

## Antraks İlgili Gelişmeler

Müjgan İZGÜR<sup>1</sup> Ziya İLHAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

<sup>2</sup>Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, VAN

### ÖZET

*Bu derlemede, antraks ile ilgili son zamanlardaki gelişmeler özellenmiştir.*

**Anahtar Kelimeler:** Bacillus anthracis.

### *Developments concerning anthrax*

### SUMMARY

*In this review, the late developments concerned with anthrax had been summarized.*

**Key Words:** Bacillus anthracis.

**Antraks** (Şarbon), vücut ısısının yükselmesi, dalağın şişmesi, kanın koyu bir renk alması ve pıhtılaşmaması, deri altı ve sub-seröz boşluklarda sero-hemorajik infiltrasyonların oluşumu ile karakterize bir infeksiyondur (6, 20, 31). Hastalık zoonotik özelliğine ilaveten önemli ekonomik kayıplara da neden olmaktadır. Etkenin spor formu doğada uzun yıllar canlılığını devam ettirmesi bakımından çevre sağlığı için de bir risk oluşturmaktadır. Kısaca, Türkiye'nin de içinde bulunduğu gelişmekte olan ülkeler ve özellikle bazı gelişmemiş ülkeler için antraks, günümüzde de ciddi bir tehdit unsuru olma özelliğini korumaktadır. Örneğin, 1979-1980 yılları arasında Zimbabve'de 6000 insanın infeksiyona yakalandığı bildirilmiştir (34).

*Bacillus anthracis*'in neden olduğu infeksiyon günümüzde gelişmiş ülkelerde hayvansal ekonomi ve halk sağlığı açısından büyük bir tehlike oluşturmamaktadır. Bu ülkelerde infeksiyona karşı yürütülen ciddi mücadeleler sayesinde, hastalığın yeniden yayılmasından da endişe edilmemektedir. Hastalık son zamanlarda özellikle ABD ve bazı Avrupa ülkelerine yönelik biyolojik silah olma özelliği ile sıkça gündeme gelmeye başlamıştır. Çok eskiden beri bilinen antraks, bakteriyolojik savaşta ilk düşünülen hastalık olma özelliğine de sahiptir. Hastalığın etkeni *B. anthracis* yüksek virulensi, geniş konakçı spektrumu ve dış etkilere karşı dayanıklılığı gibi özellikleri nedeniyle potansiyel bakteriyolojik bir silah olmuştur (31). Etken insanlara sindirim, solunum, direkt temas, deride oluşan yaralar ve kontamine toprağın inhalasyonu ile bulaşmaktadır. Aerosol haline getirilmiş 50 kg'lık *B. anthracis*, 2 km yükseklikte uçan bir uçaktan 500.000 kişilik korumasız bir populasyon üzerine atıldığında, uygun atmosferik şartlarda 20 km'den fazla bir alana yayılabilmekte ve yaklaşık 220.000 insanı etkileyebilmektedir. Etken bakteriyolojik silah olarak kullanıldığında ve vücuda inhalasyon yoluyla alındığında, insanlarda % 80-85 mortaliteye sahip solunum sistemi infeksiyonu oluşturduğu bildirilmektedir (17).

### TARİHÇE

İnfeksiyon etkeni olarak ilk keşfedilen bakteri *B. anthracis*'tir. Bu özelliği ile infeksiyöz hastalıkların,

immunolojinin ve bakteriyolojinin günümüzde anlaşılması bakımından antraksın tarihsel bir önemi vardır (39).

Türkiye'de hastalık eski zamanlardan beri bilinmektedir. Ülkemizde hastalığın yayılmasında çeşitli olumsuz uygulamaların da etkisi vardır. Ampirikler hastalıktan ölen hayvanların dalaklarından geçirdikleri ipleri, sağlıklı hayvanların kulaklarına geçirip, kulakta ipin bir parçasını bırakmak sureti ile infeksiyonun yayılmasına adeta yardımcı olmuşlardır. Ampirikler böylelikle hastalıktan korunulabileceğini düşünmüşlerdir. Yine hasta olan bir sürüyü akarsuların kaynaklarına kadar koşturarak, kaynağa ilk ulaşan hayvanı kurban edip, kanını suya karıştırmak sureti ile geniş bir bölgenin kontamine olmasına neden olmuşlardır Türkiye'deki hayvan hareketleri de 1920-1930'lu yıllarda infeksiyonun yayılmasında etkili olmuştur. Bölgesel hayvan pazarı ve panayırlardan başka özellikle Kars yöresinden İzmir limanına yıllık 500.000 hayvanın yürütülerek nakledilmesi geniş bir bölgenin kontaminasyon sebebi olmuştur. O yıllarda hastalıkla mücadelede yeterli veteriner hekimin olmaması (toplam 50 hekim) göz önünde bulundurulması gereken bir başka durumdur (5).

Antraks ile ilgili Robert Koch'un çalışmaları oldukça önemlidir. Koch yaptığı çalışmalarla, *B. anthracis*'i in vitro ortamlarda üretmeyi başarmış ve etkenin spor oluşturan bir bakteri olduğunu tespit etmiştir (34). Antraks ile ilgili çalışmalar yapan bilim adamlarından biri de Louis Pasteur'dür. Çalışmaları Pasteur'e şarbon hastalığında bakterinin rolünü ispatlama ve 'Hastalıklarda Germier Teorisi'ni hazırlama imkanı vermiştir. Pasteur'ün 1881 yılında ünlü Pouilly Le-Fort deneyi ile şarbonla ilgili çalışmaları, aşı devrinin başlangıcının bir simgesi olarak kabul edilmektedir (31). Yirminci asrın ortalarında *B. anthracis* ile ilgili iki önemli gelişme gerçekleştirilmiştir. Bunlar virulens faktörleriyle birlikte, Sterne aşı süşunun tespitidir. Max Sterne 1934 yılında, avirulent, stabil ve kapsülsüz bir süş izole etmiştir. Kendi ismini taşıyan bu süş ile yapılan aşılamaalarda iyi bir bağışıklık oluşmakta ve yan etkileri de Pasteur aşısından daha az olmaktadır (31). Ascoli ise antraksın tanısında çok fazla değeri olan ve kendi adıyla bilinen serolojik bir yöntemi, presipitasyon reaksiyonunu pratiğe koymuştur (3).



## ETİYOLOJİ

Bacillus genusu Gram pozitif, *B. anthracis* hariç genellikle hareketli, aerobik veya fakültatif anaerobik, endospor oluşturan basillerden meydana gelmiş büyük bir gruptur. Bacillus genusunda insan ve hayvanlarda infeksiyona neden olan en önemli tür *B. anthracis*'tir. *B. anthracis* Gram pozitif ve sporlu bir mikroorganizmadır. Hareketsiz olan etken 1-1.2 µm çapında, 3-5 µm uzunluğundadır (12, 22, 23, 27, 30, 33). Ölen hayvanlardan hazırlanan boyalı preparatlarda tek tek veya 2-5 basilin oluşturduğu kısa zincirler şeklinde ve kapsüllü, laboratuvarında üreyen basiller ise oldukça uzun filamentler şeklinde ve bazılarında spora da rastlanmaktadır. Spor oluşumu oksijenli ortamlarda ve 12°C'nin üzerindeki ısıda gerçekleşmektedir (7). Etken, her mililitresinde 10 ünite penisilin G içeren agarda üreyememektedir. Ancak penisilin G miktarının her mililitre için 0.05-0.5 ünite olduğu agarlarda basiller yuvarlaklaşarak, zincir şeklinde parlak bir görüntü (inci dizisi reaksiyonu) vermektedir (12). DNA'daki G+C'nin % mol oranı 32.2-33.9 olarak bildirilmiştir (33).

## EPİZOOTİYOLOJİ

Bacillus türlerinin çoğu saprofit olarak havada, suda ve toprakta bulunur. *B. anthracis*'in spor formu kontamine bölgelerde 50 yıl canlı kalabilmektedir. Böyle bölgeler ılık bir iklim ve alkali toprak yapısı özelliğine sahiptir (34). Etken tüm memelilerde infeksiyona neden olmakla birlikte hastalık daha çok sığır, koyun, keçi, at, deve, geyik, fil, buffalo ve minklerde görülmektedir (7, 18). Devekuşu hariç kanatlılar genellikle infeksiyona dirençlidir (7). Sığır, koyun ve keçiler hastalığa en duyarlı hayvanlardır. İnsan ve atlar orta derecede, karnivorlar ve domuzlar ise nispeten duyarlıdır (27).

Zoonotik bir infeksiyon olarak antraks infekte hayvanlarla ve ayrıca kontamine hayvansal ürünlerle insanlara da bulaşabilmektedir. İnsanlarda infeksiyon çoğunlukla deri formu şeklinde görülür ve antibiyotiklere iyi cevap vermektedir. Ancak gastrointestinal ve pulmonal formlarda % 5'e varan ölüm oranları da bildirilmiştir (22).

## PATOGENEZ

Antraksın patogenezinde kapsül ve plasmidlerin rolü vardır.

**Kapsül:** Hücre içinde sentezlenen kapsül yüksek vizkosite özelliğinden dolayı hücre yüzeyine yapışarak bir tabaka oluşturur. Bakteriler kapsül olmadan da yaşamlarını devam ettirebilmektedirler. Ancak diğer bakteriyolojik virulens faktörleri ile birlikte kapsül, bazı özel durumlarda mikroorganizmanın yaşaması bakımından önem gösterir. Hücre yüzeyinde bulunan kapsül etkeni konakçının fagositoz yapan hücrelerinden, nötrofillerden, litik antikorlardan ve diğer savunma faktörlerinden koruyarak, hastalık oluşumuna yardımcı olmaktadır. Kapsülün antifagositik etkisi vardır. Bu etki kendini bakteri ile fagositik hücrelerin temasını engelleyerek gösterir (28). Bir kısım araştırmacılar kapsülün bu şekildeki antifagositik etkisini, antiopsonik etki olarak tanımlamışlardır (38). Bakterilerde kapsül genellikle

polisakkarid yapıdadır. Ancak *B. anthracis*'in de içinde bulunduğu bazı bakterilerin kapsülü protein (D-glutamik asit) özelliğinde olması ile diğerlerinden ayrılır (2).

*B. anthracis*'in iki önemli virulens faktörü vardır. Bunlardan biri, üçlü yapıdaki koruyucu antijen (PA), öldürücü faktör (LF) ve ödem faktör (EF)'ü, diğeri de kapsüldür. Kapsülün sentezi PXO<sub>2</sub> (60 MDal) plasmidi tarafından kodlanmaktadır (16, 20, 21, 36). PXO<sub>2</sub> plasmidini taşımayan antraks suşları avirulenttir (8). Kodlama işlemini plasmid üzerindeki *cap* bölgesi üstlenmiştir. Bu bölge *capB*, *capC* ve *capA* olmak üzere üç sistrondan oluşmaktadır. *Cap* bölgesi inaktive edilen suşlar fagositik hücreler tarafından kolaylıkla fagosite edilebilmektedir. Bu durum, etkenin fagositozdan korunmada kapsülün ne derece önemli olduğunu göstermektedir. Plasmidin kapsülsüz suşlara transferi ile böyle suşlarda kapsül oluşturmak mümkün olabilmektedir (21).

Virulent suşların kapsül oluşturabilmeleri normal olarak in vivo ortamlarda mümkündür. *B. anthracis*'in in vitro ortamlarda üretilmesinde gerek kapsül, gerekse toksinin sentezi bakımından üretildiği kültürün bileşimi önem taşımaktadır. Besiyerinin (agar) bikarbonat içermesi ve CO<sub>2</sub>'li ortamda inkube edilmesi toksin ve kapsül sentezini artırmaktadır. Bikarbonat iyonlarının etkisi daha çok PA kodlayan PXO<sub>1</sub> plasmidi üzerindeki *pag* geninin transkripsiyonunu stimule etmesi ile ilgilidir (6, 12)

Bikarbonat içeren agarın fazla miktarda CO<sub>2</sub> bulunan ortamlarda inkubasyonu ile oluşan mukoid kolonilerin hepsi, kapsüllü ve virulent özelliktedir. Etkenin uzun süre inkube edilmesi halinde rough koloniler oluşur. Böyle koloniler kapsülsüz ve avirulenttir (23, 36). Bu özellikteki kolonilerin tekrar kapsüllü, virulent özellik göstermeleri saptanamamıştır. Ancak antraksa karşı aşı olarak kullanılan Sterne suşu kapsülsüzdür ve bağışıklık da oluşturabilmektedir. Bu durumun genetik mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (36). *B. anthracis*'in kapsüllü ve kapsülsüz suşlarının ayırımında Wa fajı kullanılmaktadır. Wa fajı kapsülsüz suşları lize ederken kapsüllü suşları herhangi bir şekilde etkileyememektedir (34).

**Plazmid ve toksinler:** *B. anthracis* toksinlerinin gerek kimyasal yapıları gerekse hastalığın patogenezindeki rolleri, Koch'un çalışmalarının erken dönemlerinden itibaren üzerinde durulan konular olmuştur. Çoğu araştırmacılar infekte hücrelerdeki toksinin etkisini inceleyerek, toksinin virulente önemli bir faktör olduğu kanısına varmışlardır. 1954 yılında yapılan bir çalışmada, bugünkü anlamda fonksiyon ve yapıları tam olarak saptamakla birlikte bir toksinin varlığı ispat edilmiş ve daha sonraki yıllarda da ikinci bir toksinin sentezlendiğine dikkat çekilmiştir (10, 22).

Virulent özellik gösteren *B. anthracis* suşlarında biri küçük (PXO<sub>2</sub>, 60 M Dal) diğeri büyük (PXO<sub>1</sub>, 110 M Dal) iki adet plazmid bulunmaktadır (8, 22, 24). PXO<sub>1</sub> plazmidini üçlü yapıdaki antraks toksinlerinin sentezinden sorumludur. Toksinlerden biri olan letal toksin, 83 kDa'luk LF ile 83 kDa'luk PA'den; diğeri de 89 kDa'luk EF ile PA'nin birleşmesinden oluşan ödem toksinidir. Protein yapısında olan PA, LF ve EF'ün tek başlarına toksik aktivitelerinin olmadığı bildirilmektedir (4, 8, 13, 19, 29, 32, 37). PXO<sub>1</sub> plazmidini üzerinde bulunan *pag*, *cya* ve *lef* genleri sıra ile PA,



EF ve LF'ü kodlamaktadır (24). Bu genler hastalıkla ilgili genetik çalışmaların esasını oluşturmaktadır (22). PA, LF ve EF sıra ile 735, 776 ve 767 amino asitten oluşmaktadır. Bu amino asitler arasında sisteinin bulunmaması dikkat çekicidir. EF, faktör I; PA, faktör II; LF ise faktör III olarak da isimlendirilmektedir (9).

LF ve EF deneme hayvanlarında tek başlarına toksik etki oluşturamamaktadır. PA için de aynı durum söz konusudur. Ancak PA'nin tek başına konakçının sinir ve kardiovasküler sisteminde geçici değişiklikler yaptığı şeklinde görüşler de bulunmaktadır (22).

Deneme hayvanlarında tek başlarına herhangi bir toksik etki oluşturamayan 3 komponent, beklenen etkilerini gerçekleştirebilmeleri bakımından birbirlerine ihtiyaç duymaktadırlar. Konuyla ilgili yapılan çalışmalar sonucunda her üç komponentin ölüm ve ödem oluşturmada sinerjik etkili oldukları, LF'ün PA ile birleşerek oluşturduğu letal toksinin *B. anthracis*'in esas virulens faktörü olduğunu, adenilat siklaz aktivitesi gösteren EF'ün ise infeksiyonlarda önemli roller üstlendiği gösterilmiştir (22).

Ödem toksininin deneme hayvanlarına subkutan enjeksiyonunda lokal ödemler oluşmaktadır. Letal toksinin ratlara intravenöz enjeksiyonundan 40 dk sonra pulmonel ödemi takiben ölümler şekillenmektedir (9, 18). Bu kadar kısa sürede meydana gelen ölüm, letal toksinin toksisite gücünü değerlendirme konusunda bir fikir vermekle birlikte, ölüm olayının selüler ve moleküler boyutunu açıklamaya yetmemektedir (26).

Hastalığın patogenezi ile ilgili PA'nin önemli fonksiyonları arasında herhangi bir yardıma ihtiyaç duymaksızın direkt hedef hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanabilmesi, LF ile EF için özel reseptör bölgeleri taşıması (COOH-terminal uçtaki 63 kDa'luk bölge) ve bu bölgelere bağlanarak oluşan kompleksin hücre içine girmesine yardımcı olması bulunmaktadır (32). LF ile EF, PA'ne bağlanabilme bakımından bir yarış halindedir. Bu yarış iki faktörün biyolojik aktivitelerinin gücüne bağlı olarak sonuçlanmaktadır. LF ve EF'ün hedef hücrelere girebilmesinde PA, üstlendiği bu aracı rolden dolayı 'reseptöre bağlı komponent' olarak da isimlendirilmektedir (18).

Non-toksik bir protein olan EF, hücre içi kalmoduline bağlı güçlü bir adenilat siklaz aktivitesi göstermektedir (11, 18, 19, 24, 26). PA ile EF kompleksinin hücre yüzeyi reseptörüne bağlanmasından sonra EF, intra selüler kalmodulin ve kalsiyum iyonları tarafından aktive edilerek, ATP'nin c-AMP'ye dönüşümünü katalize etmektedir (32). Böylece oluşan intra selüler c-AMP, ortasında nekroz odağı bulunan bir ödeme sebep olmaktadır. Böyle ödemler 'malignant püstül' olarak da isimlendirilmektedir (9).

LF'ün, EF gibi herhangi bir enzimatik aktivite gösterip göstermediği henüz tam olarak belirlenememekle birlikte (22), LF'ün de diğer güçlü bakteriyel toksinler gibi enzimatik bir aktivite gösterdiği (26), hatta son zamanlarda yapılan çalışmalarla LF'ün bir metaloproteaz olduğu şeklinde görüşler de bulunmaktadır (37).

LF'ün 308-383. amino asitleri arasında 'repeat region' olarak isimlendirilen bir bölge bulunmaktadır. Bu bölgenin

ne gibi bir fonksiyon üstlendiği tespit edilememiştir (4). Oldukça kompleks bir yapıya sahip olan LF'ün amino ve karboksi terminal uçları farklı aktivitelere sahiptir. Quinn ve ark. (26), in vitro ortamlarda LF'ün 17 bölgesinde özel mutasyonların olduğunu saptamışlardır. Ancak bu bölgelerin in vivo ortamlarda tespiti yapılamamıştır.

Bakteri kültürlerinden salting out ve hidroksiapatit kromotografi ile ayrılabilen LF, bazı hücrelerde beklenen etkiyi oluşturamamaktadır. Bu durum bazen söz konusu hücrelerin farklı bir iç yapı özelliği göstermesinden, bazen de LF'ün kendisinden kaynaklanmaktadır (4, 9).

Letal toksinin makrofajlar için sitolitik bir etkisi vardır. Değişik farelere ait makrofajların letal toksine olan duyarlılıkları farklılık göstermektedir. Örneğin, C3H fare makrofajlarını 0.001 µg/ml konsantrasyondaki letal toksin lize ederken, aynı konsantrasyona A/J fare makrofajları 100.000 kat daha dirençlidir. Gerek önce PA'nin hedef hücre yüzey reseptörüne bağlanması, gerekse daha sonra LF ve EF'ün PA'ne bağlanması bakımından duyarlı ve dirençli makrofajlar arasında bir fark bulunmamaktadır. Letal toksine dirençli olan A/J fare makrofajları diğer toksin ve viruslara dirençli değildir. A/J fare makrofajlarının letal toksine olan dirençleri şu şekilde açıklanabilir. Letal toksinin makrofajlarca işlenme aşamalarındaki bir eksiklikten, sitozolde letal toksin için bulunması gereken hedef noktaların yok olmasından, endosilik vezikül veya sitozolde LF aktivasyonundaki bir eksiklikten ileri gelebilmektedir (11).

*B. anthracis*'in yüksek ısıda (42°C) plazmidleri ile birlikte toksijenik özelliğini kaybetmesi ve böyle suşlara PXO<sub>1</sub> plazmidinin transferi ile tekrar toksin sentezleyen suşların oluşması, PXO<sub>1</sub> plazmidinin hem strüktürel hem de regüler genleri arasında toksin sentezi bakımından sıkı bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu özellikten yararlanılarak attenüe canlı aşı suşlarının hazırlanması mümkün olabilmektedir (9).

## SEMPTOMLAR

Hastalığın inkubasyon süresi hayvanın türü, direnci ve mikroorganizmanın miktarına bağlı olarak 1-14 gün arasında değişmektedir. Antraks hayvanlarda perakut, akut ve subakut bir seyir izlemektedir. Perakut form daha çok sığır ve koyunlarda görülüp ani ölümlerle karakterizedir. Akut ve subakut formlarda vücut ısısında 40-42°C'ye kadar artma ve bir süre sonra ölümler şekillenmektedir. Hastaların çoğunda sinirlilik, iştahsızlık, kanlı idrar, boğaz altına lokalize ödemler, süt veriminde azalma ve gebelerde abort şekillenmektedir.

## NEKROPSİ BULGULARI

Antrakstan ölen hayvanların kadvralarında çabuk kokuşma görülmektedir. Rigor mortis tam değil veya hiç şekillenmektedir. Vücudun doğal deliklerinden siyah renkte ve pıhtılaşmayan kan gelmektedir. Deri altı damarları çok dolgun olup, kadvrada tam bir septisemi tablosu hakimdir. Dalak normalin üzerinde bir büyüme göstermekte ve kesit yüzünün kömür rengi aldığı dikkat çekmektedir.



## TEŞHİS

**A-Klinik teşhis:** Perakut seyreden vakalarda çok az ve yetersiz klinik bulgular nedeni ile infeksiyonu tanımlamak güçtür. Akut formdaki ödemler diğer bir kısım hastalıklarda da olduğu için teşhise yetmemektedir. Sığırlarda hastalık yanıkara, piroplazmozis, leptospirozis, pastörellozis, basiller hemoglobüri; koyunlarda bradzot, leptospirozis; atlarda sancı ile seyreden mide-barsak hastalıkları ile karışmaktadır.

## B-Laboratuvar muayeneleri

**1-Bakteriyoskopi:**Laboratuvara gönderilen marazi maddelerden hazırlanan frotiler Gram, giemsa veya polikrom metilen mavisi ile boyanır. Gram boyamada mikroskop altında sporsuz, tek tek veya 3-8 basilden oluşan kısa zincirler şeklinde Gram pozitif etkenler görülür. Etkenin kapsül formasyonu giemsa veya polikrom metilen mavisi ile daha belirgin olarak boyanmaktadır. Bu boyama metodlarının diagnostik önemi vardır. Kapsül ölüme yakın dönemlerde hazırlanan preparatlarda daha net olarak görülmektedir.

**2-Kültür:** Antraks şüphesi ile ölen hayvanların dalak, kemik iliği, kan, ödem sıvıları ve diğer organ parçaları marazi madde olarak laboratuvara gönderilebilir. Kanlı agara aerobik koşullarda ekimler yapılarak, 37°C'de 24 saat inkube edilir. Besiyerinde 3-5 mm çapında gri ve kenarları çentikli kolonilerin görülmesi antrakstan şüphelendirir. Kontamine materyaller fizyolojik tuzlu suda iyice karıştırıldıktan sonra 65°C'de 10 dakika bekletilmelidir. Soğutma işleminden sonra santrifüj edilip kültür için hazır hale getirilir.

**3- Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR):** *B. anthracis* sporları toprak ve çeşitli organik-inorganik maddelerle yoğun olarak kontamine olmuş eski materyallerden nested PZR ile saptanabilmektedir. Primerler PXO<sub>1</sub> ve PXO<sub>2</sub> plazmid genlerinden hazırlanmaktadır. Hedef DNA örnekleri ise, önce etken zenginleştirilmiş sıvı besiyerinde üretilip, sonra vegetatif bakterilerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inaktivasyonu ile hazırlanmaktadır. Bu metotla 100 gr toprakta, 10 adet ve daha az sayıdaki sporun saptanabildiği bildirilmektedir (1).

**4-Serolojik testler:** Serolojik testlerden en çok agar jel difüzyon testi kullanılmaktadır. Test, petri kutularında veya lam üzerinde hazırlanan difüzyon ortamında yapılır. Agar üzerinde açılan deliklerden birine presipitinojen, diğerlerine de şüpheli serumlar konmaktadır. Kontrol amacı ile bir pozitif ve bir negatif serum kullanılır. Delikler doldurulduktan sonra 37°C'de 10 saat bekletilerek sonuçlar değerlendirilir.

**5-Hayvan deneyi:** Marazi maddelerden hazırlanan örnekler ile şüpheli kolonilerden fare ve kobaylara deri altı veya intraperitoneal olarak verilir. İki-yedi gün içinde ölen hayvanlara nekropsi yapılarak bakteriyoskopi ve kültür uygulanır.

**6-Bakteriyofaj duyarlılığı:** *B. anthracis*'e spesifik gama fajı katı besiyerinde üreyen etkeni lize ederek plaklar oluşturur. Test için triptoz agara *B. anthracis*'in sıvı kültürü iyice yayılır. Üzerine faj süspansiyonundan bir damla

damlatılır. Kontrol olarak da FTS ve *B. subtilis* kullanılır. Yaklaşık 18-20 saatlik inkübasyon sonrasında fajın damlatıldığı bölgede üremenin olmaması testin pozitif olduğunu gösterir.

**7-Allerjik testler:** Hayvanların açıkça taşıyıcı olmaması ve infekte hayvanların ani ölümü nedeni ile belki de aşılansız hayvanların immunolojik durumlarının belirlenmesi dışında, günümüzde standart bir allerjik testin geliştirilemediği bildirilmektedir.

## KORUMA

Hayvanlarda sağaltımdan çok koruma önem taşımaktadır. İnfeksiyonun meradan alındığı durumlarda şüpheli meralar hayvanlara kapatılır. Ölen hayvanlar açıkta bırakılmayıp, yaklaşık 2 m derinliğinde açılan çukurlara gömüldükten sonra kireç serpilerek kapatılır. Eğer infeksiyon ahırda çıkmış ise hastalar ayrılır ve gerekirse sağaltıma gidilir. İçerisinde bulunan tüm malzeme ile birlikte ahır güçlü dezenfektanlarla dezenfekte edilmelidir.

## TÜRKİYE'DE ANTRAKSA KARŞI UYGULANAN KORUMA YOLLARI

1-Henüz serum naklinin yapılmadığı 1923'ten önceki dönemde, bazı hayvan sahipleri özel çabaları ile elde ettikleri Pasteur aşısını kullanmışlardır.

2-1923'ten sonra yapılan bağışık serum nakli.

3- Bağışık serum nakli ile birlikte Sobernheim Tekniği ile aşılama.

4-Pasteur aşısı ile aşılama. (1927'ten önce ithal edilen Pasteur aşısı bu tarihten itibaren Pendik Bakteriyoloji Enstitüsü'nde, Dr. Forgot kontrolünde üretilmiştir).

5-T.Ü.A aşısı ile aşılama (5)

6-Max Sterne aşısı ile aşılama (3).

**Türk Üniversal Antraks (T.Ü.A) aşısı:** S.T. Aygün, *B. anthracis* suşlarının bazılarının belli hayvan türleri için adaptasyon kazandığını düşünerek, değişik bölgelerde, değişik türdeki hayvanlardan izole ettiği 14 suşu aşı çalışmalarında kullanmıştır. Örneğin, keçiden izole ettiği suşu deneme hayvanlarında (fare) yaptığı sürekli pasajlarla, hayvanı öldürebilen ancak izole edilen keçide bağışıklığı uyarabilen en düşük bakteri sayısını tespit etmiştir. Çalışmaları esnasında *B. anthracis*'in diğer özelliklerinin değişmediğini ancak virulensinin azaldığını görmüştür. Virulensi azaltılmış bu suşlar sporlu attenüe bir aşı olup T.Ü.A. aşısı ismiyle kullanılmıştır (5).

**Max Sterne aşısı:** Geçmişte ve günümüzde antraks ile ilgili birçok çalışmada Sterne suşu bir model olarak kullanılmaktadır (22). Sadece PXO<sub>1</sub> plazmidini taşıyan ve kapsülsüz olan bu suş, veteriner sahada en geniş kullanım alanı bulan bir aşı suşudur. Suş, 1937 yılında Sterne tarafından geliştirilmiştir. Sterne yüksek oranda CO<sub>2</sub> içeren serum agarda, virulent *B. anthracis*'in rough varyantının ürediğini tespit etmiştir. Kapsül oluşturma yeteneğinde



olmayan bu varyantın daha sonraları kapsülün sentezini kodlayan PXO<sub>2</sub> plazmidinden yoksun olduğu ve bu özelliğinin irreversibl bir karakter gösterdiği anlaşılmıştır. Sterne, bu varyantı çiftlik hayvanlarında bir aşı suşu olarak kullandığında, hayvanları virulent *B. anthracis*'e karşı koruduğunu tespit etmiştir. 34 F2 olarak adlandırılan bu izolat daha sonra veteriner sahada en çok kullanım alanı bulan bir aşı suşu olmuştur. Antraksa karşı aşı üretimi yapan dünyadaki 36 merkezden 31'i aşı suşu (seed stock) olarak 34 F2 suşunu kullanmaktadır (1).

Türkiye'de üretilmekte olan antraks aşısı 34 F2 suşu ile hazırlanan % 50 gliserin, % 50 FTS ve % 0.1-0.5 saponin içeren sporlu attenüe bir aşıdır. Aşı antraksli bölgelerde hastalık çıkmadan önce ilkbaharda ve hastalık çıkan yerlerde de hemen ve hasta olmayanlara uygulanmaktadır. Bir-iki hafta içinde oluşan bağışıklık 6-12 aya kadar devam etmektedir (3).

### Rekombinant aşı çalışmaları

Bu amaçla dünyadaki son aşı geliştirme çalışmaları başlatılmıştır. Antraksa karşı bağışıklığın oluşmasında esas rolü PA üstlenmiştir (24, 35). PA'nin bağışıklıktaki rolünün daha iyi anlaşılabilmesi için LF ve EF'den arındırılması gerekmektedir. PA'nin ileri derecede pürifiye edildiğinde dahi az miktarda da olsa LF ve EF ile kontamine olduğu bildirilmektedir. Gerçektende PA ile yapılan immunizasyon çalışmalarında, EF ve LF'e spesifik antikorlar da sentezlenmektedir (14).

PA'nin bağışıklıktaki rolünün anlaşılması bakımından Pezard ve ark. (24), farelerde yaptıkları çalışmada oluşan antikorları PA, LF, EF, letal toksin ve ödem toksini yönünden incelemişlerdir. Sadece PA sentezleyen suşlarla yaptıkları immunizasyon çalışmalarında, farelerin tamamında PA'ne karşı yüksek titrede antikor oluşurken, yalnızca LF veya EF'ü sentezleyen suşlarla yaptıkları çalışmalarda antikor titresinin düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar, PA'nin hem kendisine karşı yüksek titrede antikor sentezlenmesi bakımından, hem de EF ile LF'e karşı sentezlenen antikorlara olan etkisinden dolayı humoral bağışıklığın oluşmasında ne derece önemli roller üstlendiğini göstermektedir (25).

Sterne suşu PXO<sub>1</sub> plazmidinde bulunan *cya*, *pag* ve *lef* genlerinin inaktivasyonu ile elde edilen rekombinant aşı suşlarının letal etkilerinin olmaması, antraksa karşı başka canlı aşıların elde edilmesi konusunda birtakım çalışmalara neden olmuştur. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmada, vektör bir plazmid aracılığı ile (PBR 332-6kb) Sterne suşundaki *pag* geni *E. coli*'ye klonlanmıştır. *E. coli*'de sentezlenen PA miktarı bakımından birbirinden farklı iki adet plazmid oluşmuş (PSE24 ve PSE36) ve *E. coli*'deki bu yeni plazmidlerin kodladığı PA'nin miktarı oldukça az bulunmuştur. Aynı konu ile ilgili olarak Ivins ve ark. (14), vektör plazmid (PUB110) kullanarak *pag* genini *B. subtilis*'e aktarmışlardır. Araştırmacılar, bir yandan serolojik çalışmalarda kullanılacak miktarda PA'nin *B. anthracis* dışındaki bir başka bakteride sentezlettirmek, diğer yandan da sadece PA sentezleyen bir suşu canlı aşı suşu olarak kullanmayı amaçlamışlardır. Klonlama sonrası *B. subtilis*'te PA<sub>1</sub> (7.8 kb) ve PA<sub>2</sub> (6.1 kb) ile belirtilen iki adet plazmid oluşmuştur. Sıra ile bu plazmidler buyyonda dağılmış halde bulunan 20.5 µg/ml ile 41.9 µg/ml miktarında PA sentezlemeleriyle ayırt

edilmişlerdir. Sentezlenen PA'nin western blotting ile yapılan incelemesinde, Sterne suşunun sentezlediği PA ile aynı antijenik özellikte olduğu anlaşılmıştır. PA<sub>1</sub> ve PA<sub>2</sub> süpernatantlarına, LF ve EF ilavesi ile tıpkı Sterne suşu tarafından sentezlenen letal ve ödem toksin gibi biyolojik reaksiyonlar gösterdiği anlaşılmıştır. Araştırmacılar daha sonra rekombinant *B. subtilis* PA<sub>1</sub> ve PA<sub>2</sub> suşları ile kobay ve ratlarda aşılama çalışmaları yaparak sonuçları ELISA ile değerlendirmişlerdir. Rekombinant PA<sub>1</sub> suşunun sentezlediği PA miktarının yarısı kadar olmasına rağmen, bağışıklık oluşturma gücü 5 kat daha fazla bulunmuştur. Bu sonuca rağmen rekombinant PA<sub>2</sub> suşuna karşı oluşan bağışıklık da yeteri düzeyde koruyucu bulunmuştur. Araştırmacılar sonuçta, *B. subtilis* rekombinant PA<sub>1</sub> ve PA<sub>2</sub> suşlarının kobayları, virulent *B. anthracis* sporlarından, ratları da intravenöz uygulanan letal toksinden koruduğunu ifade etmişlerdir (24).

Ivins ve ark. (15), Sterne suşunun *pag* genini vektör bir plazmid aracılığı ile *B. subtilis*'in DB104 suşuna klonlayarak, PA7 rekombinant plazmidleri taşıyan rekombinant bir suş elde etmişlerdir. Bu suş ile kobay ve farelerde yaptıkları aşı çalışmalarında, deneme hayvanlarını oldukça virulent olan *B. anthracis* Ames suşuna karşı koruduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar bu sonuçlar ile rekombinant PA7 suşundan, Sterne suşuna göre daha güvenilir sonuçlar veren yeni canlı bir aşının geliştirilebileceği sonucuna varmışlardır.

### KAYNAKLAR

- 1-Anon. (1996): Manual of Standarts for Diagnostic Tests and Vaccines: Office International Des Epizooties. 3<sup>rd</sup> Ed., Chapter. 3.1.1., Paris.
- 2- Arda, M. (1985): Genel Bakteriyoloji. 3. Baskı, A.Ü. Vet. Fak. Yay., 402, Ankara.
- 3- Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N. ve Akay, Ö. (1992): Özel Mikrobiyoloji. Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum.
- 4- Arora, N. and Leppla, S. H. (1993): Rezidües 1-254 of anthrax toxin lethal factor are sufficient to cause cellular uptake of fused polypeptides. J. Biol. Chem., 268, 5: 3334-3341.
- 5- Aygün, T. S. (1934): Türkiyede (Antraks) Dalak Yanığı ve Savaşı/Türk Universal Antraks Aşısı (T.U.A) Üzerine Bilgiler. Köyhocası Matbaası, Ankara.
- 6- Bartkus, J. M. and Leppla, S. H. (1989): Transcriptional regulation of the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. Infect. Immun., 57, 8: 2295-2300.
- 7- Bisping, W. and Amsberg, G. (1988). Colour Atlas for the Diagnosis of Bacterial Pathogens In Animal. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg.
- 8- Ezzel, J. W. and Abshire, T. G. (1988): Immunological analysis of cell-associated antigens of *Bacillus anthracis*. Infect. Immun., 56, 2: 349-356.
- 9- Freer, J. H. (1988): Toxins As Virulence Factors of Gram Positive Pathogenic Bacteria of Veterinary Importance. In: Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Ed., Ioth, J. A. American Society For Microbiology, Ames, Iowa.
- 10- Friedlander, A. M. (1986): Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin trough an acid-dependend process. J. Biol. Chem., 261, 16: 7123-7126.



11- Friedlander, A. M., Bhotnagar, R., Leppla, S. H., Johnson, L. and Singh, Y. (1993): Characterization of macrophage sensitivity and resistance to anthrax lethal toxin. *Infect. Immun.*, 61, 1: 245-252.

12- Gibson, T. and Gordon, R. E. (1974): Endospore-Forming Rods and Cocci. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ed., Cowan, S.T., Holt, J.G., Liston, J., Murray, R.G.E., Niven, C.F., Rovin, A.W., Stainer, R.Y. Williams and Wilkins Com., Baltimore.

13- Corden, V. M., Leppla, S. H. and Hewlett, E. L. (1988): Inhibitors of receptor-mediated endocytosis block the entry of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase toxin but not of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect. Immun.*, 56, 5: 1066-1069.

14- Ivins, B. E. and Welkos, S. C. (1986): Cloning and expression of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene in *Bacillus subtilis*. *Infect. Immun.*, 54, 2: 537-542.

15- Ivins, B. E., Welkos, S. C., Knudson, G. B. and Little, S. H. (1990): Immunization against anthrax with aromatic compound-dependent (Aro) mutants of *Bacillus anthracis* and with recombinant strains of *Bacillus subtilis* that produce anthrax protective antigen. *Infect. Immun.*, 58, 2: 303-308.

16- Johnson, A. and Spero, L. (1981): Comparison of growth and toxin production in two vaccine strains of *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 4, 6: 1479-1481.

17- Kahraman, Ü. C. (1999): *Biyolojik Silahlar*. I. Seminer. A. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

18- Labruyère, E., Mock, M., Ladant, D., Michelson, S., Gilles, A. M., Laoide, B. and Barzu, O. (1990): Characterization of ATP and calmodulin-binding properties of a truncated form of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase. *Biochem.*, 29, 4922-4928.

19- Labruyère, E., Mock, M., Suriwicz, W. K., Montsch, H. H., Rose, T., Munier, H., Sarfati, R. S. and Barzu, O. (1991): Structural and ligand-binding properties of a truncated form of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase and of a catalytically inactive variant in which glutamine substitutes for lysine-346. *Biochem.*, 30, 2619-2624.

20- Little, F. S. and Knudson, G. B. (1986): Comparative efficacy of *Bacillus anthracis* live spore vaccine and protective antigen vaccine against anthrax in the guinea pigs. *Infect. Immun.*, 52, 2: 509-512.

21- Makino, S., Uchido, I., Terakado, N., Sasakawa, C. and Masanosuke, S. (1989): Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.*, 171, 2: 722-730.

22- Mikesell, P., Ivins, B. E., Ristrop, J. D. and Dreier, T. M. (1983): Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.*, 39, 1: 371-376.

23- Pezard, C., Berche, P. and Mock, M. (1991): Contribution of individual toxin components to virulence of *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.*, 59, 10: 3472-3477.

24- Pezard, C., Duflot, E. and Mock, M. (1993): Construction of *Bacillus anthracis* mutant strains producing a single toxin component. *J. Gen. Microbiol.*, 139, 2459-2463.

25- Pezard, C., Weber, M., Sirard, J.C., Berche, P. and Mock, M. (1995): Protective immunity induced by *Bacillus anthracis* toxin deficient strains. *Infect. Immun.*, 63, 4: 1369-1372.

26- Quinn, C. P., Singh, Y., Klimpel, K. R. and Leppla, S. H. (1991): Functional mapping of anthrax toxin lethal factor by in-frame insertion mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 266, 30: 20124-20130.

27- Quinn, P. S., Carter, M. E., Markey, B. and Carter, G. R. (1994): *Clinical Veterinary Microbiology*. 1<sup>st</sup> Ed., Wolfe Publishing, Spain.

28- Scanlan, C. M. (1988): *Introduction To Veterinary Bacteriology*. 1<sup>st</sup> Ed., Iowa State Uni. Press, Iowa.

29- Shlyakov, E. and Rubbinstein, E. (1995): Delayed hypersensitivity after anthrax vaccination. I. Study in guinea pigs vaccinated against anthrax. *Med. Trop.*, 54, 1: 33-37.

30- Sirard, J. C., Mock, M. and Fouet, A. (1994): The three *Bacillus anthracis* toxin genes are coordinately regulated by bicarbonate and temperature. *J. Bacteriol.*, 176, 16: 5188-5192.

31- Sirard, J. C., Malville, M., Fouet, A. and Mock, M. (1996): Physiopathologie moléculaire de la maladie du charbon. *Revue Méd. Vet.*, 147, 10: 653-670.

32- Singh, Y., Klimpel, K. R., Quinn, L. P., Chaudhary, V. K. and Leppla, S. H. (1991): The carboxyl-terminal end of protective antigen is required for receptor binding and anthrax toxin activity. *J. Biol. Chem.*, 266, 23: 15493-15497.

33- Sneath, P. H. A. (1986): Endospore-Forming Gram Positive Rods and Cocci. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Chapter 15. Ed., Murray, R. G. E., Brenner, D. J., Bryant, M. R., Holt, J. H., Krieg, N. R., Moulder, J. W., Pfenning, N., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. Williams and Wilkins Com., Baltimore.

34- Swartz, M. N. (1990): *Aerobic Spore-Forming Bacilli*. In: *Microbiology*. Ed., Davis, D. B., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Gisberg, H. S. 4<sup>th</sup> Ed., Philadelphia.

35- Turnbull, P. C. B., Leppla, S. H., Broster, M. G., Quinn, C. P. and Melling, J. (1988): Antibodies to anthrax toxin in humans and guinea pigs and their relevance to protective immunity. *Med. Microbiol. Immun.*, 177, 293-30

36- Uchido, I., Sekizaki, T., Hoshimoto, K. and Terakado, N. (1995): Association of the encapsulation of *Bacillus anthracis* with a 60 mega dalton plasmid. *J. Gen. Microbiol.*, 131, 363-367.

37- Uchido, I., Hornung, J. M., Thorne, L. B., Klimpel, K. R. and Leppla, S. H. (1993): Cloning and characterization of a gene whose product is a trans-activator of anthrax toxin synthesis. *J. Bacteriol.*, 175, 17: 5329-5338.



**38- Widders, P. R. (1988):** Bacterial Resistance To Antibody Dependent Host Defenses. In: *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*. Ed., Roth, J.A. Iowa State Uni., Iowa.

**39. Wright, G. G. (1958):** The Anthrax Bacillus. In: *Bacterial and Mycotic Infection of Men*. Ed., Dubos, J.R. J.B. 3<sup>rd</sup> Ed., Lippincott Company, London.