24 saat üretilmeden sonra suşun proteolitik olmadığı ve saf

ürettiği görüldüğünden yatık agarlar 3-4 ml. %0,5 bira mayası ekstraktı ile yıkanarak alınan süspansiyonlar kazein digest vasatlarını ihtiva eden Roux buatlarına ekildi, ve iyice yayılarak bir saat temasta bırakıldıktan sonra, buatlar ters çevrilip 37°C. lik etüve kondu. 3 günlük üretilmeden sonra herbir Roux buatı 35 er ml. serum fizyolojik ile yıkanıp alındıktan sonra bu süspansiyonun 75 ml. ine 100 ml. steril gliserin ilâve edilerek konsantre aşı hazırlandı. Bu elde edilen konsantre aşı sulu ve katı vasatlara ekilerek aerop ve anaerop şartlar altında üretildi ve saf oldukları tesbit edildikten sonra içerisindeki vegetatif basillerin tahrip edilmesi için 3 hafta buz dolabında bekletildi. Daha sonra bu aşıdan 10 ar ml. zararsızlık kontrolü için 2 keçiye deri altı inoküle edildi. Konsantre aşının ml. indeki canlı spor miktarını tesbit için Emre ve Durukan (4) tarafından bildirilen metotla 4 def'a spor sayımı yapıldı.

Spor sayımlarından alınan neticelere göre ml. lerinde 10 ar milyon spor bulunacak şekilde aşağıdaki aşılar hazırlandı:-

a — Mutant suştan hazırlanan saponinli aşı (%40 gliserin, %60 serum fizyolojik ve %0,1 saponin ihtiva etmektedir.)

b — Mutant suştan hazırlanan Aluminium hidroksitli aşı (%30 Aluminium hidroksit, %70 serum fizyolojik ihtiva eden) bu aşının içerisinde takriben %0,2 - 0,3 arasında aluminium oksit bulunan aluminium hidroksit kullanılmıştırki aşının ml. inde %0,06 - 0,09 aluminium oksit bulunmaktadır.

c — 34 F₂ suşundan hazırlanan Max-Sterne anthrax aşısı.

Aşıların husule getirdiği bağışıklık sürelerinin tayini :

Bu deneme yalnız mutant suşla (29/1a) hazırlanan aşılarla yapıldı. 12 şer baş akkaraman ve 12 şer baş merinos koyuna, saponinli ve aluminium hidroksitli aşılarından 0,5 er ml. art bacak iç kısmı deri altı inoküle edilmek suretiyle aşılandılar. 12 baş akkaraman ve 12 baş merinos koyunda kontrol olarak aşılanmadan bırakıldı. Aşılanan ve kontrol koyunlardan her 3 ayda bir 3 er baş akkaraman ve 3 er baş merinos koyun ayrılarak, herbirine ml. inde 450.000 - 500.000 spor bulunan takriben 10 - 100 MLD olan virulan anthrax süspansiyonundan 1 er ml. deri altı verilmek suretiyle eprüve edildiler .Eprüvasyonu takiben koyunlar birer ay gözlem altında bulunduruldu. Bu müddet esnasında ölen koyunların kulakların ke-

silerek alınan bir damla kandan preparatlar yapılarak Giemsa veya Methylen mavisi ile boyanıp mikroskop altında muayene edilerek anthrax müsbet olup olmadıkları tesbit edildi.

Aşıların dayanma müddetlerinin tayini :

Birer tanesi +4°C. de buz dolabında, birer tanesinde 18 - 20°C. de oda derecesinde saklanmak üzere ml. lerinde 10 ar milyon spor bulunan yukarıda bildirdiğimiz 3 çeşit aşı hazırlandı. Bu saklanan aşıların her birinden 2 ayda bir 2 şer def'a spor sayımı yapıldı ve alınan neticelerin ortalamaları mukayeseli olarak cetvele kaydedildi.

Aşılarından mukayeseli olarak 3 ayda bir kobaylarda bağışıklık denemeleri yapıldı. Bu maksatla gerek buz dolabında gerekse oda derecesinde saklanan her bir aşıdan 0,5 er ml. karın bölgesi deri altı verilmek suretiyle her defasında 6 şar kobay aşılandı. Ayrıca 12 nci ay spor sayısı azalan oda derecesinde bekletilmiş aşılarından her birini 5 er milyon spora tekabül edecek şekilde kobaylara inoküle edildi. Her bir aşılamadan 21 gün sonra 6 aşılanmamış kontrol kobayla beraber eprüve edildiler. Eprüvasyonda 100 MLD Pasteur II süspansiyonu art bacak iç kısmı deri altı inoküle edilmek suretiyle uygulandı. Eprüvasyondan sonra bütün kobaylar 15 gün göz altında tutuldu ve ölüp ölmedikleri kontrol edildi. Ölenlerin dalaklarından yapılan sürtme preparatlar Giemsa veya Methylen mavisiyle boyandıktan sonra mikroskopta muayene edilerek anthrax müsbet olup olmadıkları tesbit edildi.

BULGULAR

Mutant (29/1a) suşla hazırlanan konsantre aşının saf ve keçiler için zararsız oldukları tesbit edildi.

Bu konsantre aşıdan hazırlanan saponinli ve aluminium hidroksitli aşıların bağışıklık sürelerini tesbit için koyunlarda yapılan deneme neticeleri Tablo : 1 de gösterilmiştir. Tabloda da görüleceği üzere gerek akkaraman ve gerekse merinos koyunlar aşılamadan 3 ay sonra yapılan eprüveye dirençlik göstermişler, kontrol koyunların hepside 3 - 4 gün içerisinde ölmüştür. Böylece 3 üncü ayda tam bir bağışıklık elde edilmiştir. Fakat 6 ncı ayda saponinli aşıyla aşılanan 1 merinos koyunla, aluminium hidroksitli aşıyla aşılanan 2 me-

	3	Akkaraman	Saponinli	5 mil.	9 ay	2/3	1 koyun Anthrax Müsbet
	3	Merinos	»	»	9 ay	3/3	
III	3	Akkaraman	Alum. Hid.	»	9 ay	2/3	1 koyun Anthrax Müsbet
	3	Merinos	» »	»	9 ay	3/3	
	3	Akkaraman	Aşılanmamış Kontrol	»	Aynı tarihte eprüve edildi	1/3	2 koyun Anthrax Müsbet
	2	Merinos	» »	»	» »	0/3	3 koyun Anthrax Müsbet
	3	Akkaraman	Saponinli	5 mil.	12 ay	3/3	
	3	Merinos	»	»	12 ay	2/3	1 koyun Anthrax Müsbet
	3	Akkaraman	Alum. Hid.	»	12 ay	2/3	1 koyun Anthrax Müsbet
IV	3	Merinos	» »	»	12 ay	2/3	1 koyun Anthrax Müsbet
	3	Akkaraman	Aşılanmamış Kontrol	»	Aynı tarihte eprüve edildi	0/3	3 koyun Anthrax Müsbet
	3	Merinos	» »	»	« «	0/3	3 koyun Anthrax Müsbet

Bacillus Anthracis

Not : Alum. Hidr. = Aluminium Hidroksitli Aşı
mil. = Milyon

TABLO : 2

Oda derecesi ve buz dolabında saklanan aşuların 2 şer ay ara ile yapılan spor sayımları vasatilerini gösterir cetvel

Aşı Nev'i	Saklandığı yer	Sayımların yapıldığı aylarda, aşuların ml. lerindeki spor miktarları						
		Başlangıç	2 nci ay	4 üncü ay	6 ncı ay	8 inci ay	10 uncu ay	12 nci ay
Saponinli	Oda derecesi	10 mil.	10 mil.	9,3 mil.	9,3 mil.	8 mil.	6,5 mil.	5 mil.
»	Buz dolabı	10 mil.	10 mil.	10 mil.	9,8 mil.	8,9 mil.	8,6 mil.	8 mil.
Aluminium hidroksitli	Oda derecesi	10 mil.	9,5 mil.	8,3 mil.	7,0 mil.	5,0 mil.	3,0 mil.	3 mil.
»	« Buz dolabı	10 mil.	10 mil.	10 mil.	9,4 mil.	8,5 mil.	8,0 mil.	7,9 mil.
Max - Sterne	Oda derecesi	10 mil.	10 mil.	9,8 mil.	9,0 mil.	6,5 mil.	5,2 mil.	4,2 mil.
» »	Buz dolabı	10 mil.	10 mil.	9,8 mil.	9,8 mil.	8,6 mil.	7,8 mil.	7,5 mil.

N. EMRE

Not : mil. = Milyon, Saponinli ve aluminium hidroksitli aşular proteolitik olmayan mutant (29/1a) suşla hazırlandı.

TABLO : 3

Mutant suşla hazırlanmış oda derecesi ve buz dolabında bekletilen saponinli ve alüminyum hidroksitli aşılarla, aynı şekilde bekletilen Max-Sterne anthrax aşısının mukayeseli olarak dayanma sürelerinin tayini maksadile kobaylarda yapılan bağışıklık deneyleri neticesini gösterir cetvel.

Aşı Nev'i	Saklandığı Yer	Aşağıdaki müddetlerde bekletilen aşılarla, aşılanan kobayların Eprüvasyonundan sonra yaşama nisbeti				
		1 gün	3 ay	6 ay	9 ay	12 ay
Saponinli	Oda Derecesi	5/5	6/6	5/6	5/6	3/6
»	Buz Dolabı	6/6	6/6	5/6	6/6	5/5
Alüminyum hidroksitli	Oda Derecesi	5/5	6/6	5/6	4/6	3/6
»	Buz Dolabı	5/5	6/6	5/6	5/6	5/6
Max - Sterne	Oda Derecesi	4/4	6/6	5/6	4/6	2/6
»	Buz Dolabı	6/6	5/5	5/6	5/5	5/5
Aşılanmamış Kontrol Kobaylar		0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

Not : 1 — Herbir denemede 6 şar kobay aşılandı ve 21 gün sonra eprüve edildi.
 2 — Eprüveden önce ölen kobaylar cetvelde yer almadı, yapılan muayenelerde hepsinde anthrax menfi bulundu.
 3 — Eprüveden sonra ölen bütün kobaylarda anthrax müsbet bulundu.

Bacillus Anthracis

Aynı maksatla saklanan aşuların 3 ayda bir kobaylarda yapılan bağışıklık denemelerinin neticesinde Tablo : 3 de gösterilmiştir. Tabloda görüleceği üzere 12 ay kadar buz dolabında bekletilen 3 çeşit aşıda tam bir bağışıklık verirken oda derecesinde bekletilen 3 çeşit aşıda da 9 uncu aydan itibaren bağışıklık kudretlerinde bir azalma tesbit edildi.

12 ay oda derecesinde bekletilen aşuların bağışıklık verme kapasitelerinin düşmesi üzerine; bu düşüşün antijenik karakterlerinin kaybindan mı yoksa spor miktarından mı bağılı olduğu hususunu aydınlatmak üzere her bir aşı nev'inden 5 milyon spor ihtiva edecek şekilde aşılanan kobaylar 21 gün sonra eprüve edildiğinde Tablo : 4 de görüleceği üzere kontrollerin ölmesine rağmen aşılılar hayatta kalmıştır.

TABLO : 4

4 - 12 ay oda derecesinde bekletilen aşuların 5 er milyon sporu ile aşılanan kobayların eprüvasyondan sonraki durumlarını gösterir cetvel.

Aşı Nev'i	ml. deki spor sayısı	inokülasyon miktarı	Aşılanan kobay miktarı	Eprüvasyondan Sonra Yaşama Oranı
Saponinli	5 milyon	1 ml.	6	5/5
Alum. Hid.	3 milyon	1,6 ml.	6	6/6
Max - Sterne	4,2 milyon	1,2 ml.	6	5/5
Aşılammış kontroller			6	0/6

Not : Alum. Hid = Aluminium Hidroksitli aşı, Eprüvasyondan önce ölen aşılı kobaylarda anthrax menfi, Eprüvasyondan sonra ölen kontrol kobaylarda anthrax müsbet bulundu.

Bu alınan sonuçlara göre 12 ay oda derecesinde saklanan aşuların antijenik kudretlerinde bir değışme olmaksızın spor miktarının düşüşüne paralel olarak bağışıklık kudretlerinin azaldığı ortaya konulmuş oldu.

TARTIŞMA

Sporlu anthrax aşuları istihsalinde hazırlanan konsantre aşuların zararsızlık kontrollerini koyun veya daha hassas olan keçilerde yapılması Sterne (21), (24), Sterne ve Robinson (22), Avcıl ve Emre (3)

tarafından uygun olduğu bildirilmiştir. Çalışmalarımızda mutant (29/1a) suşuyla hazırladığımız konsantre aşının aynı metodlarla yapılan denemede keçiler için zararsız olduğu tesbit edildi.

Van-Ness ve arkadaşları (28) Sterne aşısı ile aşılanan hayvanlarda 8 gün sonra kuvvetli bir bağışıklık husule geldiğini, Personeus ve arkadaşları (18) bu aşının aşılama 1-3 ay arasında yapılan eprüvasyonlarda koyunları koruduğunu bildirmişlerse de Lindley (15) Sterne aşısından süre bakımından memnuniyet verici neticeler alınmasına rağmen bazı hayvanlara bağışıklığın geç başladığını, aşılama 21 gün sonra dahi anthrax'tan ölümlerin görüldüğü, Jacotot ve Virat (10) kapsülsüz anthrax basillerinin formülle öldürülmesiyle elde ettikleri aşılama koyunlarda 4 - 6 ay kadar bağışıklık verdiğini bildirmişlerdir. Wright ve arkadaşları (29), (30) proteolitik olmayan mutant suşlardan kuvvetli bağışıklık elde edilebileceğini, Fubra (5) Sterne suşundan elde ettiği proteolitik olmayan suşun orijinal suştan 10 - 1000 misli daha kuvvetli bağışıklık verdiğini bildirmiş ise de süre yönünden bir çalışma yapmamışlardır. Emre ve Durukan (4) gerek Sterne metodu ile hazırlanan ve gerekse proteolitik olmayan mutant suşla hazırlanan aşılama (saponinli ve aluminium hidroksitli) koyunlarda 7 gün sonra başlayan kuvvetli bir bağışıklık verdiğini, mutant suşun orijinal Max - Sterne suşuna nazaran 2 - 5 misli daha kuvvetli bağışıklık verme kudretinde olduğunu bildirdiler. Bu çalışmamızda Proteolitik olmayan, avirulan, kapsülsüz mutant (29/1a) suşla hazırladığımız saponinli aşının akkaraman ve merinos koyunlara tatbikinden sonra 6, 9 ve 12 nci aylarda yapılan eprüvasyonlarda, her defasında 6 şar koyundan 1 er tanesinin anthrax'tan ölmesi bağışıklığın 1/6 oranında azaldığını göstermiştir. Halbuki Proteolitik olan avirulan kapsülsüz suşla hazırlanan saponinli aşının bir yıl tam bir bağışıklık verdiğini Sterne (23), (24), Spears ve Davidson (20), Avcıl ve Emre (3) ile Bornova Kontrol ve Araştırma Enstitüsü çalışmaları (2) ile tesbit edilmiştir. Böylece Proteolitik olmayan mutant suşla hazırlanan saponinli aşılama Max - Sterne aşısına nazaran süre yönünden daha zayıf bağışıklık verme karakterinde olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Sokol (19) B. anthracis'in kapsülsüz variantları ile hazırladıkları aluminium hidroksitli aşılama koyun, kuzu ve keçilerde bağışıklık husule getirdiğini, Gülrajani ve arkadaşları (9) yine avirulan kapsülsüz suşlardan hazırladıkları kültür filtratlı, aluminium hidrok-

sitli aşıların, aynı suşla hazırlanan sporlu aşılar gibi fare kobay ve tavşanlarda bağışıklık verdiğini bildirmişlerdir. Kolesov ve Mikhailov (12) Sh - 15 suşu ile %20 gliserinli, aluminium Hidroksitli aşıların 7 nci günde başlayan ve 6,5 ay devam eden bir bağışıklık verdiğini, yine Kolesov ve arkadaşları (14) STI ve GNKI liyofilize anthrax aşılarının at, sığır, koyun ve domuzlarda en az 6 ay bağışıklık verdiklerini, Szent - İvanyi (27) aluminium hidroksite adsorbe edilmiş kapsülsüz B. anthracis suşları ile hazırlanan aşıların koyunlarda 6,5 ay bağışıklık verdiğini keza Molnár (17) koruyucu antijen ihtiva eden aluminium hidroksitli aşıların koyunlarda 7 aya kadar devam eden bir bağışıklık verdiğini bildirmişlersede biz çalışmalarımızda proteolitik olmayan, avirulan, kapsülsüz mutant (29/1a) suşla hazırladığımız aluminium hidroksitli aşılarla aşılı koyunların 3 ay sonra yapılan eprüvasyonlara dirençlik göstermesine rağmen, 6, 9, ve 12 nci aylarda yapılan eprüvasyonlarda aşılı 6 şar koyundan 6 ve 12 nci aylarda 2 şer koyunun ve 9 uncu ayda 1 koyunun anthrax'tan ölmesi, bağışıklık nisbetinin 6 ncı aydan itibaren 2/6 oranında azaldığını göstermektedir. Bu durumda proteolitik olmayan suşla hazırlanan aluminium hidroksitli aşılar saponinli aşıya nazaran süre yönünden daha zayıf bağışıklık verdiği ortaya konulmuştur.

Grosso ve Perez (7) Sterne suşuyla hazırlanan gliserinli ve saponinli aşıların soğukta saklanmasıyla 2,5 yıldan fazla durumunu muhafaza ettiğini, halbuki aluminium hidroksitli aşıların bu müddetten çok önce saklanmakla bağışıklık verme kudretlerinden kaybettığını bildirmişlerdir. Guereio ve Nobili (8) liyofilize edilmiş saponinli aşının oda derecesi ve buz dolabında ancak 12 ay immunogenik etkisini muhafaza ettiğini, liyofilize edilmemiş olanların bu zamanda bazı faydalı etkilerini kaybettığını, Kolesov (13) B. anthracis'in Sh - 15 suşunun gerek gliserinli süspansiyonunun ve gerekse liyofilize şeklinin saklanmakla uzun zaman morfolojik ve immunogenik durumunu muhafaza ettiğini, Alboiv ve arkadaşları (1) liyofilize edilmiş sporların, liyofilize edilmemiş olanlara nazaran ısıya daha hassas olduklarını bildirmişlerdir. Jacotot ve Virat (10) kapsülsüz anthrax basillerinin formolle öldürülmesi ve parafin likit ilâvesiyle hazırladıkları aşıların ancak +4°C. de 6 ay, oda derecesinde 3 ay durumunu muhafaza ettiğini tesbit etmişlersede biz Mutant suşla hazırlanan saponinli ve aluminium hidroksitli aşılarla Max - Sterne anthrax aşısının buz dolabı ve oda derecesinde bekletilmesi esnasında 2 ayda bir yapılan spor sayımlarında; buz dolabında bek-

Bacillus Anthracis

letilen aşıların 10 uncu aydan itibaren bağışıklık verme durumunu etkilemeyecek bir azama gördüksede, oda derecesinde bekletilen aluminium hidroksitli aşıda 6 ncı aydan, saponinli ve Max - Sterne anthrax aşısından 8 inci aydan itibaren bağışıklığı etkileyecek nisbette belirli bir azalma gördük.

Anthrax aşılarının bağışıklık denemelerinin kobaylar üzerinde yapılabileceğini Sterne (25), (26), Personneus ve arkadaşları (18). Grosso ve Perez (6), Lolin (16) ve Klein ve arkadaşları (11) bildirmişlerdir. Bizde çalışmalarımızda aşıların dayanma müddetlerinin tesbiti için oda derecesi ve buz dolabında saklanan aşıların her 3 ayda bir mukayeseli bağışıklık denemelerini kobaylar üzerinde yaptık. Buz dolabında saklanan gerek proteolitik olmayan mutand suşla hazırlanan saponinli ve aluminium hidroksitli aşı ve gerekse yurdumuzda kullanılan Max - Sterne anthrax aşısı +4°C. de buz dolabında 12 ay bekletmekle bağışıklık kudretinden bir şey kaybetmediği buna karşılık oda derecesinde bekletilen her 3 nev'i aşının 9 uncu aydan itibaren bağışıklık verme kudretlerinde bir azalma tesbit edilmiştir.

Böylece gerek spor sayımları ve gerekse kobaylarda yapılan bağışıklık deneemleri neticesinde buz dolabında 12 ay saklanan aşıların bağışıklık kudretlerini olduğu gibi muhafaza ettiği, halbuki oda derecesinde bekletilen aluminium hidroksitli aşıların 6 ncı aydan sonra, saponinli ve Max-Sterne anthrax aşısının ise 8 inci aydan itibaren bağışıklık husule getirme kudretlerinin azalmış olduğu tesbit edildi.

12 ay oda derecesinde bekletilen aşıların bağışıklık verme nisbetlerinin düşüşünün spor sayımı ile ilgili olup olmadığı maksadıyla yapılan çalışmada, herbir aşıdan dozda 5 er milyon spor isabet edecek şekilde aşılanan kobayların eprüveye dirençlik göstermeleri, bir müddet bekletilen aşıların antijenik karakterlerinde ve kudretlerinde bir değişme olmaksızın, bağışıklık nisbetinin düşüşünün tamamen aşılardaki spor miktarının azalmasına bağlı olduğunu ortaya koymuştur.

SONUÇ

Proteolitik olmayan, avirulan, kapsülsüz mutant (29/1a) suşla hazırlanan saponinli ve aluminium hidroksitli aşılar Max - Sterne

N. EMRE

anthrax aşısına nazaran kullanılması daha emin ve başlangıçta kuvvetli bağışıklık vermekte iselerde, bağışıklık süresi yönünden daha zayıf karakter göstermesi ve bazı hayvanlarda 6 ncı aydan itibaren bağışıklığın kaybolması, bu aşuların pratiğe intikali yönünden bir dezavantaj olarak görülmüştür. Bunlardan saponinli aşı, aliminium hidroksitli aşuya nazaran biraz daha kuvvetli bağışıklık vermektedir.

Saponinli ve aliminium hidroksitli aşular +4°C. de buz dolabında bekletilmekle Max-Sterne anthrax aşısında olduğu gibi 12 ayda bağışıklık kudretlerinden kaybetmemişler, buna mukabil oda derecesinde bekletilen aliminium hidroksitli aşı 6 ncı aydan, saponinli ve Max-Sterne aşısı ise 8 inci aydan itibaren bağışıklık verme kudretlerinde bir azalma tesbit edilmiştir. Bu sebeple bu aşuların buz dolabında saklanması ve bir yıl içerisinde kullanılması uygun olacaktır

ÖZET

B. anthracis'in avirulan, kapsülsüz, proteolitik olmayan mutant suşu (29/1a) ile ml. lerinde 10 milyon canlı spor bulunan 2 çeşit (a — %40 gliserin, %60 serum fizyolojik ve %0,1 saponin; b — %30 aliminium hidroksit, %70 serum fizyolojik) aşı hazırlandı

Aşuların bağışıklık sürelerini tayin için her bir aşıyla 0,5 ml. deri altı verilmek suretiyle 12 şer baş akkaraman, 12 şer baş merinos olmak üzere 48 baş koyun kullanıldı. Aşılardan 3, 6, 9 ve 12 ay sonra her bir aşıyla aşılanmış 6 şar baş koyun takriben 10-100 MLD B. anthracis'in virulan bir suşu ile eprüve edildi. Aşılanmamış 6 şar kontrol koyunda aynı zamanlarda eprüve edildi. Aşılardan 3 ay sonra yapılan eprüvasyonu takiben aşı bütünü koyunlar hayatta kaldı ve aşılanmamış kontrol koyunlar anthrax'tan öldü, fakat aşılardan 6, 9 ve 12 ay sonra yapılan eprüvasyonları takiben saponinli aşıyla aşılanmış koyunların 1/6 ı, Aliminium hidroksitli aşıyla aşılanmış koyunların 2/6 ı 3-4 gün içerisinde anthrax'tan öldü, eprüveden sonra diğerleri hayatta kaldı. Bir tanesi hariç kontrol koyunların hepside anthrax'tan öldü.

Bağışıklık testlerinde akkaraman ve merinos koyunlar arasında bir farka rastlanılmadı.

Bacillus Anthracis

Aşıların dayanma müddetlerini tesbit için mutant suşla (29/1a) hazırlanan saponinli ve aluminium hidroksitli aşılarla Türkiye'de hazırlanan Sterne anthrax aşısı oda derecesi ve +4°C. buzdolabında saklandı. Bir yıl boyunca bu aşılarından 2 ayda bir spor sayımları yapıldı. Bağışıklık denemeleri içinde dozda 0,5 ml. olmak üzere 6 şar başlık guruplar halindeki kobaylara deri altı injeksiyon yapıldı. Bu aşılama aşuların hazırlandıkları tarihten itibaren 1, 3, 6, 9 ve 12 nci aylarda yapıldı. Aşılamalardan 21 gün sonra kobaylar 100-200 MLD B. anthracis'in Pasteur II suşu ile eprüve edildiler. Aşılanmamış 6 şar kontrol kobayda keza aynı zamanlarda eprüve dozunu aldılar.

Alınan sonuçlarda : +4°C. de saklanan bütün aşılar 12 ay içerisinde gerek canlılıklarından ve gerekse bağışıklık verme güçlerinden bir şey kaybetmediler. Oda derecesinde bekletilen aluminium hidroksitli aşı 6 ay, saponinli ve Sterne aşısı 8 ay sonra canlılıkları ile bağışıklık verme kudretlerinden birazını kaybettiler.

Oda derecesinde 12 ay bekletilen aşıların herbirinden kobaylara 5 milyon spor verilmek suretiyle teste tabi tutulduğunda; bağışıklık verme kudrelerindeki kaybın spor sayısının azalmasına bağlı olduğunu ortaya koydu.

SUMMARY

(Determination of duration of immunity and the stability of vaccines with saponin and aluminium hydroxide prepared by avirulent, noncapsulated, nonproteolytic mutant strain (29/1a) of B. anthracis.)

Two kinds of anthrax spore vaccines (a — 40% glycerol, 60% physiological saline, and 0,1% saponin; b — 30% aluminium hydroxide, 70% physiological saline) which are contained 10 million viable spores in 1 ml. of each, were prepared by avirulent, noncapsulated, nonproteolytic mutant strain (29/1a) of B. anthracis.

Determining of duration of immunity 48 sheep were used, each of 12 akkaraman, and 12 Turkish merino sheep were vaccinated subcutaneously with 0,5 ml. of each vaccine. 3, 6, 9, and 12 months after vaccination 6 sheep of each vaccine were challenged with about 10-100 lethal doses of a virulent strain of B. anthracis.

N. EMRE

At the same times 6 unvaccinated sheep also received the challenge dose. 3 months after vaccination all the vaccinated sheep withstood the challenge and the unvaccinated control sheep died from anthrax, but, 6, 9, and 12 months after vaccination about 1/6 of sheep which were vaccinated by saponized vaccine, 2/6 of sheep which were vaccinated by aluminium hydroxide gel vaccine died from anthrax within 3-4 days, the others withstood after challenge. All control sheep except one died from anthrax.

There were no differences in immunity test between akkaraman and merinos sheep.

Saponized and aluminium hydroxide gel vaccines which were prepared by mutant strain (29/1a) and Sterne's anthrax vaccine which is prepared in Turkey were kept at both room temperature and +4°C. in refrigerator for detection of the stability of the vaccines. Spore counts have been made from these vaccines every 2 months for a year. Test for potency have been made by injecting subcutaneously each of 6 healthy guinea pigs groups, with a dose 0,5 ml. of the 3 vaccines. These vaccination have been done at 1, 3, 6, 9, and 12 months from the time of preparation. They were challenged with about 100 - 200 lethal doses of Pasteur II strain of B. anthracis after 21 days of vaccination. At the same times 6 unvaccinated guinea pigs have also received the challenge dose.

The results showed that all the vaccines kept at +4°C. retained their viability and potency for 12 months from the time of preparation. The vaccines kept at room temperature lost some of their viability and potency after 6 months for aluminium hydroxide vaccine, and after 8 months for saponized vaccine and Sterne's vaccine from the time of preparation.

When another test was made on guinea pigs which were vaccinated by injecting about 5 million spores from each vaccine which had been kept at room temperature for about 12 months. It showed that the loss of potency depended on the reduction of the spore count.

L İ T E R A T Ü R

- 1 — **Alboiv, M., Serban, M., Prodan, D., 1972** : (Effect of freeze drying on the resistance of Bacillus anthracis spores) - Lucrările Înst. de Cercetari Veterinare si Biopreparate «Pasteur» Romania, 8, 189 - 206 Ref. Vet. Bull. 1972 : 42, 6780.
- 2 — **Anon., 1968** : Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünün 540 - 1/1584 sayılı raporu.
- 3 — **Avcıl, F. ve Emre, M. N., 1964** : Türkiye'de hazırlanan Max - Sterne anthrax aşısı. - Etlik Vet. Bak. Enst. Dergisi 2, 239 - 246.
- 4 — **Emre, M.N., ve Durukan, Ş., 1969** : Proteolitik olmayan, avirulan, Bacillus anthracis mutantlarının izolasyonu ve koyalarda mukayeseli bağışıklık denemesi ile bu mutantlardan canlı aşı hazırlanması, - Etlik Vet. Bak. Enst. Dergisi 3, 23 - 54.
- 5 — **Fubra, E. S., 1966** : Nonproteolytic, avirulent Bacillus anthracis as a live vaccine. - J. Bacteriol., 91, 930 - 933.
- 6 — **Grosso, A. M. and Perez, A.A., 1961** : (Sterne's avirulent anthrax vaccine, tests on laboratory animals.) Rev. Invest. Ganad. No : 11, 51 - 62. Ref. Vet. Bull., 1962 : 32, 1730.
- 7 — **Grosso, A. M. and Perez, A. A., 1963** : (Behaviour of Sterne anthrax vaccine prepared with different vehicles.) - Rev. Invest. Ganad. No : 18, pp . 324 - 328. Ref. Vet. Bull., 1964 : 34, 2057.
- 8 — **Guercio, V. and Nobili, İ., 1960** : La liofilizzazione del vaccino alla saponina contro il carbonchio ematico. - Atti. Soc. Ital. Sci. Vet. 14, 763 - 766.
- 9 — **Gulrajani, T. S., Misra, R. P., Verma, J. C. and Ahuja, M. L., 1968** : Effect of adjuvants on immunising efficacy of Bacillus anthracis protective antigen.- Indian Vet. J. 45, 465 - 476.
- 10 — **Jacotot, H., et Virat, B., 1963** : Vaccination contre L'infection charbonneuse par injection de bacteridies Tuées en excipient huileux. - Ann. Înst. Pasteur., 104, 823 - 826.
- 11 — **Klein, F., De Armon, İ. A. Jr., Lincoln, R. E., Mahlandt, B. G. and Fernelius, A. L., 1962** : Immunological studies of Bacillus anthracis obtained with protective antigen and live vaccine. - J. Immunol. 88, 15 - 19.
- 12 — **Kolesov, S. G. and Mikhailov, N. A., 1956** : (I — Trial of aluminium hydroxide anthrax vaccine under field conditions. II — Immunogenic properties of aluminium hydroxide vaccine and results of large scale Trials.) - Trud. nauchno kont. İns. Vet. Preparatcv. 6, 242 - 249, 250 - 255. Ref. Vet. Bull. 158 : 28, 1307, 1308.
- 13 — **Kolesov, S. G., 1957** : (Methods of obtaining anthrax vaccine.) - Trud. nauchno kontrol İnst. Vet. Preparatov. 7, 177 - 193. Ref. Vet. Bull. 1959 : 29, 927.
- 14 — **Kolesov, S. G., Mikhailov, N. A. and Presnov, İ. N., 1961** : (Preparation and use of freeze dried anthrax vaccines.) - Trud. nauchno - Kontrol İnst. Vet. Preparatov, 9, 159 - 165. Ref. Vet. Bull., 1962 : 32, 983.

- 15 — **Lindley, W. H., 1963** : Anthrax vaccination. - J. Amer. Vet. Med. Asso. 142, 621 - 623.
- 16 — **Lolin, M., 1970** : (Reaction of guinea pigs to the S/C injection of anthrax vaccine of the South African 34 F₂ strain.) - Vet. Glasn, 24, 253 - 259. Ref. Vet. Bull., 1970 : 40, 4736.
- 17 — **Molnár, I., 1959** : Immunization experiments with the protective antigen of the anthrax bacillus. - Acta. Vet. Acad. Sci. Hung. 9, 175 - 182. Ref. Vet. Bull., 1960 : 30, 327.
- 18 — **Personeus, G., Cooper, M. S. and Percival, R. C., 1956** : Studies on anthrax prepared from non encapsulated variants of Bacillus anthracis. - Amer. J. Vet. Res. 17, 153 - 156.
- 19 — **Sokol, A., 1957** : (Use of adsorbed live vaccine against anthrax in sheep.) - Vet. Cas., 6, 305 - 314. Ref. Vet. Bull., 1958; 29, 1306.
- 20 — **Spears, H. N. and Davidson, J. C., 1959** : Anthrax. - The Vet. Record. 71, 637 - 643.
- 21 — **Sterne, M., 1939** : The use of anthrax vaccines prepared from avirulent (uncapsulated) variants of Bacillus anthracis. - Onderst. J. Vet. Sci. 13, 307 - 312.
- 22 — **Sterne, M., and Robinson, E. M., 1939** : The preparation of anthrax spore vaccines (for cattle and Sheep) in south Africa. - Onderst. J. Vet. Sci. 12, 9 - 20.
- 23 — **Sterne, M., Robinson, E. M. and Nicol, J., 1939** : The use of saponin spore vaccine for inoculation against anthrax in south Africa., - Onderst. J. Vet. Sci. 12, 279 - 304.
- 24 — **Sterne, M., 1946** : Avirulent anthrax vaccine. - Onderst. J. Vet. Sci. 21, 41-44.
- 25 — **Sterne, M., 1948 a** : The effect of inflammation on the survival of guinea pigs infected with anthrax. - Onderst. J. Vet. Sci. 23, 157 - 164.
- 26 — **Sterna, M., 1948 b** : The effect of inflammation on the development of immunity to anthrax in guinea pigs. - Onderst. J. Vet. Sci., 23, 165 - 170.
- 27 — **Szent - Iványi, I., 1960** : Studies on the immunizing properties of non - encapsulated strains of Bacillus anthracis. - Acta. Vet. Acad. Sci. Hung., 10, 239 - 246. Ref. Vet. Bull., 1961 : 31, 610.
- 28 — **Van-Ness, G. B., Plotkin, S. A., Huffaker, R. H. and Evans, W. G., 1959** : The Oklahoma - Kansas anthrax epizootic of 1957 - J. Vet. Med. Ass., 134, 125 - 129.
- 29 — **Wright, G. G., Hedberg, M. A., and Feinberg, R. J., 1951** : Studies on immunity in anthrax II - in vitro elaboration of protective antigen, by non - proteolytic mutants of Bacillus anthracis. - J. Exp. Med., 93, 523 - 527.
- 30 — **Wright, G. G., Puziss, M., and Neely, W. B., 1962** : Studies on immunity in anthrax IX - Effect of variations in cultural conditions on elaboration of protective antigen by strains of B. anthracis. - J. Bact. 83, 515 - 522.