

**PROTEOLİTİK OLMAYAN, AVİRULAN BACİLLUS ANTHRACİS  
MUTANTLARININ İZOLASYONU VE KOBAYLARDA  
MUKAYESELİ BAĞIŞIKLIK DENEMESİ İLE BU  
MUTANTLARDAN CANLI AŞI HAZIRLANMASI (\*)**

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

Şükran DURUKAN (\*\*\*)

**GİRİŞ**

Diğer bakterilerde olduğu gibi Bacillus anthracis'inde özel karakterlerini taşıyan virulan tiplerden oldukça değişik olan variantları kendiliğinden veya sun'i olarak elde edilmektedir. Sterne (57) e göre bu değişmeler irsi olmakla beraber bakteride veya kolonilerinde yeni varyasyon veya mutasyonlar kendi kendilerine husule gelmeyebilir. Örneğin, kapsülsüz Bac. anthracis suşlarının serumlu agarda CO<sub>2</sub> atmosferi altında üretilmesiyle kapsüllü şekle çevrilmesi genotiplerde bir değişme neticesi değildir. Böylece bu bir mutasyon sayılmaz.

Pasteur ve arkadaşları (37) Bac. anthracis'in 42 C°. de 2 hafta veya daha fazla müddet üretilmesiyle virulansını kaybeden variant suşlar elde ettiler ve bunların karakterlerinin daimi ve değiştirilemez olduğunu gösterdiler Bu yolla attenué edilmiş suşlar, (R) virulan tiplerden morfolojik olarak farklı olup, kolonileri daha küçük ve parlaktır. Kolonilerin görünüşündeki farklılık virulansın kaybı ile ilgili olup adi vasatlarda (R) kolonileri virulan tiplerde, (S) kolonileri ise attenué suşlarda görülür. Bu variantlar ekseriya uygun şartlar altında uzun zincirli üreme kabiliyetlerini

(\*) Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumunun VHAG - 44 No : lu projesine göre ve Kurumun desteği ile yapılmıştır.

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

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

kaybederken, kapsül teşkil etme kabiliyetlerini kazanırlar. Virulansın tamamen kalktığı hallerde dahi kapsül teşkil edebilirler. «Pasteur tipi» suşlar böyle kapsüllü attenue varianlar olup, orta derecede virulansa sahiptirler, (kobaylar için patojen, tavşanda patojen değildir.) ve aşağı yukarı 90 senedir anthrax'a karşı bağışıklıkta kullanılmaktadırlar.

Bazı değişik tipteki variantlar ya yüksek derecelerde üretmekle veya vasata antiseptiklerin katılmasıyla elde edilebilir. Böylece (S) ve mükoid tip koloniler bazan müşahede edilir. Diğer bakterilerin aksine taze izole edilmiş virulan Bac. anthracisler kültürlerde R kolonileri hasil ederler. Bir çok araştırmacılar değişik üretim metodları ile bu R virulan anthrax suşlarından S kolonisini havi variantları elde etmişlerdir. Nungester (33) koloni bünyesindeki düzgünlüğün artmasının yani S formuna dönmesinin virulansın kaybolmasıyla beraber seyrettiğini göstermiştir. Sterne (53) e göre yeni anthrax vak'alarından izole edilmiş virulan kültürler her ne kadar R kolonilerine sahipse 42 C°. deki bir üretilme ile virulans kısmen görülsede koloni manzarası S olabilecektir. Orijinal R kolonileri attenue muameleleri ile değiştirilebilir ve R kolonileri arasında S kolonileri hasil olur. Böylece R kolonileri S tipine doğru bir dönüşme gösterir. Bir çok araştırmacı aynı petrideki düz ve dalgalı kolonilerin virulansları arasında belirli bir fark olmadığını bildirmişlersede R kolonilerinin S den daha virulan olduğu tesbit edilmiştir. Stamatın ve Stamatın (49) daha önceki çalışmalarında defibrine at kanını ihtiva eden kültürlerde virulan anthrax basillerinden düz mükoid tabiatta koloniler elde etmişler ve bunlardan pasajlarla virulans ve kapsülden yoksun R variantları elde etmişlerdir. Bu variant suşların farelerde anthrax infeksiyonu husule getirmeksizin ödem yaparak ölüme sebebiyet verdiğini ve tavşanlar için zararsız olduğunu tesbit ettiler. Daha önceki bir çok araştırmacılara göre anthrax'a karşı bağışıklıkta kapsülün önemli rolü olduğu belirtilirken Stamatın'ın yapmış olduğu tecrübe ve kapsülsüz variantlarla tavşanları bağışık kılmaları dolayısıyla kapsülün bağışıklık üzerinde hiç bir etkisinin bulunmadığı ortaya konulmuştur. Yine Stamatın (50) kapsülsüz variantlarla koyunları deri altı yolla aşılama suretiyle anthrax'a karşı bağışık kılmayı başarmışlardır. Schaefer (44) adi vasatlarda attenue suşların S parlak koloniler şeklinde üremesine rağmen virulan suşların R kolonisi şeklinde ürediğini, koagüle serum üzerine eki-



ien bütün virulan ve attenuue suşların parlak S kolonileri gösterdiklerini bildirmişler, fakat sonraki çalışmasında Schaefer (45) bu S kolonileri arasında R kolonilerinde mevcut olduğunu müşahede etmiştir. Serumlu agar üzerinde yapılan müteatdit pasajlarla kapsülsüz variantlar elde etmeyi başarmışlardır ki bu variantların bir kısmı S, bir kısmında R kolonilerini havidir. Her iki kapsülsüz R ve S suşları ile fare ve kobaylar üzerinde yapmış oldukları denemelerde R kolonilerinin çok az veya tamamen avirulan olduğunu, buna mükabil kapsülsüz S variantlarının az nisbette virulans gösterdiğini tesbit etmiştir.

Nungester (33) % 20 CO<sub>2</sub> atmosferi altında üretilen Bac. anthracis düz, mükoid suşlarının oldukça muntazam mükoid koloniler hasil ettiğini tesbit ettilerki bu durum yüksek CO<sub>2</sub> ve düşük oksijenin bulunmasının kapsül formasyonu-nu teşvik ettiğine işaret eder. Sterne (53) virulan anthrax suşlarının yüksek CO<sub>2</sub> atmosferi altında serumlu agarda daima düz, mükoid (S) ve tam manasiyle kapsüllü olacağını ve mükoid üremelerin devamlı pasajla R variantları husule getireceğini ve yüksek CO<sub>2</sub> atmosferinin sporlasyonu önleyeceğini bildirdi. Sterne (53) besleyici agarlar üzerine ekilen virulan anthrax suşlarının takriben 6 hafta üretilmesinden sonra bir kaç S, yuvarlak kolonileri gördü ve bu kolonilerin bir kaç pasajdan sonra tamamen tipik S mükoid kolonileri halini aldığı tesbit etti. Serumlu vasatlarda 24 saatlik inkübasyondan sonra bu düz mükoid kolonilerin dalgalı harici üremelerini göreyerek ayırdı ve pasajlarına devam etti. Bu harici üreyen dalgalı uzantıların tekrar ekimlerinde ana mükoid kolonilerden daha yavaş üreyen uzantılar tesbit etti. Bunlarıda tekrar pasajla karışık S kolonilerinden tamamen ayırdı. Bu variantlar CO<sub>2</sub> atmosferi altında üretilmekle tamamen R kolonileri halini alıp boyandıklarında kapsül göstermediler. Bu R kolonilerinin ana S kolonilerinden daha az virulan olduğunu ve hatta bazılarının virulansını tamamen kaybettiklerini ve düzgünlüğün ve virulansın kaybının gerek invivo ve gerekse invitro kapsül hasil etme kabiliyetini kaybetmesiyle müşterek olduğunu tesbit etti. Bu avirulan R varianlarının kobay ve koyunlarda yüksek nisbette bağışıklık hasil ettiklerini tesbit etti. Brown (2) genotip olarak kapsülsüz avirulan anthrax suşlarından kapsül hasil etmesine muktedir olamamış, keza Sterne ve Proom (56) genotipik olarak kapsülsüz bir Bac. anthracis'in kapsüllü şekle geçmesinin mümkün olmadığını bildirmişlerdir.



Wilson ve Miles (63) bir çok araştırıcılar tarafından spor teşkil etmeyen variantların bulunduğunu, virulansla kapsül formasyonu arasında sıkı bir ilđinin mevcut olduğunu, buna mukabil spor teşkili ile virulans arasında hiç bir ilđinin mevcut olmadığını işaret etmektedirler.

Her ne kadar Bac. anthracis'in virulan tipleri hareketsiz isede bazı araştırıcılar hareketli variantların mevcut olduğunu zikretmişlerdir. Tomcsik (59) daha önce hareketli zannettikleri Bac. anthracis'ler üzerinde yapmış oldukları araştırmalarda bunların Bac. Subtilis olduklarını ve kùltürlerin Bac. subtilisle karışık olmasından dolayı hareketli zannettiklerini bildirmişlerdir. Tomcsik (60) fareler için virulan anthrax suşu kùltürlerinde Bac. anthracis'e oldukca benzeyen kapsüllü, hareketli organizimler tesbit etmişler ve bunun bir anthrax mutanı olduğunu düşünmişlerse de, daha sonra yapmış oldukları çalışmada Guex - Holzer ve Tomcsik (17) bunun Bac. megaterium olduğuna kanaat getirmişlerdir. Brown ve arkadaşları (9) lizojenik Bac. anthracis'in bir virulan suşunu bakteriofaj'a maruz bıraktılar ve bu bakteriofajla muamele görmüş olanlardan biyosimik ve patolojik olarak Bac. anthracis'den ayrılmayan muntazam hareketli variantlar hasil eden 9 suş elde ettiklerini bildirmişlerdir. Sterne ve Proom (56) a göre Brown ve arkadaşları iyice kontrol altına almaksızın hatalı olarak bu yazıyı neşretmiş olduklarını ve anthraxın idantifikasyonunda hareketsizliğin başlıca bir rol oynadığını, bu sebeple hareketli suşların bulunup bulunmadığını iyice araştırmak icap ettiğini ve çalışmaları esnasında her ne zaman anthrax kùltürlerinde hareketli organizmlere rastladıklarında, bunun anthrax benzeri organizimlerin kontaminasyonu neticesi olduğunu ve bunları her def'asında idantifiye ettiklerini bildirmişlerdir. Böylece hareketli anthrax variantlarının olup olmadığı tam manasiyle tesbit edilememiştir.

Ando ve arkadaşları (3) ml. inde 20 Ünite penicillin ihtiva eden vasatta Bac. anthracis'leri üretmek suretiyle 75 pasajdan sonra kapsülü kaybolan variant suşlar elde etmişler ve bu attenué suşlarla tecrübevi olarak kobay, tavşan ve keçilerde bağışıklık elde etmişlerdir. Fakat kuvvetli bağışıklık elde edilebilmesi için spor süspansiyonlarına az bir miktar saponin ilâve etmenin lüzumlu olduğunu bildirmişlerdir. Zhekov (67) besleyici agara 1/40,000 nisbetinde rivanol ilâve etmek suretiyle 287 pasajla virulansı aza-



lan Bac. anthracis variantları elde etmişler fakat bu variantların bağışıklık hasıl etme nisbetinin azaldığını tesbit ederek, bu yolla elde edilen variantların aşı istihali için elverişsiz olduğunu bildirmiştir.

Burrows ve arkadaşları (10) Bac. anthracis'leri yüksek derecelerde üretmekle veya vasata antiseptik dilisyonları katılmak suretiyle bazı değişik tipte variantlar elde edilebileceğini ve aynı zamanda gerek spor doğuran ve gerekse spor doğurmayan avirulan suşlarla bazı hallerde virulans husule getirilebileceği, anthrax basilinin virulansının kapsüldeki glutamin polipeptid husulüne bağlı olduğunu, R variantlarını taşıyan avirulan suşların kapsülsüz olduğunu ve bu suşların toksin doğurmadıklarını bildirmişlerdir.

Wilson ve Miles (63) ultraviole ve X irradiasyonuna bakterileri maruz bırakmakla bunların ölebilecekleri gibi mutasyon nisbetinde artacağını işaret etmişlerdir. Lederberg (27) ultraviole ışınlarına maruz bırakmakla laktozu fermente etmeyen Bacterium coli mutantlarını elde etmişlerdir. Kelner (22) ve Roberts ve Aldous (43) ultraviole ışınlarına maruz bırakmakla bir çok organizmlerin inaktive edilerek mutantlar husule getirebileceğini, irradiasyondan sonra eğer bu süspansiyonlar saklanacak olursa bazı ultraviole maruz bırakılmış hücrelerin eski haline dönebildiğini, bu dönüşün umumiyetle az olduğunu fakat dönüşmeye ışığın etkisi olduğunu tecrübelerle tesbit etmişlerdir. Kelner (23) ultraviole maruz bırakılmadan sonra karanlıkta buyyonda 37 C°. de üretilen E. coli suşlarının fotoreaktif kabiliyetlerinde inkübasyon zamanına göre muntazaman azaldığı ve 2-3 saatten sonra sifıra düştüğünü tesbit etmişlerdir. Fotoreaktif E. coli mutantlarını ultraviole irradiasyonuna maruz bıraktıktan sonra reaktif ışık bir kaç dakika tesirle fenotip olarak karakterize mutantların frekansını azaltır, fakat uzun zaman inkübasyondan sonra fenotip olarak karakterize mutantlar ya etkisiz kalır veya eski haline dönüşür. Newcombe ve Whitehead (32) ultraviole ışınlarına maruz bırakıldıklarında, ultraviolenin dalga uzunluğuna bağlı olarak canlı hücrelerin nücleic asitleri tarafından absorbe olan ışınlar neticesi bazılarının öldüğü ve bazılarının da mutantlara sebep olduğunu, ultraviole ile hücrelerin içinde bir photosensitive ve bir photostable mutagen zehirlenme şekillendiğine inandıklarını belirttiler.



Stanier ve arkadaşları (52) bütün canlı hücrelerin özellikleri gen kontrolüne bağlı olup, bir özellikteki değişimin gen mutasyonları neticesi olduğunu, ve bazı durumlarda yüksek nisbetlerde mutasyon husule gelebileceğini, ayırma metodları kullanmaksızın tefrik etmenin mümkün olacağını işaret etmektedirler. Yine aynı araştırmacılar penicillin ve streptomycin gibi antibiotiklere, bakteriofaja, ultraviole ışınlarına dirençlik gösterenlerle, karbona ihtiyaç gösteren, şekerleri fermente etmeyen, virulansları artan, flajella antijenleri değişen, pigment yapan ve koloni morfolojisinde değişiklik husule getirenler gibi mutant nev'ilerinden ve bunları ayırma metodlarından bahsetmektedirler.

Anthraxa karşı aktif bağışıklık meydana getirmek için ilk olarak Pasteur (37) pratik, nisbeten emin ve tesirli bir aşı hazırladı 42 - 43 C°. de uzun bir inkübasyondan sonra elde ettikleri 2 suş zamanında buyyonda üretilerek aşı hazırlanmasında kullanılmaktaydı. Wilson ve Miles (63) in bildirdiklerine göre bunlardan Pasteur I fareler ve bazan yavru kobaylar için patojen olup, gelişmiş kobay ve tavşanlar için patojen değildir. Bu suşla hazırlanan aşı ile aşılanan hayvanlarda zayıf bir bağışıklık hasıl olur. Bu aşından 10 - 12 gün sonra fare ve kobaylar için patojen fakat tavşanlar için patojen olmayan, daha kuvvetli antijenik karektere sahip attenué Pasteur II suşu ile hazırlanmış aşılar tatbik edilir. Bu aşılar ancak kat'i olarak anthrax infeksiyonu tesbit edilen çiftliklerdeki hayvanlara tatbik edilir. Personeus ve arkadaşlarına (38) göre bu aşından alınan neticeler hernekadar memnuniyet verici isede, aşının bazı ciddi aksi tesirleri vardır. Avirulan mutant suşların aksine hayvanların beden derecelerinde artma husule getirir. Besredka (7) Pasteur aşılarının intradermal olarak tatbikinden sonra kuvvetli bağışıklık verdiğini bildirmektedir.

Mazucchi (31) hafif attenué veya virulan anthrax suşlarıyla hazırlanan aşılara % 2 - 5 nisbetinde saponin ilâve etmek suretiyle bağışıklık kudreti yüksek ve emin bir aşı elde edilebileceğini zikretmişse de bu nisbettteki saponinlerin generalize anthraxı önlemesine rağmen inokülasyon bölgesinde yangısal ve nekrotik bir reaksiyon husule getirebileceği aşıkârdır. Mamafih Mazucchi'nin «Carbozoo» aşısı attenué suşlardan hazırlanmış olup iyi bir bağışıklık vermesine rağmen saponinden mütevellit beklenmiyen reaksiyonlar husule gelmiştir.



Yurdumuzda anthrax aşılarının ilk tatbiki Çizmen (11) e göre 1910 senesinde başlar. Bu zamanda aşilar Enstitü Pasteur'den getirilmiş ve yurdumuzda tatbikine başlanılmış olup uzun zaman kullanılmıştır. Aygün (5) bildirdiğine göre anthraxlı hayvanları kurtarmak üzere 1923 yılında anti anthrax serumu istihsaline ve tatbikatına başlanılmıştır. Aygün tarafından elde edilen Türk Universal anthrax aşısı 1928 yılında tecrübevi olarak bazı Ordu hayvanlarında deri içi tatbik edilmek suretiyle kullanılmış ve iyi netice alınması üzerine 1929 yılından itibaren geniş bir şekilde kullanılmaya başlanılmıştır. Bu sporlu aşının 5 ay bağışıklık verdiği ve gebelere tatbik edildiği zaman sıkıt husule getirmediği, aşılı hayvanların anthrax mikrobunu yaymadıklarını tesbit etmiştir. Türkay (61) gliserinli T.Ü.A. aşısının hazırlanmasından ve hazırlanan aşının tecrübe hayvanlarında yapılan bağışıklık ve zararsızlık kontrollerinden bahsetmekte ve istihsal metodlarını geliştirmekte olduklarını kaydetmektedir. Çizmen (11) yapmış olduğu denemelerde T.Ü.A. anthrax aşısının, Pasteur I, Pasteur II, Carbozoo ve İlhami Özcebe aşılara nazaran daha az zararlı olduğunu ve bu aşılarından daha erken bağışıklığın husule geldiğini, fakat bağışıklık müddetinin Carbozoo ve Pasteur aşıları gibi aynı karakterde olduğunu kaydetmektedir. Özcebe (34) virulan bir suşu kollodiyon keselerine koyarak tavşanların peritonuna vermek suretiyle muhtelif pasajlardan sonra attenué bir suş elde ettiğini ve bu suşla hazırladığı sporsuz hipertonic ve gliserinli aşıların morfolojik ve biyosimik bütün evsafı ile Pasteur aşılarına paralel olduğu ve virusiyet derecelerinin sabit olup tatbikatlarında contra indikelelerinin bulunmadığını, tavşan ve keçiler üzerinde yapmış olduğu denemelerde bağışıklığın kat'i ve uzun olduğunu bildirmektedir. Özcebe (35) Ramon Staub vasatı A.G. içerisinde deri altı tatbik edilen bir aşı hazırladığı ve bu aşının diğer aşılar gibi infeksiyon tehlikesini tahdit etmekle beraber, bağışıklık derecesinin nisbi olduğunu ifade etmiş ve beyaz fındık farelerini öldürebilecek kudrette bir suşun adı Jeloz vasatlarında CO<sub>2</sub> atmosferi altında 48 saat üretilen kültürlerinin distile su ile toplanmasını ve ml. inde 50.000,000 spor ihtiva edecek şekilde sulandırıldıktan sonra % 50 Aluminium Hydroksit ilâve edilmek suretiyle hazırladığı ve 0,5 ml. kullanmak suretiyle aşılananların 6 ay bağışıklık verdiklerini tesbit etmiştir. Özcebe'nin birinci aşısı saha tatbikatına konulmuş telafata sebebiyet verdiği için kullanılmamıştır. 2. ci aşı ise prati-



ğe intikal etmemiştir. Aktan (2) Max - Sterne aşısı ile kapsüllü anthrax suşlarının Özcebe tekniği ile hazırladıkları aluminium hidroksitli anthrax aşısı ve aluminium hidroksit yerine % 1,5 Jeloz ilâvesi ile hazırladıkları aşıları 10 ar tavşan üzerinde mukayeseli bağışıklık testine tabi tutmuş ve kapsüllü anthrax suşları ile hazırladığı aşıları Max - Sterne aşısına nazaran yüksek kudrette bir bağışıklık meydana getirdiğini, Jeloz mediumu içerisinde bağışıklık kudretinden bir şey kaybetmediğini bildirmiştir.

Sterne (54) Güney Afrikada avirulan kapsülsüz suşla hazırladığı aşıdan çok memnuniyet verici netice aldığını ve bu aşının her nev'i hayvanda emin bir şekilde kullanılabileceğini bildirmiştir. Sterne ve arkadaşları (55) aşıya saponin katmak suretiyle geniş bir çalışma yapmışlar ve saponinin önemini belirtmişlerdir. Sterne (57) saponinli aşılarda inokülasyon yerinde çok hafif lokal bir ödeme sebebiyet verdiğini ve bu lokal ödemde Basillerin çoğalmasından dolayı saponin'in faydalı bir iş gördüğünü işaret etmekte ve % 0,1 gibi düşük bir konsantrasyonda saponin'in hafif bir reaksiyon husule getirmesiyle bağışıklık kudretinde bir artma meydana geleceğini işaret etmektedir. Richou ve arkadaşları (42) saponin'in adjuvan rolünün gerek hemolitik ve gerekse yangısal etkisine oranlı olmadığını, saponin'in hemolitik etkisinin tavşan serumu veya kollesterolla tam manasiyle nötralize edilebileceğini, fakat adjuvan etkisinin baki kalacağını bildirmektedirler.

Avirulan, kapsülsüz Sterne (34 F<sub>2</sub>) suşuyla, Sterne'in tarif ettiği gibi bütün hayvanlar için dozda 20 milyon spor bulunacak şekilde hazırlanan Max - Sterne anthrax aşısı 1953 yılından itibaren yurdumuzda tatbikata konulmuştur. Bağışıklık kudreti yüksek olan bu aşıdan oldukça memnuniyet verici neticeler alınmasına rağmen, bazı hassas hayvanlarda yaygın ödemler husule getirmiştir. Bu şekilde husule gelen arızaları azaltmak maksadiyle Avcıl ve Emre (4) aşısı konsantrasyonu ve dozdaki spor miktarları üzerinde bazı modifikasyonlar yaparak yeni istihsal metodu Tarım Bakanlığına sunulmuş, bu yeni metodla hazırlanan aşılarda Sağlık Müşavere kurulunun kararı ile 1964 yılında tatbikata konulmuştur. Max - Sterne (34 F<sub>2</sub>) suşu ile hazırlanan büyük başlar için dozda 10 milyon, küçük baş hayvanlar içinde dozda 5 milyon spor ihtiva eden bu aşının en az bir sene bağışıklık verdiği ve aşılardan 4 gün sonra bağışıklığın başladığı tesbit edilmiştir.



Harris - Smith ve arkadaşları (18) bir virulan suşta olduğu gibi avirulan Sterne suşu'nun da aynı derecede toxin hasil ettiklerini ve bu sebeple bu suşun canlı sporları ile aşılaman hayvanlarda kuvvetli bir bağışıklığın hasil olacağını işaret etmektedirler. Spears ve Davidson (48) yaptıkları tecrübelerle bu aşı ile aşılaman koyunlarda bağışıklığın bir haftadan daha kısa bir zamanda husule geldiği ve 14 ay devam ettiğini tesbit etmişlerdir. Personeus ve arkadaşları (38) kapsülsüz variantlarla hazırlanan sporlu aşılaman koyunlarda kuvvetli bağışıklık verdiklerini ve saha tatbikatında kullanılan aşı dozunun 50-500 mislinin keçi ve koyunlara verilmesiyle zararsız olduğunu tesbit etmişlerdir. Van - Ness ve arkadaşları (62) na göre, Sterne aşısı ile aşılaman hayvanlarda 8 gün sonra kuvvetli bir bağışıklığın husule geldiğini işaret etmekte ise de, Lindley (30) Sterne aşısı ile oldukça memnuniyet verici netice alınmasına rağmen, aşılaman 21 gün sonra dahi bazı hayvanların anthrax'tan öldüklerini buna mukabil intradermal olarak tatbik ettikleri Pasteur tipi aşılardan daha iyi bağışıklık aldığını ifade etmiştir. Grosso ve Perez (16) Avirulan Sterne suşu'nun Trip-sinaz kazein ve Yeast extractlı vasatlarda yapılan pasajlarında bağışıklık değerinden az çok kaybedeceğini, peptonlu agarlardaki pasajlarda ise immunogenitesini minimal nisbette kaybedeceğini, % 50 glyserinli, % 1,8 saponin ihtiva eden aşılaman soğukta saklanmakla 2,5 seneden fazla yüksek bağışıklık kudretini muhafaza ettiğini, aluminium hidroksitli aşılaman ise saklanmakla bağışıklık kudretinden kaybettiğini bildirmektedirler. Bir çok memleketlerde Sterne suşu ile hazırlanan sporlu aşılaman tatbikattadır.

Lincoln ve arkadaşları (27) nın bildirdiklerine göre Rusya'da STİ ve (Sh) - 15 suşları ile hazırlanan sporlu aşılaman geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Kolesov ve Mikhailov (25) Bac. anthracis'in düşük virulanslı ve iyi bir bağışıklık verici kudrette olan Sh - 15 suşunu buldular, spor teşkili % 25-50 bezelye ekstraktı ve % 0,1 agar ihtiva eden buyyonda en iyi olduğunu ve aluminium hidroksit ile % 20 gliserinli, ml. inde 47,000,000 spor ihtiva eden bir aşı hazırladıklarını, bu aşılaman koyun ve keçiler için zararsız olduğunu ve bağışıklığın inokülasyondan 7 gün sonra başlayıp ve 6,5 ay devam ettiğini bildirmektedirler. Yine kolesov ve arkadaşları (26) Sh - 15 suşu ile hazırlanan aluminium hidroksitli aşı ile 1954-1955 yılları arasında 2,785,533 baş hayvan aşılamışlar,



yalnız 9 hayvanın bağışıklık kazanamadığından anthrax'tan öldüğünü tesbit etmişlerdir.

Sokol (47) Bac. anthracis'in kapsülsüz bir variant suşundan aluminium hidroksitli bir aşı hazırlamışlar, bu aşının koyun ve keçilerde bağışıklık husule getirdiğini, yalnız enjeksiyon mahallinde lokal bir ödeme sebebiyet verdiğini işaret etmektedir. Szent-İvanyi (58) aluminium hidroksite adsorbe edilmiş kapsülsüz Bac. anthracis'in 10 milyon sporunu ihtiva eden aşının 2 ml. i ile inokülasyondan sonra koyunların 6,5 ay bağışık kaldıklarını tesbit etmiştir.

Jacotot ve Virat (20) formolle öldürülmüş kapsüllü anthrax basillerinin tavşanlarda bağışıklık husule getirmediğini fakat formollü kapsülsüz basillerin çok az bağışıklık verdiklerini, bu öldürülmüş basillere 8 kısım parafin likit ve 1 kısım mannide monooleate adjuvanı ilâvesiyle yapılan aşılarından kapsüllü basillerle aşılananların 26 da 10 u, kapsülsüz basillerle aşılananların ise 31 de 21 i eprüveye dirençlik gösterdiğini tesbit etmişlerdir. Jacotot ve Virat (21) kapsülsüz anthrax basillerini formolle öldürme ve likit parafin karıştırmak suretiyle hazırladıkları aşı ile tavşan, koyun ve keçiye bağışıklık elde ettiğini ve likit parafinde olduğu gibi zeytinyağı, arlecol karışımının da bağışıklıkta önemli rol oynadığını belirttiler.

Ertürk ve Beşe (13) anthrax ve yanıkara aşılarını bir sırın-gada karıştırmak suretiyle yaptıkları aşılamalarda koyun, keçi, dana, kobay ve tavşanlarda bu kombine aşıdan ayrı ayrı aşılananlar kadar bağışıklık aldıklarını bildirmişlerdir. Pankratov ve arkadaşları (36), Pilipenko ve Mirashnichenko (39) anthrax aşılarının diğer bazı hastalıklara karşı kullanılan aşılarla beraber kombine aşı şeklinde inoküle edildiği zaman anthrax'a karşı bağışıklığın iyi teşekkül etmediğini bildirmektedirler.

Lee ve arkadaşları (38) anthrax aşılamalarını müteakip herhangi bir sebeple antibiotik ve sulfamidlerle tedavi gören veya gıdalariyle beraber antibiotik verilen hayvanlarda bağışıklığın meydana gelmesinin önlendiğini işaret etmektedirler.

Kültür filtratları antijenleri ile bağışıklık için ilk adım Gladstone (15) tarafından atılmıştır. Çeşitli hayvanların serum ve plazmalarında üreyen Bac. anthracis kültür filtratlarından elde edilen



bu antijenin inokülasyonundan sonra tavşan, koyun ve maymunları 100 letal doza dahi korumuştur. Gladstone Bac. anthracis'in Sterne suşunu kullanarak yaptığı çalışmada in vitro olarak inkübasyon müddetinin 18 saatten fazla uzatılmasıyla koruyucu antijenin daima az çok kaybolduğunu tesbit etmiş ve böyle bir tahribin in vivo olarakta husule gelebileceğini belirtmiştir.

Wright ve arkadaşları (64) ultraviole ışınlarına maruz bırakılan Bac. anthracis'in Vollum suşundan proteolitik olmayan mutant suşları elde ettiklerini ve bu mutant suşların tavşan ve fareler için virulan olduğu pasajlardan sonrada bu proteolitik olmayan karakterlerinin sabit olduğunu işaret etmekte bu mutantlardan da uygun şartlar altında üretilmekle elde etmiş oldukları koruyucu antijenleri ve esas suştan daha uzun bir inkübasyon devresinde dahi koruyucu antijenin tahrip olmadığını tesbit etmişlerdir. Wright ve arkadaşları (65) kültür filtratlarını alumino-potassium veya alums ile presipite etmek suretiyle pürifiye anthrax antijeni elde etmişler ve bunların tavşan, kobay ve Rhesus maymunlarında bağışıklık verdiklerini bulmuşlarsada, Schlingman ve arkadaşları (46) bu antijeni sığırlara tatbik etmişler, bağışıklığın 3 ay sonra kaybolduğunu tesbit etmişlerdir. Belton ve Strange (6) hidrolize kazein ihtiva eden modifiye vasatta bir antijenin gelişimini bildirdiler. Puziss ve Rittenberg (40) bu antijenin diğer antijenlere nazaran daha yüksek bağışıklık kudretinde olduğunu tesbit ettiler. Puziss ve Wright (41) İnsanları bağışık kılmak için hazırlanan koruyucu antijenlerin gelde % 0,041 aluminium oksit bulunacak şekilde dilüe edildiği zaman adsorbe edici olacağını ve en az % 0,031 aluminium oksit miktarının adsorbe edici olduğunu tesbit etmişlerdir.

De Armon ve arkadaşları (12) anthrax'a karşı bağışıklığa esas teşkil eden titreleri eprüvasyon suretiyle kobaylarda tayin etmek için bir bağışıklık index'i formülü tesbit etmişlerdir. Klein ve arkadaşları (24) kobay ve ratlarda anthrax'a karşı bağışıklık meydana getirdikten sonra bağışıklık index'i ve antikor titreleri üzerinde mukayeseli olarak çalışmışlardır. Agar gel diffusion testi ile elde ettikleri antikor titrelerini bağışıklık indexine göre çok değişik bulmuşlar ve index'e nazaran nisbeten düşük seviyedeki koruma durumlarında agar gel diffusion testlerinin menfi çalıştığını tesbit etmişlerdir.



Wright ve arkadaşları (66) altı virulan anthrax suşundan kapsülsüz, avirulan ve proteolitik olmayan mutant suşlar elde etmişler fakat 599 vasatında yapılan seri pasajlarda bu suşlardan 2 sinin kapsülsüz ve proteolitik olmayan şekilden eski haline döndüklerini tesbit etmişlerdir. 599 vasatındaki demir sülfat konsantrasyonunun azaltılması ile L, alanine ve adenosine ilâvesiyle çok iyi üreme elde edileceğini ve anaerobik şartlar altında üretmeklede koruyucu antijen elde etmede 5 misli bir artmaya sebep olacağını bildirmişlerdir.

Burows ve arkadaşları (10) na göre bakteri hücrelerinden yoksun kültür filtratları ile hazırlanan antijenlerin, sıcağa dayanıksız ve bazı hallerde kendisinin de dayanıksız olduğunu, buna mukabil protein tabiatında oldukları için liyofilizasyonla prezerve edilebileceğini, veya alums tuzlarının solusyonları ile presipite edilebileceği gibi, absorpsion ve adsorpsion mahlüllerinin yıkamasıyla da pürifiye edilebileceğini işaret etmektedirler. Bu bağışık antijenlerin virulans için lüzumlu olan glutamil polipeptid kapsül maddeleriyle ilgisi bulunmadığından, kapsülsüz mutant suşlarda da istihsal edilebilir. Burada husule gelen bağışıklık toxinden ileri geldiği zannedilirse de, henüz tam manası ile ilgisi anlaşılamaştır. Aeurbach ve Wright (1), Boor (8) a göre hücrelerden yoksun koruyucu antijenlerin steril bir şekilde inokülasyonları ile etkili bir bağışıklık elde etmenin mümkün olmasına rağmen bazı metodların noksanlığından bu antijenlerin meydana getirdikleri bağışıklık derecelerinin tesbitinin zor olduğunu bahsetmektedirler.

Jackson ve arkadaşları (19) alum'la presipite etmek suretiyle elde ettikleri koruyucu antijen ile subcutan olarak iki injeksionla aşılana sığırlarda bağışıklığın birinci ayda başladığı, 3,5 ayda bağışıklık nisbetinin düştüğü ve 7 ci ayda tamamen kaybolduğunu, buna karşılık kapsülsüz, canlı sporlu aşılarda çok kuvvetli bağışıklık verdiklerini tesbit etmişlerdir. Stamatın (51) ödem yapıcı kapsülsüz Bac. anthracis suşlarından hazırlanan aşılarda yerini hiç bir zaman kültür filtratları ile elde edilen koruyucu antijenlerin alacağı düşünülmemekte olduğunu, çünkü bu koruyucu antijenlerin büyük mikyasta istihsalinin zor, sporlu aşılara nazaran pahalı olması ve bağışıklığının da orta derecede olduğunu bildirmiştir.

Fubra (14) Bac. anthracis'in Sterne suşunu 20 cm. mesafeden



45 dakika 30 Watt'lık bactericidal ultraviyole ışınlarına maruz bırakarak proteolitik olmayan bir mutant suş elde etti ve bu suşla, esas Sterne suşu ile hazırlanan aşuların mukayeseli olarak kobaylar üzerinde yaptığı bağışıklık testlerinden aldıkları neticeleri De Armon ve arkadaşlarının (12) bağışıklık index'i formülünü kullanarak yaptığı hesaplarla değerlendirmişler ve proteolitik olmayan mutantların Sterne suşuna nazaran 10 - 1000 misli kadar daha fazla bağışıklık kudretinde olduğunu tesbit etmişlerdir.

Anthrax aşısı yurdumuzda oldukça çok miktarda kullanılmaktadır. Halihazırda yurdumuzda kullanılmakta olan Max - Sterne anthrax aşısı bağışıklık yönünden uygun sonuçlar vermeye beraber gerek pahalıya mâl olması ve gerekse zaman zaman aşılamalardan sonra bazı koyun ve keçilerde az da olsa ödem husule getirmesi gibi aşının değerini düşüren mahzurları vardır. Daha kuvvetli bağışıklık kudretine sahip proteolitik olmayan mutant suşlarla elde edilecek aşuların daha ekonomik ve bol miktarda istihsal edilebileceği ve aynı zamanda proteolitik suşların husule getirdikleri arızalarında bertaraf edeceği düşünülerek bu çalışma ele alındı.

#### METERYAL VE METOD

Bac. anthracis'in Sterne (34 F<sub>2</sub>) suşu proteolitik olmayan mutant suşların izolasyonunda ve mukayeseli bağışıklık denemelerinde kullanıldı.

7.8.1967 tarihinde Polatlı ineekten izole edilmiş bir virulan anthrax suşu proteolitik olmayan muantların izolasyonunda, % 50 gliserinli Pasteur II spor süspansiyonu kobayların eprüvesinde ve virulan bir suştan yine % 50 gliserinli ortamlarda hazırlanmış spor süspansiyonunda koyunların eprüvesinde kullanıldı.

Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde yetiştirme 400 - 600 gr. ağırlığında 248 kobay bağışıklık kontrolü yapılmak üzere ve 24 kobayda zararsızlık kontrolü için kullanıldı. Anthrax'a karşı aşılanmamış yerlerden temin edilen 1-4 yaş arasında 40 baş akkaraman, 20 baş merinos ve 43 baş kıvırcık koyun bağışıklık denemelerinde ve 12 baş akkaraman koyun, 16 baş tiftik keçisi ile 8 baş kıl keçisi de zararsızlık kontrollerinde kullanıldı.



Çalışmalarımızda besleyici agar, Avcıl ve Emre (4) nin bildirdikleri üzere kazein digest vasatı ve proteolitik ve proteolitik olmayan kolonilerin tefriki içinde sütlü vasatlar kullanıldı.

**Sütlü Vasatın Hazırlanışı :** Taze süt steril bir kapta kaynatılıp derhal soğutulmuş kaynağından ayrıldı. Bu süttten % 10 nisbetinde eritilip 60 C°. ye soğutulmuş ve pH. sı 7,2 olan besleyici agar üzerine ilâve edildikten sonra indikatör olarak daha önce hazırlanmış steril % 0,2 Bromkresolpurpur solusyonundan % 2,5 nisbetinde ilâve edildi. İyice karıştırılıp takriben 10-11 ml. miktarında petrilere dökülerek donmaya terk edildi. Bir saat etüvde kurutulduktan sonra kullanıldı.

#### **Proteolitik olmayan mutant suşların izolasyonu :**

Gerek Sterne (34 F<sub>2</sub>) suşu ve gerekse polatlı virulan anthrax suşu yatık agarlarda 24 saat üretilmeden sonra temizlik kontrolü yapılarak steril % 0,5 bira mayası ekstraktı ile toplandı, ve bunlar kazein digest vasatlarını ihtiva eden Roux buatlarına ekilerek 3 gün 37 C°. lik etüvde üretildi. Her bir Roux buatına 20 ml. normal tuzlu su ilâve edilip kültürler toplandı ve spor sayımları yapıldı. Bu süspansiyonların ml. inde 10,000,000 spor bulunacak şekilde serum fizyolojikle sulandırıldı. Bu süspansiyondan 5 er ml. petrilere konularak 20 cm. mesafeden 30 dakika, 45 dakika, 60 dakika ve 30 cm. mesafeden 60 dakika 35 Watt'lık bactericidal ultraviole ışınlarına maruz bırakıldı. Her bir petriden toplanan solusyonların tekrar ayrı ayrı spor sayımları yapıldı, ve her birinden 0,1-0,3 er ml. sütlü vasatlara ekilerek 18-20 saat 37 C°. lik etüvde bırakıldıktan sonra proteolitik ve proteolitik olmayan koloniler tesbit edildi. Bu kolonilerin proteolitik olmayanları yine bir sütlü vasata tek koloni düşürülecek şekilde ekilerek numaralandı. 18 saat üretilmeden sonra tekrar proteolitik olan ve olmayanlar ayrılarak yeni numaralar verildi.

Bu şekilde elde edilen mutant suşlar gerek aerobik ve gerekse % 20 CO<sub>2</sub> li ortamlarda karakterini değiştirip değiştirmeyeceğini incelemek üzere besleyici agarları ihtiva eden petrilere ve yatık agarlara ekildi. 3 er gün yatık agarlar aerobik şartlarda, petrilere ise CO<sub>2</sub> li ortamlarda üretildikten sonra sütlü agarlara geçirildi, yine 18 saatlik inkübasyondan sonra proteolitik olmayan koloniler sayılarak % de nisbetleri tesbit edildi. Her bir mutant suşun ya-



tık agardan agara, % 20 CO<sub>2</sub> atmosferi altında üretilen petrilere ve sütli agardaki proteolitik olmayan kolonilerin yatık agar ve petrilere pasajları yapılarak yine 3 er gün üretilmek suretiyle pasajlarına devam edildi. % 30 dan daha az proteolitik olmayan karakterini kaybeden suşlar deneme dışı bırakıldı. 34F<sub>2</sub> suşundan izole edilen diğer mutant suşların 45 defa ve virulan suştan izole edilenlerin de 10 defa pasajları yapıldı.

% 100 proteolitik olmayan karakter taşıyan 29/1a mutant suşu ile orijinal 34F<sub>2</sub> suşunun mukayeseli olarak üreme ve sporlasyon durumunu tesbit için besleyici agar ihtiva eden Roux buatları ile kazein digest vasatlarını ihtiva eden Roux buatlarına mukayeseli olarak ekildi. 3 ve 5 günlük üreme esnasında 2 nci günden itibaren her gün buatların üst, orta ve alt kısımlarından alınmak suretiyle birer preparat hazırlandı. Bu preparatların metilen mavisi ile boyanmasından sonra mikroskop altında incelenerek sporlasyon yüzdeleri tesbit edildi. 3 ve 5 inci gün sonunda 35 ml. serum fizyolojikle toplanan Roux buatı mahsullerine % 50 gliserin katılmak suretiyle birer konsantre aşı hazırlandı ve bu konsantre aşular içerisindeki vegetatif basillerin tahrip olması için birer ay kadar buz dolabında bekletilmeden sonra iyice karıştırılıp 3 er defa spor sayımları yapılarak ml. lerindeki spor miktarları tesbit edildi.

Spor sayımları için metod : Bu maksatla spor sayımı yapılacak süspansiyonlar 15 dakika iyice karıştırıldı ve buradan 1 ml. alınarak 9 ml. serum fizyolojik üzerine katıldı. Pipetle çekilip bırakılmak suretiyle iyice karıştırıldıktan sonra tekrar pipet değiştirmek suretiyle buradan 1 ml. alınıp 2. ci 9 ml. serum fizyolojik üzerine katıldı. Yine aynı şekilde sulandırılmasına devam edilerek. 10<sup>-7</sup> ye kadar aynı işleme devam edildi. 10<sup>-7</sup> dilüsyonundan 1 er ml. 2 petriye konuldu, 10<sup>-6</sup> dilüsyonundan 0,3, 0,3 ve 0,4 miktarlarında konulduktan sonra üzerlerine eritilip 56 °C. ye soğutulmuş besleyici agardan takriben 15 er ml. kadar katıldı. İyice karıştırıldı. Donduktan sonra 37 °C. lik etüve bırakıldı. 24 ve 48 inci saatlerde koloniler sayılmak suretiyle süspansiyonların ml. lerindeki spor sayıları tesbit edildi.

Virulan Polatlı antrax suşundan izole edilen % 100 proteolitik olmayan 2, % 90-95 proteolitik olmayan karakter taşıyan 1 mutant suştan ml. lerinde 2500 spor ihtiva eden gliserinli süspansiyonları hazırlandı. Her bir süspansiyondan 2 şer kobaya 0,2 er ml.



deri altı inokule edilmek suretiyle virulan olup olmadıkları kontrol edildi. Ölen kobayların dalaklarından yapılan preparatların Giemza ve Methylen mavisi ile boyanmalarından sonra mikroskop altında kontrol edildi.

Ön bağışıklık denemesi için Sterne suşundan izole edilen % 100 proteolitik olmayan 29/la, % 95 proteolitik olmayan 25/2b ve % 40-60 proteolitik olmayan karakter gösteren 3 suşu 10 ar ml. serum fizyolojikle toplanarak % 50 gliserin ilâvesinden sonra 3-4 hafta buz dolabında saklandı. Her birinin 3 er defa spor sayımları yapılarak ml. lerindeki spor miktarları tesbit edildikten sonra  $2 \times 10^5$  ve  $2 \times 10^6$  spor ihtiva eden dilisyonları hazırlandı. Bu dilisyonlardan 4 er kobaya 1 er ml. deri altı inokule edildi. 21 gün sonra 100 MLD Pasteur II ile 4 şahit kobay da dahil olmak üzere eprüve edildiler. Eprüveden sonra 15 gün müşahede bırakıldılar. Bu arada ölen kobayların dalaklarından yapılan preparatlar Giemza ve Methylen mavisi ile boyanarak mikroskop altında incelendi ve anthrax müsbet olup olmadıkları tesbit edildi.

Esas kobaylarda bağışıklık denemeleri için mukayeseli olarak muhtelif zamanlarda 29/la ve 34F<sub>2</sub> suşlarının  $2 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$  ve  $1 \times 10^7$  sporları ile 4 denemede 10 ar kobay aşılandı, ve 21 gün sonra her denemede aşısız 10 şahit kobay da dahil olmak üzere 100 MLD Pasteur II ile deri altı eprüve edildiler. Eprüveden sonra kobaylar 15 gün müşahede altında bulunduruldu. Kobayların eprüveden kaç saat sonra öldükleri ve yukarıda bildirdiğimiz metotla anthrax müsbet olup olmadıkları tesbit edildi. Bu şekilde koruma nisbeti ile De Armon ve arkadaşları (12) nin bildirdikleri ve Fubra (14) nin kullandığı bağışıklık indeksi formülüne göre hesaplanarak bağışıklık indeks'leri tesbit edildi.

$$\dot{I} = 100/0,42 \times (t_1 - t_c) / (t_1 \times t_c)$$

$\dot{I}$  = İndek,  $t_1$  = bağışık hayvanların eprüvasyondan sonra saat olarak vasati ölüme kadar geçen müddet,  $t_c$  = Kontrol hayvanların eprüvasyondan sonra vasati saat olarak ölüme kadar geçen müddeti.

Kobaylarda zararsızlık kontrolü için mukayeseli olarak 29/la mutant suşu ile orijinal 34F<sub>2</sub> suşunun  $2 \times 10^8$  ve  $1 \times 10^8$  spor ihtiva eden süspansiyonları deri altı yolla ve  $1 \times 10^8$  süspansiyonları da adale içi 3 er kobaya zerk edildi. Bir ay müşahede altında bırakılan



kobaylarda her gün lokal bir reaksiyon husule gelip gelmediği kontrol edildi ve ölen kobayların otopsi tablosu tesbit edilerek kalp kanlarından ekim yapılarak septisemik anthrax'ın müsbet olup olmadığı kontrol edildi.

Mutant suştan aşı hazırlanması ve koyunlarda mukayeseli bağışıklık denemeleri :

29/1a ve 34F<sub>2</sub> suşları 3 gün 37 °C. de kazein digest vasatlarında üretildikten sonra serum fizyolojikle toplandı, ve üzerlerine % 50 gliserin katılmak suretiyle konsantre aşılar hazırlandı. 2 defa hazırlanan ve 3-4 hafta bekletilmeden sonra bu konsantre aşılardan 3 er defa spor sayımları yapılarak ml. lerindeki spor miktarları tesbit edildi. Aynı zamanda bu aşılardan aerobik ve anaerobik ekimleri yapılarak aşılardan saf ve temiz oldukları tesbit edildikten sonra herbir konsantre aşıdan 2 şer kıl keçisine 10 ar ml. inokule edildi. Aşılamayı takip eden 10 gün zarfında hiç bir lokal ve genel reaksiyona rastlanılmadığından bu konsantre aşılardan aşağıda bildirilen aşı mahlüllerine katılmak suretiyle ml. lerinde 8, 6, 4, 2 şer milyon spor bulunacak şekilde aşılar hazırlandı. Bunlar :

a) Saponinli aşı : % 40 glyserin, % 60 serum fizyolojik ve % 0,1 saponinli.

b) Aluminium Hidroksitli aşı : % 30 Aluminium Hidroksit, % 70 serum fizyolojik ihtiva eden bu aşının içerisinde takriben % 0,2 - 0,3 oranında aluminium oksit bulunan aluminium hidroksit kullanılmış olup, böylece hazırlanan aşılardan ml. inde % 0,06 - 0,09 aluminium oksit bulunmaktadır.

c) Mineral yağlı aşı : Türkiye Petrolleri Anonim Şirketine temin edilen saf White Needle Oil B ile hazırlandı.

d) Max - Sterne anthrax aşısı : % 50 glyserin, % 50 serum fizyolojik ve % 0,1 saponinli.

Yukarıda zikredilen aşılardan mahlülleri otoklavda sterilize edildikten sonra saponinli, aluminium hidroksitli ve mineral yağlı aşı mahlüllerine 29/1a mutant suşu ile hazırlanan konsantre aşılardan, Max - Sterne aşısına da 34F<sub>2</sub> suşundan hazırlanan konsantre aşılardan katılmak suretiyle aşılar hazırlandı. Bütün bu aşılardan 3 er defa spor sayımları yapılarak ml. lerindeki spor miktarlarının doğru



olup olmadıkları kontrol edildi. Yalnız mineral yağlı aşuların iyi süspansiyonu yapılamadığından spor sayımları mümkün olmadı.

Muhtelif ırklardan anthrax'a karşı aşısız yerlerden temin edilen koyunlar 15 gün müşahedede tutulduktan sonra deri altı yoluyla yukarıda bildirilen aşuların her birinden 0,5'er ml. verilmesi suretiyle aşılandılar. Aşılamayı müteakip şahit koyunlarla beraber 5, 7 ve 15'inci günlerde ml. lerinde 400,000 - 475,000 spor bulunan takriben koyun için 10 - 100 MLD olan virulan anthrax süspansiyonunun 1'er ml. ile deri altı verilmesi suretiyle eprüve edildiler. Eprüvasyonu takiben koyunlar 1'er ay müşahedede bırakıldılar. Bu müddet esnasında ölen koyunların kulaklarından alınan kanlarından birer preparat yapılarak, Giemza ve Methylen mavisi ile boyandı. Bu preparatlar mikroskop altında incelenerek ölen hayvanlarda anthrax müsbet olup olmadığı tesbit edildi.

Ml. lerinde 10 ar milyon spor bulunan saponinli, aluminium hidroksitli ve mineral yağlı aşular hazırlanarak, orijinal Max - Sterne aşısı da dahil olmak üzere her bir aşıdan 2,5 ml. 2 şer tiftik keçisine art bacak iç kısmı deri altına ve 1'er keçiye 2,5 ml. art bacak adale içine, 1'er keçiye de 1'er ml. adale içi zerk edildi. Zerki takiben bütün keçiler 1 saat gezdirildikten sonra yerlerine bırakıldılar. 20 gün müşahedede bırakılan keçilerin sabah, akşam muntazam dereceleri alınarak bir genel reaksiyon olup olmadığı ve aşı inokule edilen yerlerin kontrolü ile de bir lokal reaksiyon husule gelip gelmediği kontrol edildi.

Yine ml. lerinde 10 ar milyon spor bulunan saponinli ve aluminium hidroksitli aşularla, orijinal Max - Sterne anthrax aşısı 2 şer koyuna 3'er ml. deri altı ve 2 şer koyuna da 2,5 ml. adale içi zerk edildi. Zerki takiben bu koyunlar 1 saat gezdirildikten sonra yerlerine alındı ve muntazaman sabah akşam dereceleri alınarak kontrol edildiği gibi, bir lokal reaksiyon husule gelip gelmediği de kontrol edildi.

#### SONUÇLAR

Ml. inde 10 milyon spor bulunan süspansiyonun 35 Watt'lık ultraviyole ışınlarına 20 cm. mesafeden maruz bırakılmasından sonra yapılan spor sayımlarında 30 dakika bırakılanların ml. in-



de 260 spor, 45 dakika bırakılanların ml. inde 160-200 spor, 60 dakika bırakılanlarda ise 30 spor ve 30 cm. mesafeden 60 dakika ultraviyole ışınlarına maruz bırakılanların ml. inde ise 50 spor canlı kaldığı tesbit edilmiştir. Bunlardan : 0,1-0,3 er ml. sütlü agarlara ekilmek suretiyle, 30 dakika ultraviyole ışınlarına tabi tutulandan 8 proteolitik, 11 proteolitik olmayan koloni; 45 dakikalıklarda 4 proteolitik, 30 proteolitik olmayan koloni; 60 dakika ultraviyole ışınlarına tabi tutulandan 8 proteolitik, 11 proteolitik olmayan koloni; 45 dakikalıklarda 4 proteolitik, 30 proteolitik olmayan koloni; 60 dakika ultraviyole ışınlarına tabi tutulanda 1 proteolitik olmayan koloni ve 30 cm. mesafeden 60 dakika maruz bırakılanlarda 3 proteolitik olmayan koloni tesbit edildi. Bu proteolitik olmayan kolonilerin her biri yeni bir sütlü agara pasaj yapılarak numaralandı. Şöyleki : 30 dakika ultraviyole ışınlarına maruz bırakılanlara 30/1, 30/2,....., 30/11, 45 dakikalıklara 1, 2, 3, ....., 30, ve 20 cm. mesafeden 60 dakika ultraviyole ışınlarına maruz bırakılanlardan elde edilen koloniye 60/1, 30 cm. mesafeden 60 dakika maruz bırakılanlardan elde edilenlere de 60/2, 60/3, 60/4 olarak numaralanmış oldu. Sütlü agarlarda 18-20 saatlik bir inkübasyondan sonra bu numaralanan proteolitik olmayan kolonilerin büyük bir kısmı % 30 dan daha az proteolitik olmayan karakter gösterdiklerinden deneme dışı bırakıldılar. Kalan diğer suşların ise 45 defa aerop ve CO<sub>2</sub> li ortamlarda pasajları yapıldı ve her pasajdan sonra sütlü agarlarda proteolitik olmayan karakter gösterenlerin % de nisbetleri tesbit edildi. Bunlara ait neticeler (Tablo : 1) de gösterilmiştir. Tabloda da görüleceği üzere 29/la mutant suşu gerek aerop ve gerekse CO<sub>2</sub> atmosferi altında 45. inci pasaja kadar sütlü vasatlarda üretilen kolonilerin yatık agar ve petrilere yapılan pasajlarında ve CO<sub>2</sub> li ortamlarda üretilen petrilere yapılan pasajlarından sonra daima % 100 proteolitik olmayan karakterini muhafaza etti. Aynı suş aerop olarak yatık agardan, agara yapılan pasajlarda ise 22 nci pasaja kadar % 100 proteolitik olmayan karakterini muhafaza etmesine rağmen, bundan sonra yapılan pasajlarda % 70-90 arasında proteolitik olmayan karakter göstermiştir. 17/a suşu, 20. inci pasaja kadar % 70-95 arasında proteolitik olmayan karakter göstermesine rağmen, 20 inci pasajdan sonra gerek aerop ve gerekse CO<sub>2</sub> li ortamlarda yapılan pasajlarında zaman zaman % 100 proteolitik olmayan karakter göstermiştir. 1. No. lu suş ise 29. cu pasajdan son-



ra % 100 proteolitik olmayan karakter kazandı ve bu karakterini 45 ci pasaja kadar devam ettirdi.

Polatlı Virulan anthrax suşundan da 45 dakika ultraviole ışınlarına maruz bırakılarak 8 proteolitik olmayan koloni elde edildi. Bunlar 10 def'a pasaj yapıldı. Aerop ve CO<sub>2</sub> li ortamlardaki pasajlarından sonra sütlü agarlarda üretilmekle proteolitik olmayan kolonilerin % de nisbetleri tesbit edildi. Bunlara ait neticeler (Tablo : 2 de gösterilmiştir. Tabloda görüleceği üzere bunlardan I a ve IIIc suşları 4 cü pasajdan itibaren gerek aerop ve gerekse CO<sub>2</sub> li ortamlarda % 100 proteolitik olmayan karakter gösterdi.

29/la mutant suşu ile orijinal 34F<sub>2</sub> suşunun mukayeseli olarak besleyici agar ve kazein digest vasatlarında 3-5 gün üretilmeleri esnasında sporlasyon ve elde edilen spor miktarları (Tablo : 3) de gösterilmiştir. Her iki suşunda besleyici agarlarda üretilenlerinin spor sayısı, kazein digest vasatlarında üretilenlere nazaran çok düşük idi. Kazein digest vasatlarında 29/la mutant suşu 34F<sub>2</sub> ye nazaran 3 günlük kültürlerde % 25 ve 5 günlük kültürlerde ise % 100-150 nisbetinde bir artma gösterdi. 3 günden fazla üretilen 34F<sub>2</sub> suşlarının sporlarında % 1-6 nisbetinde bir deformasyon görüldüğü halde, 29/la suşlarında böyle bir deformasyona rastlanılmadı.

Virulan anthrax suşundan izole edilen 3 suşun kobaylar üzerinde yapılan virulans denemesi neticesinde kuvvetli patojen oldukları ve dozda 500 sporla dahi çok kısa bir zamanda kobayları anthrax'tan öldürdükleri tesbit edildi.

Mukayeseli olarak 29/la, 25/2b ve 3 No.lu suşların kobaylarda yapılan bağışıklık deneyine ait neticeler (Tablo : 4) de gösterilmiştir. Bu üç suştan % 100 proteolitik olmayan karakter gösteren 29/la suşu, diğerlerine nazaran çok yüksek bağışıklı kudreti göstermiştir.

29/la ve 34F<sub>2</sub> suşlarının kobaylarda yapılan mukayeseli bağışıklık denemelerinden alınan sonuçlara göre koruma nisbeti ve bağışıklık index'leri Tablo : 5 de gösterilmiştir. Tabloda da görüleceği üzere bağışıklık index'ine göre 29/la suşu 34F<sub>2</sub> ye nazaran 5 misli kadar daha fazla, koruma nisbetine göre ise 2 misli kadar daha fazla bağışıklık kudretinde olduğu tesbit edilmiştir.

29/la mutant suşu ile 34F<sub>2</sub> suşunun koyularda yapılan mukayeseli zararsızlık kontroluna ait neticeler, Tablo : 6 da gösterilmiştir. Tablodada görüleceği üzere 29/la mutant suşu 34F<sub>2</sub> (orijinal Sterne) suşuna nazaran daha az zararlı bir netice göstermiştir.

Mukayeseli olarak 29/la mutant suşu ile hazırlanan saponinli, aluminium hidroksitli ve mineral yağlı aşılarla, 34F<sub>2</sub> suşundan hazırlanan Max - Sterne anthrax aşısının koyunlar üzerinde yapılan bağışıklık denemeleri ve neticeleri Tablo : 7 de gösterilmiştir. Tabloda da görüleceği üzere mineral yağlı aşı hariç 29/la mutant suşu ile hazırlanan saponinli ve aluminium hidroksitli aşılar Max - Sterne aşısı gibi dozda 1 milyon sporla dahi kuvvetli bağışıklık verdiği, ve bağışıklığın 7 inci günde tam olarak meydana geldiği tesbit edilmiştir.

Saponinli, aluminium hidroksitli ve mineral yağlı aşılarla orijinal Max - Sterne anthrax aşısının keçiler üzerinde yapılan zararsızlık kontrollerine ait neticeler Tablo : 8 de gösterilmiştir. Tabloda da görüleceği üzere Max - Sterne aşısı ile aşılananlarda geçici bir ödem ve topallık tesbit edilmesine rağmen, 29/la mutant suşuyla hazırlanmış aşılarla ise hiç bir reaksiyona rastlanılmamış ve bu aşıların orijinal Max - Sterne aşısına nazaran daha zararsız olduğu kanaatine varılmıştır.

Saponinli, aluminium hidroksitli ve Max - Sterne anthrax aşılarının deri altı ve adale içi zerkedilmek suretiyle koyunlarda yapılan mukayeseli zararsızlık kontrollerine ait neticeler Tablo : 9 da gösterilmiştir. Max - Sterne anthrax aşısıyla aşılananlarda ödem ve topallık görülmesine rağmen 29/la mutant suşuyla hazırlanan saponinli ve aluminium hidroksitli aşığı alan koyunların bazılarında geçici, hafif bir reaksiyona raslandı. Bu durumda mutant suşla hazırlanan aşıların koyunlarda orijinal Max - Sterne anthrax aşısına nazaran daha az zararlı olduğu tesbit edildi.

#### TARTIŞMA

Bac. anthracis'in özel karakterini taşıyan virulan tiplerden oldukça değişik olan S koloni variantları üzerinde Stamatin ve Stamatin (49), Stamatin (50), Schaefer (44), (45), çalışmışlar ve Nungester (33) koloni bünyesindeki bu düzgünlüğün artmasının



yani S formuna dönmesinin virulansın kaybolmasıyla beraber seyrettiğini göstermiştir. Sterne (53) orijinal çok dalgalı manzara gösteren virulan formlardan attenüe muameleleriyle S tipine dönen koloniler elde etmiş ve bu S mukoid kolonilerin dalgalı harici üremelerini ayırmak suretiyle tamamen kapsülden yoksun R koloni variantları elde etmiştir. Bu kapsülden yoksun varyant suştan Sterne (54), (55) kuvvetli bağışıklık veren aşı istihsaline muvaffak olmuştur. Yurdumuzda kullanılmakta olan anthrax aşısı da Sterne'in bu suşu ile hazırlanmaktadır ve çalışmalarımızda da bu 34F<sub>2</sub> suşu kullanılmıştır. Yine anthrax'ın varyantları üzerinde Pasteur ve arkadaşları (37), Tomcsik (60), Quex - Holzer ve Tomcsik (17), Brown ve arkadaşları (9), Sterne ve Proom (56) Bac. anthracis'in yüksek derecede üretilen attenüe varyantları ile hareketli varyantları olup olmadığı üzerinde ve Ando ve arkadaşları (3), Zhekov (67), Burrows ve arkadaşları (10) vasata antiseptik ve antibiyotik dilüsyonları katılmak suretiyle bazı değişik tip-te varyantlar elde edilebileceğini göstermişlerdir. Lederberg (27), Kelner (22), Roberst ve Aldous (43), Wilson ve Miles (63) ultraviole ışınlarına maruz bırakmakla birçok organizmlerin inaktive edilerek mutantlar elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Wright ve arkadaşları (64), (66) ultraviole ışınlarına maruz bırakılan Bac. anthracis'in suşlarından mutant suşlar elde ettiklerini, bu proteolitik olmayan suşların pasajlardan sonra da proteolitik olmayan karakterini muhafaza ettiğini ve uygun şartlar altında üretilmekle uzun bir inkübasyon devrinde dahi koruyucu antijenin tahrip olmadığını tesbit etmişlerdir. Fubra (14) Bac. anthracis'in Sterne suşunu ultraviole ışınlarına maruz bırakmakla proteolitik olmayan mutant suşlar elde etmiştir. Ancak bu suşların ileri pasajlardaki durumları hakkında hiç bir bilgi vermemiştir. Biz de çalışmalarımızda 35 Watt'lık ultraviole ışınlarına 20 cm. mesafeden ml. inde 10 milyon spor bulunan Sterne ve virulan bir suşu maruz bırakmakla proteolitik olmayan mutantlar elde ettik. Fakat yaptığımız aerop ve anaerop pasajlar esnasında bu suşlardan birçoklarının proteolitik olmayan karakterlerini kaybederek eski haline dönüşme gösterdiğini tesbit ettik. Kelner (23) E. Coli mutantlarının ultraviole radyasyonlarıyla elde edildikten sonra direkt ışığa maruz bırakılmakla fenotip olarak karakterize mutantların frekansının azaldığını ve uzun zaman bu maruziyetin devamıyla eski haline dönüşebileceğini bildirdi. Stanier ve arkadaşları (52) da can-



lı hücrelerin özelliklerindeki bir değişimin gen mutasyonu neticesinde olduğunu, bazı durumlarda yüksek nisbetlerde mutantların husule gelebileceğini bildirdi. Biz de çalışmalarımızda Sterne suşundan izole ettiğimiz mutant suşların müteaddit pasajlar esnasında % 70 - 90 arasında proteolitik olmayan karakter taşıyan bazı mutantların ana gene döndüğünü, bazılarının da % 100 proteolitik olmayan karakter kazandığını tesbit ettik. Yalnız izole etmiş olduğumuz 29/la suşu yapılan 45 pasajda gerek sütlü vasatlardan aerop vasatlara yapılan pasajlarda ve gerekse CO<sub>2</sub> li ortamda üretilen vasatlardan CO<sub>2</sub> li ortamlardaki vasatlara yapılan pasajlarda proteolitik olmayan karakterini muhafaza etti, ve bu suretle mutantların durumu açıklığa kavuşturuldu.

Wright ve arkadaşları (66) proteolitik olmayan mutant suşların modifiye 599 vasatında ve anaerobik şartlar altında üretmekle koruyucu antijen elde etmede 5 misli bir artmaya sebep olacağını bildirmiş ve Fubra (14) proteolitik olmayan mutant suşların besleyici agar vasatlarında bol miktarda spor husule getirebileceğini bildirmişse de, yaptığımız çalışmalarda adi agarda üretilen 34F<sub>2</sub> ve 29/la suşlarının spor sayıları birbirine yakınlık göstermekle beraber, özel kazein digest vasatında 29/la'nın adi agardaki spor sayısından % 250 - 300 daha fazla olduğu, yine kazein digest vasatında 3 gün üretilen mutant suşun orijinal 34F<sub>2</sub> ye göre spor sayısında % 25 fazlalık gösterdiği tesbit edilmiştir. Bu durum karşısında aşı hazırlanmasında ekonomiyi sağlamak amacı ile Kazein digest vasatının kullanılması tercih edilmiştir.

Gladstone (15) Bac. anthracis'in Sterne suşunu invitro olarak inkübasyon müddetinin 18 saatten fazla uzatılmasıyla koruyucu antijeninin daima az çok kaybolduğunu tesbit etmiş, böyle bir tahribin invivo olarak da husule gelebileceğini belirtmiştir. Wright ve arkadaşları (64) ise proteolitik olmayan mutant suşların uzun bir inkübasyon devresinde dahi koruyucu antijeninin tahrip olmadığını tesbit etmişlerdir. Biz de çalışmalarımızda proteolitik olmayan mutant suşun orijinal Sterne suşuna nazaran 5 günlük kültürlerde % 100 - 150 nisbetinde daha fazla bir artma gösterdiğini ve 3 günden sonra inkübasyon müddeti esnasında Sterne suşu'nun üremesi esnasında sporlarda bir deformasyon görülürken, proteolitik olmayan mutant suşta böyle bir deformasyona rastlanılma-



diğını tesbit ettik. Bu suretle mutantların aşu hazırlanmasına el-verişli, spor temini yönünden de uygunluğu anlaşılmıştır.

Wright ve arkadaşları (64) Bac. anthracis'in virulan bir suşundan elde etikleri proteolitik olmayan mutant suşların tavşan ve fareler için kuvvetli patojen olduğunu tesbit etmişlerdir. Biz de çalışmalarımız esnasında virulan anthrax suşundan elde etmiş olduğumuz proteolitik olmayan mutant suşların kobaylar için kuvvetli patojen olduklarını tesbit ettik, ve bu durum karşısında ileri pasajlardan vazgeçtik.

Fubra (14) Sterne suşundan elde ettiğı proteolitik olmayan mutant suşla esas Sterne suşunun mukayeseli olarak kobaylar üzerinde yaptığı bağışıklık testi üzerinde De. Armon ve arkadaşlarının (12) bağışıklık indeksi formülünü kullanarak yaptıkları hesaplamada mutant suşun Sterne suşuna nazaran 10 - 1000 misli kadar daha fazla bağışıklık kudretinde olduğunu bildirdi. Ancak bu sonucu kesif miktarda spor vererek elde ettiğı sonuçları ilâve ederek bildirmişse de, biz kesif miktarda verilen sporların eprüvas-yondan önce ödem neticesi kobayları öldürdüğünü tesbit ettiğimizden daha düşük nisbette sporlarla yaptığımız çalışmada aynı formülü kullanmak suretiyle proteolitik olmayan mutan suşun Sterne suşuna nazaran ancak 2 - 5 misli daha fazla bir bağışıklık kudretinde olduğunu tesbit ettik.

Sterne (57) saponinli aşuların inokülasyon yerinde çok hafif lokal bir ödeme sebebiyet verdiğini ve bu lokal ödemde basillerin çoğalmasından dolayı saponinin düşük bir konsantrasyonunun faydalı bir iş gördüğünü işaret etmektedir. Personeus ve arkadaşları (38) Sterne suşuyla hazırlanan sporlu aşuların saha tatbikatında kullanılan aşu dozunun 50-500 mislinin keçi ve koyunlara verilmek suretiyle zararsız olduğunu tesbit etmişlerdir. Avcıl ve Emre (4) bazı koyunlarda 20 milyon sporun arızalar husule getirebileceğini, bu sebeple 5 milyon sporun bağışıklık için kâfi geleceğini bildirmişlerdir. Harris - Smith ve arkadaşları (18) virulan bir suşta olduğu gibi, avirulan Sterne suşunun da aynı derecede toksin hasıl ettiklerini ve Stamatın (51) Bac. anthracisin kapsülsüz suşlarının ödem yapıcı karakter taşıdıklarını bildirmişlerdir. Sokol (47) Bac. anthracis'in kapsülsüz variantları ile hazırladıkları alüminum hidroksitli aşuların enjeksiyon mahallinde lokal bir ödem yaptığını işaret etmiştir. Biz de çalışmalarımızda mutant suşun ori-



jinal Sterne suşuna nazaran kobaylar için daha az zararlı olduğunu ve mutant suştan hazırlanan saponinli, aluminium hidroksitli ve mineral yağlı aşılarda Sterne suşuna nazaran keçi ve koyunlar için de daha az zararlı olduğunu tesbit ettik.

Kolesow ve arkadaşları (26), Szent - İvanyi (58) aluminium hidroksitli aşılardan memnuniyet verici neticeler aldıklarını, Puziss ve Wright (41) koruyucu antijenlerin jelde % 0,041 aluminium oksit bulunacak şekilde dilüe edildiğinde adsorbe edici olacağını bildirmişlerdir. Biz de çalışmalarımızda proteolitik olmayan mutant suşla ml. inde % 0,06 - 0,09 nisbetinde aluminiumoksit bulunacak şekilde, % 30 aluminium hidroksitli aşı hazırlayarak deneylerimizi yaptık. Jacotot ve Virat (21) liquid parafinin bağışıklığı arttırmada önemli rol oynadığını belirtmektedirler. Biz çalışmalarımızda ilâç sanayiinde kullanılan saf White Needle oil B. kullanarak, mutant suşla mineral yağlı aşılarda hazırladık. Aşının içerisindeki spor sayısının kontrolü için yapılan çalışmalarda, sayımların mineral yağlı aşılarda mümkün olmadığı görülmüştür. Bu durumda mineral yağlı aşılarda dayanma güçlerinin tayininde bir sakınca olacağı kanısına varılmıştır.

Anthrax'a karşı aktif bağışıklık husule getirmek için Pasteur (37) pratik ve nisbeten emin ve tesirli bir aşı hazırladı. Personeus ve arkadaşları (38) na göre bu aşı her ne kadar memnuniyet verici ise de, avirulan mutant suşların aksine beden derecelerinde bir artma husule getirmektedir. Besredka (7) Pasteur aşılarının intradermal tatbiki ile kuvvetli bağışıklık elde edilebileceğini; Mazuçchi (31) attenué suşların % 2 - 5 nisbetinde Saponin ilâvesiyle bağışıklık kudreti yüksek bir aşı elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Aygün (5) intradermal tatbik edilen T.Ü. Anthrax aşısını yurdumuzda tatbikata koymuş ve bu aşı üzerinde Türkay (61), Çizmen (11) yapmış oldukları çalışmalarda, aşının zararsız ve Pasteur aşıları gibi aynı karakterde bağışıklık gösterdiklerini kaydetmişlerdir. Özcebe (34) ve 35) attenué suşlardan iki türlü aşı hazırlamış, bunlardan birincisi pratiğe intikal etmiş, telefata sebebiyet verdiğinden tatbikattan kaldırılmıştır. Sterne (54), Sterne ve arkadaşları (55) Güney Afrika'da elde ettikleri avirulan, kapsülsüz, saponinli, sporlu aşıyla geniş mikyasta yaptıkları çalışmalardan çok memnuniyet verici neticeler almışlardır. Spears ve Davidson (48) Sterne aşısı ile aşılanan koyunlarda bağışıklığın bir haftadan da-



ha kısa bir zamanda husule geldiğini ve 14 ay devam ettiğini tesbit etmişlerdir. Avcıl ve Emre (4) Sterne aşısı ile bağışıklığın 4 gün sonra başladığını ve 1 sene devam ettiğini tesbit etmişlerdir. Van - Ness ve arkadaşları (62) na göre Sterne suşuyla hazırlanan aşılardan 8 gün sonra kuvvetli bir bağışıklık husule getirdiğine işaret etmekte ise de Lindley (30) bu aşının memnuniyet verici olmasına rağmen, bazı hayvanların aşılardan 21 gün sonra dahi anthrax'tan öldüklerini, intradermal olarak tatbik edilen Pasteur tipi aşılardan daha iyi bağışıklık kudretinde olduklarını ifade etmişlerse de biz çalışmalarımız esnasında gerek mutant suştan hazırladığımız saponinli, aluminium hidroksitli aşılardan ve gerekse de Max - Sterne anthrax aşısının koyunlarda 5 inci günde başlayan, 7 inci günde tam ve kuvvetli bağışıklık verdiklerini tesbit ettik.

Koyunlar üzerinde yaptığımız kantitatif bağışıklık testlerinde izole ettiğimiz proteolitik olmayan 29/la mutant suşuyla hazırladığımız saponinli ve aluminium hidroksitli aşılardan, orijinal Sterne suşuyla hazırlanan aşı gibi art bacak iç kısmı deri altına tatbikle dozda 1 milyon sporla dahi ve dozda 4 milyon sporla da kıvrıcık koyunların kuyruk derisi altına verilmek suretiyle kuvvetli bağışıklık verdiğini tesbit ettik.

#### Ö Z E T

Bu çalışmada Sterne suşunun proteolitik olmayan mutantlarıyla hazırlanan anthrax aşılardan ve orijinal Sterne aşılardan mukayeseli bağışıklık, zararsızlık deneyleri ve aşının maliyetini etkileyen faktörler üzerinde durulmuştur.

1 — 20 cm. mesafeden 35 watt'lık ultraviyole ışınlarına 45 dakika maruz bırakılmakla Bac. anthracis'in Sterne suşundan (34F<sub>2</sub>) avirulan, proteolitik olmayan suşlar izole edildi. Proteolitik olmayan mutant suşların sütlü agarlardan besleyici agarlara pasajları yapıldı ve aerop ve % 20 CO<sub>2</sub> atmosferi altında 3 er gün üretildi. Bunlardan bir çoğu proteolitik olmayan karakterini kaybetti, fakat bir mutant suş (29/la) bu şekilde yapılan 45 pasajda proteolitik olmayan karakterini muhafaza etti.

2 — Aynı metodla virulan bir suştan da 2 proteolitik olmayan mutant suş izole edildi. Bu proteolitik olmayan mutant suş

ların 500 sporu kobayların deri altına injeksion edildiğinde virulan bulundular.

3 — 29/la ve Sterne suşları, kazein digest vasatlarında besleyici agarlara nazaran daha iyi sporlandı. Kazein digest vasatlarında 3 gün üretilen 29/la mutant suşunun glyserinli süspansiyonu Sterne suşunun glyserinli süspansiyonuna nazaran % 25 daha fazla canlı spor ihtiva etmekteydi. Kazein digest vasatlarında 5 gün üretilen 29/la suşunun süspansiyonları Sterne suşuna nazaran % 100 - 150 daha fazla canlı spora sahipti.

4 — 29/la ve Sterne suşlarının kobaylarda yapılan mukayeseli bağışıklık testlerinde 29/la mutant suşu, Sterne suşuna nazaran 2 - 5 misli daha etkili bulundu.

5 — Bu suşların  $2 \times 10^8$  ve  $1 \times 10^8$  miktarlarındaki sporları deri altı ve adale içi kobaylara inokule edildiği zaman 29/la mutant suşu Sterne suşundan daha emin bulundu.

6 — Ml. lerinde 8, 6, 4 ve 2 milyon spor bulunan 3 çeşit [a — % 40 glyserin, % 60 fizyolojik tuzlu su ve % 0,1 saponin b — % 30 aluminium hidroksit, % 70 fizyolojik tuzlu su; c — Mineral yağlı Saf White Needle Oil - B)] aşı 29/la mutant suşu ile hazırlandı. Keza Sterne aşıları da aynı miktar spor ihtiva edecek şekilde hazırlandı. Bu aşılardan her birinin 0,5 ml. i ile deri altı verilmek suretiyle 6 şar koyun aşılandı ve aşılardan 7 ve 15 gün sonra eprüve edildi. Mineral yağlı aşı hariç her iki suştan da hazırlanan bütün aşılar çok iyi bağışıklık verdiler.

7 — Ml. inde 10 milyon spor bulunan her bir aşıdan 1 - 3 ml. ile koyun ve keçiler deri altı ve adale içi inokule edildiği zaman Sterne aşısı 29/la mutant suşundan hazırlanan aşılara nazaran daha çok reaksiyon verdi.

#### SUMMARY

**The isolation of avirulent nonproteolytic mutant of *Bacillus anthracis* and the immunity test in guinea - pigs and preparation of live vaccines from this mutant**

This study has been done comparatively on the immunity and safety test on the vaccines which were prepared by a nonproteolytic mutant of Sterne's strain and the vaccines of original Sterne's and the factors of financial effect of production.



1 — Some avirulent, nonproteolytic mutants were isolated from Sterne's strain (34F<sub>2</sub>) of *Bacillus anthracis* by exposure by irradiation for 45 minutes at 20 cm. from the filament of a 35 W Ultraviolet lamp. These nonproteolytic mutants were made subcultures from the milk agar to nutrient agar and were incubated aerobic and 20 % carbon dioxide atmosphere for 3 days. Many of them lost their nonproteolytic character, but a mutant strain (29/1a) was stable its nonproteolytic character in about 45 subcultures by the same method.

2 — 2 nonproteolytic mutants were isolated from virulent strain by the same method. These nonproteolytic mutants were found virulent, when they were tested in guinea-pigs for virulence by subcutaneous injection of 500 spores.

3 — 29/1a and Sterne's strain both sporulated better on casein digest medium than nutrient agar. The glycerinized suspensions of 29/1a mutant strain contained about 25 % more viable spores than the glycerinized suspensions of Sterne's strain, when they were incubated on casein digest medium for 3 days. The suspensions of 29/1a contained about 100-150 % more viable spores than the suspensions of Sterne's strain, when they were incubated on casein digest medium for 5 days.

4 — Comparison of the protection of guinea-pigs induced by the vaccines of the 2 strain showed that the 29/1a mutant strain was from 2- to 5 times more effective than the Sterne's strain.

5 — 29/1a mutant strain has been found safer than Sterne's strain, when guinea-pigs were inoculated intramuscularly and subcutaneously with about  $2 \times 10^8$  and  $1 \times 10^8$  spores of each of these strains.

6 — Three kinds of vaccines [a — 40 % glycerine, 60 % physiological saline, and 0,1 % saponin b — 30 % aluminium hydroxide, 70 % physiological saline; c — mineral oil (White Needle Oil - B)] which included 8, 6, 4, and 2 million spores in 1 ml. of each, were prepared by 29/1a mutant strain. Sterne's vaccines were prepared also in the same amount of spores. 6 sheep of a group were vaccinated subcutaneously with 0,5 ml. of each of these vaccines and challenged on 7 and 15 days after vaccination. All the

vaccines which were prepared by both strains, except the vaccines of c — with mineral oil, gave very good immunity.

7 — When sheep and goats were inoculated intramuscularly and subcutaneously with 1-3 ml. of each of these vaccines which contained 10 million spores per ml., Sterne's vaccine gave more reactions than the vaccines which were prepared from 29/1a mutant strain.

#### TEŞEKKÜR

Memleketimiz şartlarında anthrax hastalığı ile mücadeleye esas olacak bu araştırmaya bizi teşvik eden ve bu konu ile ilgili hususlarda bizi yöneten T.B.T.A.K. Hayvancılık ve Veterinerlik Yürütme grubu üyesi Sayın Prof. Dr. Hasan Başkaya'ya, çalışmamız esnasında bize her türlü yardımlarını esirgemeyen T.B.T.A.K. Hayvancılık ve Veterinerlik Grubuna ve Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürü Sayın Dr. Ahmet Özsoy ile laboratuvar arkadaşlarımıza teşekkürü bir borç biliriz.

#### LİTERATÜR

- 1 — Aurbach, S. and Wright, G.G., (1955) : Studies on immunity to anthrax. VI - Immunizing activity of protective antigen against various strains of *Bacillus anthracis*. — J. Immunol., 75, 129 - 133.
- 2 — Aktan, M., (1954) : Antraksa karşı yapılan aşular ve üç muhtelif antraks aşısı ile tavşanlarda muafiyet kontrolü. — Ziraat Vekâleti, Etlik Bakteriyoloji ve Seroloji Enst. Neşriyatı, Güven Matbaası, Ankara, 1 - 12
- 3 — Ando, K., Akaike, Y., and Moriya, Y., (1961) : Attenuation of *Bacillus anthracis* by penicillin and immunogenicity of the attenuated organisms. — Bull. Azabu Vet. Coll., Japan, 8, 37 - 45.
- 4 — Avcı, F., ve Emre, M.N., (1964) : Türkiye'de hazırlanan Max - Sterne anthrax aşısı, - Etlik Vet. Bak. Enst. Dergisi, 2 sayı 3 - 4, 239 - 246.
- 5 — Aygün, S., (1934) : Türkiyede (anthrax) Dalak yanığı ve savaşı ve Türk Üniversal Antraks (T.Ü.A.) aşısı üzerinde bilgiler. - Ankara, Yüksek Ziraat Enstitüsü, 82 sayfa.
- 6 — Belton, F. and Strange, R.E., (1954) : Studies on protective antigen produced in vitro from *Bacillus anthracis*, medium and methods of production. - British J. Exp. Path. 35, 144 - 152,
- 7 — Besredka, A., (1921) : Vaccination par voie cutanée charbon: cuti-infection, cuti-vaccination, cuti-immunité. - Ann. Inst. Pasteur, 35, 421 - 430
- 8 — Boor, A.K., (1955) : An antigen prepared in vitro effective for immunization against anthrax. I - preparation and evaluation of the crude protective antigen, - J. Infect. Dis. 97, 194 - 202.



- 9 — **Brown, E.R., Cherry, W.B., Moody, M.D., and Gordon, M.A., (1955) :** the induction of motility in *Bacillus anthracis* by means of Bacteriophage lysates. *J. Bacteriol* 69, 590 - 602.
- 10 — **Burrow, W., Moulder, J.W. and Lewert, R.M., (1963) :** *Bacillus anthracis* in text - book of Mikrobiology. - Saunders Comp., Philadelphia - London, 28, 688 - 696.
- 11 — **Çizmen, F. (1946) :** Antraks muafiyetinin mihanikiyeti ve pratikte kullanılan aşuların mukayeseli denemeleri. - Y.Ç. Basımevi, Ankara, 78 sayfa.
- 12 — **De Armon, I.A., Jr., Klein, F., Lincoln, R.E., Mahlandt, G., and Fernelius, A.L., (1961) :** Immunological studies of anthrax. I - An index to determine quantitative immunization, - *J. Immunol.*, 87, 233 - 239.
- 13 — **Ertürk, Ö. ve Beşe, M., (1961) :** Kombine aşuların bağışıklık etkisi üzerinde bir araştırma. - A.Ü. Vet. Derg. 8, 188 - 196.
- 14 — **Fubra, E.S., (1966) :** Nonproteolytic, avirulent *Bacillus anthracis* as a live vaccine. - *J. Bacteriol.* 91, 930 - 933.
- 15 — **Gladstone, G.P., (1946) :** Immunity to anthrax: Protective antigen present in cell-free culture filtrates. - *Brith. J. Expt. path.* 27, 394 - 410,
- 16 — **Grosso, A.M., and Perez, A.A., (1963) :** (Experiments with the Sterne anthrax vaccine. I - Immunizing properties of the Sterne strain of *Bacillus anthracis* in subcultures in pepton agar. II - Behaviour of Sterne anthrax vaccine prepared with different vehicles.) - *Rev. Invest. Ganad.* No : 18. pp. 319 - 328, *Ref. Vet. Bull.* 34, (1964) : 2057.
- 17 — **Guex-Holzer, S., and Tomesik, J., (1956) :** The isolation and chemical nature of capsular and cell-wall haptens in a *Bacillus* species. - *J. of Gen. Microbiol.* 14, 14 - 25.
- 18 — **Harris-Smith, P.W., Smith, H. and Keppie, J., (1958) :** Production in vitro of the toxin of *Bacillus anthracis*, previously recognized in vivo. - *J. Gen. Microbiol.* 19, 91 - 103.
- 19 — **Jackson, F.C., Wright, G.G. and Armstrong, J., (1957) :** Immunization of cattle against experimental anthrax with alum-precipitated protective antigen or spore vaccine. - *Amer. J. Vet. Res.*, 18, 771 - 777.
- 20 — **Jacotot, H. et Virat, B., (1960) :** Vaccination contre L'infection Charbonneuse par injection de bacteridies tuées en excipient huileux. première note? *Ann. Inst. Pasteur.*, 98, 297 - 300.
- 21 — **Jacotot, H. et Virat, B., (1963) :** Vaccination contre L'infection Charbonneuse par injection de bacteridies Tuées en excipient huileux.- *Ann. Inst. Pasteur.*, 104, 823 - 826.
- 22 — **Kelner, A., (1949a) :** Effect of visible light on the recovery of streptomycetes griseus conidia from ultraviolet irradiation injury.- *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 35, 73 - 79.
- 23 — **Kelner, A., (1949b) :** Photoreactivation of ultraviolet irradiated *Escherichia coli*, with special reference to the dose - reduction principle and to ultraviolet.- Induced mutation.- *J. Bact.* 58, 511 - 522.
- 24 — **Klein, F., Hainer, B.W., Mahlandt, B.G., and Lincoln, R.E., (1963) :** Immunological studies of anthrax. III. Comparison of antibody titer and immunity index after anthrax immunisation. - *J. Immunol.* 91, 431 - 437.
- 25 — **Kolesove, 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-Kontrol. Inst. Vet. preparatow*, 6, 242 - 255. *Ref. Vet. Bull.* 28, (1958) : 1307 - 1308.
- 26 — **Kolesove, S.G., Mikhailov, N.A. and Borisovich, Y.E., (1957) :** (Method of preparing aluminium hydroxide vaccine against anthrax and the results of field trials).- *Trud. nauchno-kontrol. Inst. Vet. Preparatow*, 7, 194 - 200. *Ref. Vet. Bull.* 29, (1959) : 928.

- 27 — Lederberg, J., (1948) : Problem in microbial genetics, - *Heredity*, 2, 145 - 198.
- 28 — Lee, L. A., Kidd, A. R. M., and Sterne, M., (1961) : Antibiotic treatment and its effect on anthrax immunisation. - *Vet. Record*, 73, 1426.
- 29 — Lincoln, R. E., Walker, J. S., Klein, F., and Haines, B. W., (1964) : Anthrax - *Advances in Veterinary Science*, Academic press., New - York, London, 9, 327 - 368.
- 30 — Lindley, W. H., (1963) : Anthrax vaccination.- *J. Amer. Vet. Med. Asso.*- 142, 621 - 623.
- 31 — Mazucchi, M., (1931) : *Clin. Vet.*, Milano 54, 577. cited by 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.
- 32 — Newcombe, H. B., and Whitehead, H. A., (1951) : Photoreversal of ultraviolet induced mutagenic and lethal effects in *Escherichia coli*.- *J. Bact.* 51. 243 - 251.
- 33 — Nungester, W. J., (1929) : Dissociation of *Bacillus anthracis*.- *J. Infect. dise.*, 44, 73 - 125.
- 34 — Özcebe, İ., (1935) : Asproğene şarbon aşısı.- Köy hocası matbaası, Ankara, 30 sayfa.
- 35 — Özcebe, İ., (1953) : Anthrax enfeksiyonuna karşı yeni bir aşı.- *Türk Vet. Hek. Derg.* 23, 916 - 917.
- 36 — Pankratov, A. Y., Tret'yakova, A. A., and Smirnov, I. I., (1960) : (Tests of immunity in sheep inoculated simultaneously against anthrax, brucellosis, and pox.)- *Veterinariya*, Moscow, No. 9, 38 - 40. *Ref. Vet. Bull.*, 31, (1961) : 357.
- 37 — Pasteur, L., Chamberland et Roux, (1881) : De L'atténuation des virus et de leur retour à la virulence.- *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 92, 429. cited by 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.
- 38 — Personous, G., Coener, M. S., and Percival, R. C., (1956) : Studies on anthrax prepared from Nonencapsulated variants of *Bacillus Anthracis*.- *Am. J. Vet. Res.* 17, 153 - 156.
- 39 — Pilinenko, V. G., and Mirashnichenko, M. A. (1963) : (Compatibility of anthrax STI vaccine with a combined vaccine against plague, Tularemia and Brucellosis, inoculated dermally at separate places on the body.)- *J. Microbiol*, Moscow, 3, 26 - 31. *Ref. Vet. Bull.*, 33, (1963) : 2629.
- 40 — Puziss, M., and Rittenberg, S. C., (1957) : Studies on the anaerobic metabolism of *Bacillus anthracis*, and *B. cereus*.- *J. Bact.* 73, 48 - 51.
- 41 — Puziss, M., and Wright, G. G., (1963) : Studies on immunity in anthrax. X - Gel. adsorbed protective antigen for immunization of Man.- *J. Bact.* 85, 230 - 236.
- 42 — Richou, R., Jensen, K., and Belin, C., (1964) : Studies on saponin, adjuvant and stimulant of immunity.- *Rev. Immunol.*, 28, 49 - 62.
- 43 — Roberts, E. B., and Aldous, E., (1949) : Recovery from ultraviolet irradiation in *Escherichia coli*.- *J. Bact.* 57, 363 - 375.
- 44 — Schaefer, W., (1936a) : Sur la morphologie de la bacteridie charbonneuse, *C. R. Société de biologie*, 122, 897 - 899.
- 45 — Schaefer, W., (1936b) : Dissociation de la bacteridie charbonneuse.- *C. R. Société de biologie*, 122, 1178 - 1191.



- 46 — Schligman, A. S., Devlin, H. B., Maine, R. J., and Manning, M. C., (1956) : Immunization activity of alum - precipitated antigen of *Bacillus anthracis* in cattle, sheep, and Swine.- Amer. J. Vet. Res. 17, 256 - 261.
- 47 — Sokol, A., (1957) : Use of adsorbed live vaccine against anthrax in sheep Vet. Cas., 6, 305 - 314. Ref. Vet. Bull. 28, (1958) : 1306.
- 48 — Spears, H. N., and Davidson, J. C., (1959) : Anthrax - The Vet. Record 71, 637 - 643.
- 49 — Stamatin, N., et Stamatin, L., (1936) : Le pouvoir immunisant des souches acapsulogènes de *Bacillus anthracis*.- C.R. Société de Biologie, 122, 491 - 493.
- 50 — Stamatin, N., (1937) : L'immunisation anticharbonneuse du Moyen d'une souche de *Bacillus anthracis* acapsulogène chez le mouton.- C.R. Société de Biologie, 125, 90 - 92.
- 51 — Stamatin, N., (1964) : (Recent research and concepts on anthrax. II - Immunizing capacity of certain substances secreted by *Bac. anthracis* in Vitro) - Rec. Med. Vet. 140, 735 - 753. Ref. Vet. Bull., 35, (1965) : 834
- 52 — Stanier R. Y., Doudoroff, M. and Adelberg, E. A., (1958) : Types of Bacterial mutations in General Microbiology.- Macmillan and Co., London. 392 - 393.
- 53 — Sterne, M., (1937) : Variation in *Bacillus anthracis*.- Onderst. J. Vet. Sci. 8, 271 - 349.
- 54 — Sterne, M., (1939a) : The use of anthrax vaccines prepared from avirulent (uncapsulated) variants of *Bacillus anthracis*.- Onderstepoort J. Vet. Sci., 13, 307 - 312.
- 55 — Sterne, M., Robinson, E. M. and Nicol, J., (1939b) : The use of saponin spore vaccine for inoculation against anthrax in South Afrika.- Onderstepoort, J. Vet. Sci. 12, 279 - 302.
- 56 — Sterne, M., and Proom, H., (1957) : Induction of motility and capsulation in *Bacillus anthracis*.- J. Bact. 74, 541 - 542.
- 57 — Sterne, M., (1959) : Anthrax in infectious diseases of animals, diseases due to bacteria by Stableforth, A. W. and Galloway, I. A.- Butterworths-Scientific publications, London, 1, 16 - 52.
- 58 — 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. 31, (1961) : 610.
- 59 — Tomcsik, J., (1949) : Zur Frage der induzierten mutation der Milzbrandbazillen - Schweiz. z. Pathol. U. Bacteriol. 12, 489 - 499.
- 60 — Tomcsik, J., (1950) : Über eine hewegliche Mutante des *B. antracis*.- Schweiz. z. Path. U. Bacteriol. 13, 616 - 624.
- 61 — Türkay, N., (1943) : Türk Üniversal anthrax aşısının hazırlanması., Ankara, 13 s.
- 62 — 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.
- 63 — Wilson, G. S., and Miles, A. A., (1955) : Non - Specific induced Mutation *Bacillus anthracis* and anthrax in Topley and Wilson's principles of Bacteriology and Immunity.- Edward Arnold Ltd.- London. 4Th edition- 1, 2, 349 - 350, 957 - 963, 1938 - 1954.
- 64 — 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.
- 65 — Wright, G. G., Hedberg, M., and Slein, J. B., (1954) : Studies on immunity in anthrax. III. Eleboration of protective antigen in a chemically defined, non - protein medium.- J. Immunol. 72, 263 - 269.
- 66 — Wright, G. G., Puziss, M., and Neely, W. B., (1962) : Studies on immunity in anthrax IX. Effect of variations in culturel conditions on elaboration of protective antigen by strains of *B. antracis*.- J. Bact. 83, 515 - 522.
- 67 — Zhekov, S., (1961) : (Changes in anthrax bacilli after cultivation on Rivanol agar.)- izv. Vet. Inst. Zaraz. Parazit. Bolesti., Sofia, 1, 51 - 55. Ref. Vet. Bull. 32, (1962) : 1728.