

## Bacillus Anthracis'in Vegetatif şekillerine Isının ve Gliserinin etkisi

Prof. Dr. Hasan BAŞKAYA (\*)

Dr. M. Nabi EMRE (\*\*)

Sporlu antraks aşılarının hazırlanması esnasında spor sayımları ile bağışıklık testlerinin daha sıhhatli bir şekilde yapılabilmesi için konsantre aşılardaki vegetatif antraks basillerinin tahrip edilmesine ihtiyaç vardır.

Sterne (8) in bildirdiği üzere B. anthracis'e ısının etkisi birçok araştırmacılar tarafından denenmiş ve öldürücü müddet değişik zamanlarda tayin edilmiştir. Umumiyetle sporsuz vegetatif şekiller ısıya hassas iken sporlar oldukça dayanıklıdır. Smith ve Martin (6) B. anthracis'in vegetatif formlarının 54°C. de 30 dakikada öldüğünü tesbit etmişler, Stein ve Rogers (7) buna karşılık sporların 80°C. ye 30 dakika dayandığını görmüşlerdir. Aygün (3) antraks basilinin vegetatif formlarının 55 - 58°C. de 10 - 15 dakikada öldüğünü bildirmiştir. Wilson ve Miles (9) ise vegetatif formların 55°C. de 1 saatte canlılıklarını kaybettiklerini beyan etmektedirler.

Ando (1) Pasteur II suşu ile yapılan denemelerde 60 - 65°C. nin bir saat süreyle sporlara etkili olmadığını, buna karşılık vegetatif formların harap olduğunu beyan etmiştir. Dünya Sağlık Teşkilâtının Raporuna göre Hulse ve arkadaşları (4) konsantre spor süspansiyonuna 2 misli gliserin katarak incelemelerde bulunmuşlardır. Araştırmacılar göre bu süspansiyonun 65°C. de 1 saat ısıya tabi tutulmasının uygun olacağı görüşünü savunmuşlardır. Yine aynı araştırmacılar konsantre süspansiyonun 20°C. de en az 14 gün bekletilmesini tavsiye etmektedirler. Avcıl ve Emre (2) Max - Sterne antraks aşısının gliserinli konsantre şeklinin hazırlanmasından sonra vegetatif formların ve zayıf sporların tahrip olması için karanlık bir yerde oda derecesinde 2 - 3 hafta bekletilmesini tavsiye etmektedirler. Merchant ve Packer (5) B. anthracis'in vegetatif

(\*) A. Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji ve Salgın Hastalıklar Kürsüsü.

(\*\*) Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde Uzman.

şekillerinin  $-79^{\circ}\text{C}$ . de dondurmak ve  $37,5^{\circ}\text{C}$ . de bir kaç def'a çözdürmek suretiyle harap olduğunu, buna karşılık sporların bu işlemden zarar görmeyeceğini bildirmişlerdir.

Yurdumuzda hazırlanmakta olan Max - Sterne antraks aşısının daha emin bir şekilde testlerinin uygulanmasını sağlamak amacı ile B. anthracis vegetatif formlarının kesin bir şekilde bertaraf edilmesini tesbit etmek amacı ile bu çalışma ele alınmıştır.

### MATERYAL VE METOD

Çalışmalarımızda B. anthracis'in 4 suşu kullanıldı. Bunlar: 34F<sub>2</sub> (avirulan, kapsülsüz Max - Sterne aşı suşu), 29/1a (avirulan, kapsülsüz, proteolitik olmayan, 34F<sub>2</sub> suşundan elde edilen mutant suş), Pasteur II (attenué aşı suşu), Davis (sporlanmayan, Japonya'dan temin edilen suş) dir.

Davis suşu hariç diğer suşlar önce buyyonlara ekilerek 18 saat üretildi, sonra bir buyyona tekrar pasaj yapıp yine 18 saatlik bir üretilmeden sonra içerisinde 100 ml. buyyon ihtiva eden balonlara ekildi, ve 5 - 5,5 saat  $37^{\circ}\text{C}$ . lik etüvde üretildikten sonra buradan hazırlanan preparatların mikroskopik muayeneleri ile içerisinde spor bulunup bulunmadıkları kontrol edildi. Hiç spor görülmeyen ve basilleri ihtiva eden buyyon kültürü iyice karıştırılarak basil zincirlerinin parçalanmasına çalışıldı, ve buradan 20 şer ml. alınarak 20 şer ml. lik steril gliserin üzerine katıldı, iyice karıştırıldı. Hiç sporlanmayan Davis suşu ise yine 100 ml. lik balonlarda  $37^{\circ}\text{C}$ . de 48 saat üretilmeden sonra aynı muameleye tabi tutuldu. Hazırlanan her bir %50 gliserinli süspansiyon serisinin içerisindeki basil sayısını tesbit için dilisyonları hazırlanarak 1 er ml. petrilere konuldu ve üzerlerine eritilip  $55^{\circ}\text{C}$ . ye soğutulmuş besleyici agar dökülerek karıştırıldı, donması için beklenildi. Bu petrilere  $37^{\circ}\text{C}$ . lik etüve konarak inkübasyona terkedildi. 24 ve 48 inci saatlerde husule gelen koloniler sayılmak suretiyle basil sayısı tesbit edildi. Her bir suştan bir seri  $55 - 56^{\circ}\text{C}$ . lik su banyosuna konarak sıcaklığa adapte olması için 2 dakika bekletildikten sonra su banyosu içerisinde arasına karıştırmak suretiyle 15, 20, 25 ve 30 ar dakika ısıya maruz bırakıldı. Her sürenin sonunda 1 er ml. alınarak petrilere konuldu ve üzerlerine eritilip  $55^{\circ}\text{C}$ . a soğutulmuş besleyici ağardan dökülüp donduktan sonra  $37^{\circ}\text{C}$ . lik etüve bırakıldı. 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra koloniler sayılarak ısıya tabi tutulmuş gliserinli süspansiyonların ml. lerindeki canlı basil sayısı tesbit edilmiş oldu.



Yine aynı metodla hazırlanan 2 ci bir seride 60 - 61°C. lik su banyosunda adapte olması için 2 dakika bırakılmadan sonra 10, 15, 20 ve 30 ar dakika ısıya maruz bırakıldı. Her sürenin sonunda aynı metodla ml. lerindeki basil sayısı tesbit edildi.

%50 gliserinli süspansiyonda basillerin ne kadar müddetle hayatiyetlerini kaybedeceklerini tesbit için yine her suştan 100 er ml. de aynı şekilde üretilen basilleri ihtiva eden buyyondan 20 şer ml. leri 20 şer ml. steril gliserine katılmak suretiyle 2 şer süspansiyon hazırlandı. Kontrol olarak derhal ml. lerindeki basil sayısını tesbit için dilisyonları hazırlandı, ve yukarıda bildirdiğimiz metodla ml. lerindeki basil sayısı tesbit edildi. Bu süspansiyonların 1 er tanesi buz dolabında (+4°C. de), 1 er tanesi de oda derecesinde (18 - 22°C. de) bırakıldı. 5 inci, 10 uncu, 14 üncü ve 18 inci günlerde iyice karıştırıldıktan sonra hazırlanan dilisyonlarından basil sayısını tesbit için petrilere 1 er ml konarak eritilip 56° C. ye soğutulmuş besleyici agarlar karıştırılıp 37°C. lik etüve bırakıldı. 24 ve 48 inci saatlerde koloniler sayılmak suretiyle ml. lerindeki canlı basil sayısı tesbit edilmiş oldu.

## SONUÇLAR

Antraks basillerinin vegetatif şekillerini değişik sürelerde 55 ve 60°C. lerde ısıya tabi tuttuktan sonra ml. lerindeki üreme kabiliyetinde olan basil miktarları (Tablo : 1) de gösterilmiştir.

Tabloda da görüleceği üzere 55°C. de 15 dakika bırakmakla basillerin ancak %0,3 - 0,4 ü canlı kalmış, büyük bir kısmı üreme kabiliyetlerini kaybetmişlerdir. Bu nisbet 20 dakika ısıya maruz bırakmakla iyice azalmış, 25 ci dakikada ise Davis suşundan hepsi ölmüş diğerlerinde bir kaç basil görülmüşse de 30 dakikada hepsi üreme kabiliyetini kaybetmiştir.

60°C. lik su banyosunda 10 dakika ısıya tabi tutulanların ancak %0,2 si canlı kalmış, %99,8 i üreme kabiliyetini kaybetmişlerdir. 15 dakikada ancak bir kaç basil ısıya dayanmış ise de 20 dakikada bütün basiller canlılıklarını kaybetmişlerdir.

%50 gliserinli ortamda vegetatif antraks basillerini buz dolabında ve oda derecesinde bekletmekle ne kadar müddetle canlılıklarını kaybettiklerine ait denemelerimizden aldığımız neticeler (Tablo : 2) de gösterilmiştir.

TABLO : 1

Muhtelif *B. anthracis* suşlarının vegetatif şekillerinin 55 ve 60°C. lik ısıda kaç dakika canlı kaldıklarını gösterir cetvel.

Suş Adı	Muhtelif dakikalarda 55°C. lik su banyosunda ısıya tabi tutulmalarından sonra ml. lerindeki basil sayısı					Muhtelif dakikalarda 60°C. lik su banyosunda ısıya tabi tutulmalarından sonra ml. deki basil sayısı.				
	Isıtılmadan önce	15 Dak.	20 Dak.	25 Dak.	30 Dak.	Isıtılmadan önce	10 Dak.	15 Dak.	20 Dak.	30 Dak.
34F <sub>2</sub>	100,000	450	30	3	0	75,000	150	2	0	0
29/1a	175,000	950	45	10	0	150,000	300	20	0	0
Pasteur II	30,000	45	4	3	0	40,000	20	3	0	0
Davis	17,500	14	2	0	0	15,000	16	2	0	0

NOT : % 50 gliserin ihtiva eden basil süspansiyonları su banyosundaki ısıya adapte olması için 2 dakika bekletilmeden sonra yukarıdaki dakikalarda bekletildi.

Dak. = dakika

TABLO : 2

% 50 gliserinli ortamda vegetatif antraks basillerini buz dolabında (+ 4°C.de) ve oda derecesinde (18 - 22°. de) ne kadar canlı kaldıklarını gösterir cetvel.

Suş Adı	Buz dolabında bırakılan süspansiyonun ml. indeki basil miktarları					Oda derecesinde bırakılan süspansiyonun ml. indeki basil miktarları					
	Deneme Öncesi Kontrol	Muayene edilen günler					Deneme Öncesi Kontrol	Muayene edilen günler			
		5.ci	8.ci	10.cu	14.cü	18.ci		5.ci	8.ci	10.cu	14.cü
34F <sub>2</sub>	75,000	800	200	150	3	0	75,000	200	14	0	0
29/1a	150,000	800	149	25	0	0	130,000	300	15	0	0
Pasteur II	30,000	400	100	14	3	0	20,000	300	28	3	0
Davis	20,000	475	320	115	20	0	20,000	175	20	0	0



Tabloda da görüleceği üzere buz dolabında bekletilen basillerin 5. ci günde ancak %1 - 2 si canlı kalmış, büyük bir kısmı üreme kabiliyetini kaybetmiştir. Bu nisbet gittikçe azalarak 14. cü günde 29/1a suşuna ait basiller tamamen canlılıklarını kaybetmişler diğer suşlarda ise bir kaç basil canlı kalmıştır. 18. ci günde hepsi de üreme kabiliyetlerini kaybetmişlerdir.

Oda derecesinde ise basiller daha süratle canlılıklarını kaybetmişler. 10. uncu günde Pasteur II suşundaki bir kaç basil hariç diğerlerinin hepsi de üreme kabiliyetlerini kaybetmişlerdir.

### M Ü N A K A Ş A

Hernekadar Wilson ve Miles (9) vegetatif basillerin 55°C. de 1 saatte canlılıklarını kaybettiklerini, Aygün (3) vegetatif antraks basillerinin 55 - 58°C. de 10 - 15 dakikada öldüğünü bildirmişlerse de yaptığımız çalışmada bazı basillerin 55°C. deki ısıya 25 dakika dahi dirençlik gösterdiklerini, fakat 30 dakikada tamamen üreme kabiliyetlerini kaybettiklerini Smith ve Martin (6) in bildirdikleri gibi tesbit ettik.

Sporlu anthrax aşısı hazırlanmasında Dünya Sağlık Teşkilâtı Raporuna göre Hulse ve arkadaşları (4) vegetatif basillerin tahribi için 65°C. de 1 saat bekletmeyi, keza Ando (1) Pasteur II suşu ile Japonya'da hazırlanan sporlu anthrax aşısının da konsantre şeklinin 60 - 65°C. de 1 saat ısıya tabi tutulmasını öngörmektedirler. yaptığımız çalışmada antraks basilleri 60°C. de 20 dakikada tamamen canlılıklarını kaybetmişlerdir. Büyük hacimdeki materyaller için de 30 dakikanın kâfi geleceği kanaatı uyanmıştır.

İki misli gliserin ilâve edilmiş canlı sporlu konsantre anthrax aşılarının içerisindeki basillerin öldürülmesi için en az 14 gün 20°C. de bırakılmasını Dünya Sağlık Teşkilâtının Raporuna göre Hulse ve arkadaşları (4) tavsiye etmekte ve Avcıl ve Emre (2) Türkiye'de hazırlanan Max - Sterne anthrax aşısı istihsalinde de konsantre aşılardan 2 - 3 hafta bekletilmesini bildirmektedirler. Biz de yaptığımız denemede buz dolabında (+4°C. de) saklanan %50 gliserinli ortamlarda; 14. üncü günde ekseri basillerin canlılıklarını kaybettiklerini, 18 ci günde ancak bütün vegetatif antraks basillerinin üreme kabiliyetlerini kaybettiklerini tesbit ettik. Oda derecesinde ise 10 uncu günde birkaç Pasteur II suşu basilleri hariç diğerlerinin canlılıklarını kaybettiklerini gördük. Bu durumda oda derecesinde (18 - 22°C. de) bekletilen konsantre aşılardaki basillerin tahribi için

14 günün kâfi geleceği fakat buz dolabında (+4°C. de) bekletilenlerin ise en az 18 gün saklanması icab edeceği kanaatine vardık.

Deneme sonuçlarına göre vegetatif formların temizlenmesi için minimal sürenin açıklığa kavuşması sağlanmış bulunmaktadır. Aşı hazırlanacak konsantre süspansiyonların en az tesbit ettiğimiz süreyle işleme tabi tutulması gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

### Ö Z E T

B. anthracis'in avirulan kapsülsüz, avirulan kapsülsüz proteolitik olmayan, attenuue ve hiç sporlanmayan suşlarının vegetatif şekillerine ısının ve gliserinin etkileri üzerinde çalışılmıştır.

1 — Vegetatif antraks basilleri 55°C. lik su banyosunda ısıya maruz bırakmakla 30 dakikada tamamen tahrip olmuşlardır.

2 — Basiller 60°C. lik su banyosunda 20 dakika ısıya maruz bırakmakla tamamen tahrip olmuşlardır.

3 — %50 gliserinli ortamdaki basiller +4°C. de 18 gün saklanmakla tamamen canlılıklarını kaybetmişlerdir.

4 — %50 gliserinli ortamdaki basiller 18 - 22°C. de 10 - 14 gün bırakılmakla tamamen canlılıklarını kaybetmişlerdir.

Konsantre aşuların içerisindeki vegetatif antraks basillerinin tahrip edilmesi için 60°C. de 30 dakika ısıya tabi tutmak veya +4°C. de en az 18 gün, 18 - 22°C. de en az 14 gün bekletmek icabetmektedir.

### S U M M A R Y

(The effect of heat and glyserol on the vegetative form of B. anthracis.)

This study has been done on the effect of heat and glyserol on vegetative form of avirulent noncapsulated, avirulent noncapsulated and non - proteolytic, attenuated and nonsporulated strains of B. anthracis.

1 — All vegetative anthrax bacilli were destroyed in 30 minutes by exposure to heat in a water bath at 55°C.

2 — All bacilli were destroyed in 20 minutes by exposure to heat in a water bath at 60°C.



3 — The bacilli in a 50% glyserinized suspensions were all destroyed after storage at +4°C. for 18 days.

4 — The bacilli in a 50% glyserinized suspensions were all destroyed after storage at 18 - 22°C. for 10 - 14 days.

It is necessary that the vegetative anthrax bacilli in concentrated vaccine are destroyed on heating at 60°C. in 30 minutes, or at +4°C. in 18 days or at 18 - 22°C. in 14 days.

#### L I T E R A T Ü R

- 1 — Ando, K. (1965) : Japonya'da National Institute of Animal Health laboratuvarında özel görüşme.
- 2 — Avcı, F. ve Emre, M.N. (1964) : Türkiye'de hazırlanan Max-Sterne anthrax aşısı. - Etilik Vet. Bak. Enst. Der. 2, sayı 3-4, 239-246.
- 3 — Aygün, S. T. (1947-1948) : Antraks, Bulaşık ve Salgın Hastalıklar Bilimi, ders kitabı, - Sümer Matbaası, Ankara IV-Bölüm, 4-34.
- 4 — Hulse, E. C., Sterne, M., Evans, D. G., Cohen, H. H., Abdussalam, M., Outschoorn, A. S. and Uri, J. (1937) : Requirements for anthrax spore vaccine. - Wld. Hlth. Org. Techn. Rep. Ser. 361, 31-40.
- 5 — Merchant, I. A. and Packer, R. A. (1966) : Veterinary Bacteriology and Virology. - 6th edition, Iowa State University Press., USA., 477-491.
- 6 — Smith, D. T. and Martin, D. S. (1948) : Bacillus anthracis and anthrax in Zinsser's Textbook of Bacteriology. - Appleton and Company., New York, Chapter XL, 548-553.
- 7 — Stein, C. D., and Rogers, H. (1945) : Observations on the resistance of anthrax spores to heat. - Vet. Med., XL, 12, 406-410.
- 8 — Sterne, M. (1959) : Anthrax in Infectious Disease of Animals, Diseases due to Bacteria, by Stableforth, A. W. and Galloway, I. A. - Butterworths Scientific Publications, London, 1, 16-52.
- 9 — Wilson, G. S. and Miles, A. A. (1955) : Bacillus in Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. 4 th. Edition, - Edward Arnold Ltd., London, 1, 952-964.