

40854

T.C.
GAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DEĞİŞİK BORDETELLA PERTUSSİS SUŞLARINDA
BAĞIŞIKLAMA GÜCÜ VE PATOJENİTE YÖNÜNDEN
YAPILAN ÇALIŞMALAR**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tezi Hazırlayan :
Biyolog Gülnur TARHAN

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Tez Danışmanı :
Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR

ANKARA - 1994

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM ADI :	SAYFA NO
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
Bordetella pertussis'in mikrobiyolojik özellikleri.....	3
Bordetella pertussis'in virülans faktörleri.....	4
Boğmaca hastalığı.....	12
Aşılama ve bağışık.....	14
GEREÇ VE YÖNTEMLER	20
GEREÇLER	20
YÖNTEMLER	23
Suşlarda aglütinojen tayini.....	23
Tam hücre boğmaca aşısı üretimi.....	23
Kobaylarda aktif bağışıklama ve kan örneklerinin alınması.....	25
Mikroaglütinasyon testi.....	25
IHA-Nötralizasyon testi.....	26
Modifiye Morse Bray besiyerinde kültür.....	26
Hemaglütinasyon aktivitesinin tayini.....	27
BULGULAR	28
TARTIŞMA	35
ÖZET	41
YABANCI DİLDE ÖZET (SUMMARY)	42
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	52

GİRİŞ

Boğmaca, Bordetella pertussis'in neden olduğu endemik ve epidemik bir hastalıktır. Özellikle yeni doğan bebeklerde ve küçük çocuklarda etkili olan bu hastalık bütün dünyada yaygın olarak bulunur.

Dünyanın birçok bölgesinde büyük bir problem olan boğamaca hastalığı, genellikle 0-12 aylık bebekler için öldürücüdür. Bu yaş grubundaki ölüm oranı, bütün enfeksiyon hastalıklarının neden olduğu ölümlerden daha fazladır. Dünya Sağlık Örgütü bu hastalığa bağlı olarak yılda 600.000 ölüm olduğunu tahmin etmekte ve bunların tümünün aşısız çocuklar olduğunu ileri sürmektedir.^{1,2}

Boğmaca için ilk aşı fikri 1906 yılında mikroorganizmanın izole edilmesinden hemen sonra ortaya atılmış ve ölü B. pertussis hücrelerinden elde edilen standart aşılar 1950'lerin başından itibaren yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Boğmaca aşısının geniş olarak uygulandığı bölgelerde hastalığın epidemiyolojisi süratle değişmiş, boğmaca önemli şekilde gerilemiş, aynı zamanda hastalığın ağır seyri ve ölüm oranı düşmüştür. Ancak, aşılamanın tam olarak uygulandığı gelişmiş ülkelerde oluşan rahatlama ile beraber dikkatler aşıya bağlı reaksiyonlara çevrilmiştir. Çok az da olsa bazı ülkelerde DBT aşılamalarından sonra kaydedilen ciddi reaksiyonların B. pertussis komponentleri ile ilgili olabileceği söz konusu edilmiştir. Bu süreç içinde B. pertussis'in moleküler biyolojisi ve patojenezi üzerinde yapılan çalışmalarda gözönünde bulundurularak yeni aşı geliştirme çabaları artmıştır. Hatta bazı ülkelerde aşı uygulamalarının durdurulduğu da görülmüştür. Fakat

bu ülkelerde daha sonra görülen boğmaca epidemileri aşı uygulamasından vazgeçilmeyeceğini göstermiştir. 3,4

Tüm bunların yanında, aşı uygulamasının önemi kadar, aşıda kullanılan suşlar ve yöntemlerde aşının gücü bakımından önem taşımaktadır. Özellikle aşıda kullanılan suşların aglütinojen 1, 2 ve 3 determinantlarına sahip olması birinci derecede gözönünde bulundurulması gereken özellik olarak kabul edilmiştir. Bu aglütinojenlere sahip B. pertussis suşları faz I olarak adlandırılmakta olup, değişik faz I suşlarının karışımının da aşı yapımında kullanılabileceği ileri sürülmektedir.1,5,6

Bununla beraber aşı yapımında kullanılan suşların bazı önemli komponentlere de sahip olması ve in vivo olarak asgari düzeyde antikor yanıtı çıkarabilmesi gerekmektedir.

Bu nedenle, bu çalışmada faz I olarak belirlediğimiz suşların Lenfositosis-Promoting-Faktör (LPF) ve Filamentöz Hemaglütinin (FHA) sentezleme yeteneği yanında in vivo aglütinin yanıtı çıkarma özelliklerinin de incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Bordetella pertussis'in mikrobiyolojik özellikleri :

B. pertussis küçük, gram negatif, hareketsiz ve konaktan ilk izole edildiğinde kapsüllü formda olan bir mikroorganizmadır.^{5,7,8}

Laboratuvar şartlarında zor ürer. Üremesi için aktif karbon, nişasta, kan veya kan ürünlerini ihtiva eden özel ortamlara ihtiyaç duyar. Nişasta, pepton gliserol ve %33 oranında kan ihtiva eden Bordet Gengou'nun orjinal katı vasatlarında 3-5 gün içinde düz, şeffaf ve küçük koloniler oluşturur. Etrafı hemolizli olan kolonileri ile Haemophilus'a benzetilen bu bakteri üreme için X ve V faktörlerine gereksinim duymaz. Doymamış yağ asitleri, metal iyonları, sülfidler ve peroksitler gibi bileşenlerin bulunduğu ortamlarda üreyemez.^{1,5,7,9}

Metabolizmasında aminoasitlere özellikle sistein glutamik asit, prolin, nikotinik asit ve magnezyum sülfat, glutatyon, demir tuzu gibi üreme faktörlerine ihtiyaç duyar. Bu nedenle kültürü için son senelerde; Yağ asitlerini inhibe etmek amacı ile absorbans ilave edilmiş Modifiye Cohen-Wheeler, üreme faktörleri ihtiva eden Stainer-Scholte, Modifiye-Morse Bray gibi çeşitli sentetik ve yarı sentetik besiyerleri kullanılmaktadır.

B. pertussis sentetik besiyerlerinde ürerken kapsülünü kaybeder ve bir takım değişimlere uğrar. Bu değişim faz I'den faz II, III veya IV'e olacak şekilde karakterize edilmiştir. ^{5,6,7,9}

Faz I mikroorganizmaları konaktan yeni izole edilen bakterilerin özelliklerini taşır. Faz I suşlarının hücre duvarı yapısında 35 çeşit protein varlığı gösterilmiş olup, bunlarla yapılan immünolojik çalışmalarda ise yaklaşık 20 çeşit determinant grubundan söz edilmiştir. Bu proteinlerin bir kısmında kültür pasajları ile kaybolduğu belirlenmiştir. Faz II ve III'de ki bakteriler ara şekillerdir. Faz IV suşları ise spontan değişimin son ürünleri olup, antijenik yönden oldukça fakirdir. 5,9

Bordetella pertussis'in virülans faktörleri :

B. pertussis, çok yönlü biyolojik aktiviteleri olan patojenik bir mikroorganizmadır. Hastalığın meydana gelmesinde rol oynayan faktörler birden fazla olup, bunlar arasında biyokimyasal özellikleri henüz bilinmeyenler de vardır. 4,10

Son zamanlarda bu alanda yapılan immünokimyasal çalışmalarda B. pertussis'in biyolojik aktivite gösteren bazı komponentleri izole ve karakterize edilmiştir. Bu komponentlerin aşılama ve hastalık sonrası immünite ile ilişkili olduğu ve boğmacanın patojenezinin anlaşılmasında önemli rol oynadığı belirlenmiştir.

Bütün bu bilgiler boğmaca aşılarının geliştirilmesi ve serolojik teşhisinin düzenlenmesinde önemli bir aşama kaydedilmesini sağlamıştır. Bordetella pertussis'in virülans faktörleri;

Aglütinojenler (AGG)

Filamentöz hemaglütinin (FHA)

Lenfositosis-promoting faktör (LPF)

Lipopolisakkaritler (LPS)

Adenilat siklaz (AC)

Dermonekrotik toksin (DT)

Trakeal sitotoksin (TCT)

Aglütinojenler:

B. pertussis'in en iyi bilinen yüzey komponentleri olan aglütinojenler, bakterinin solunum yolları mukozasına bağlanmasını sağlayarak enfeksiyonun başlamasına neden olurlar.^{4,10} Konağın immün sisteminde bu antijenlere karşı aglütinin adı verilen spesifik antikorlar meydana gelir. Ve bu antikorlar bakteri ile reaksiyona girerek onun tam aglütinasyonuna neden olabilirler.^{4,11}

Aglütinojenler, heterojen özellik gösteren grup antijenleridir. Bunlar az miktarda spesifik ısıya dayanıklı lipopolisakkarit komponentlerinden meydana gelen O antijenleri ile bir veya daha fazla sayıda ısıya dayanıksız K antijenlerinden meydana gelmişlerdir. K antijenleri 56°C ısıya dayanıklı olup, 100°C'de dayanıklılığını kaybederler.^{1,4,5,12,13}

Bordetella türlerinde bugüne kadar 14 tip aglütinojen tanımlanmıştır. Tip 7 tüm Bordetella türlerinde yaygındır. 1957 yılında Eldering.¹³ B. pertussis için 1-6 çeşit serotip aglütinojen tanımlamıştır. Bunlardan 1,2,3 başlıca aglütinojenler olup, bütün tam hücre boğmaca aşılarında bulunurlar ve önemli derecede koruyucu etkiye sahiptirler. 4,5,6 ise diğer aglütinojenlerdir. Bunların koruyuculuk yönünden çok fazla etkinlikleri yoktur.^{1,4,5,10,14}

Aglütinojen 1, tüm suşlarda bulunur ve tür için belirleyicidir. Özellikle yeni izole edilen suşlarda varlığı tesbit edilmiştir. Bu suşlar 1,2,3; 1,2 veya 1,3 aglütinojenlerini ihtiva eden üç serotipten birine aittir. Bugüne kadar hücrede hangi bölgelerde bulunduğu tam olarak belirlenememiştir. Bu antijenlerin hem fimbriyalarda hem de hücre yüzeylerinde bulunduğu ve tek bir bölgede yer almadığı ileri sürülmektedir.^{5,15,16}

Aglütinojen 2, 22 kd ağırlığında fimbriyal orjinli bir serotiptir. Bakteri patojenezinde, epitel hücre siliyalarına tutunarak non-invaziv kolonizasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu durum aşısız topluluklardan izole edilen suşlarda genellikle 1,2,3 ve 1,2 şeklinde aglütinojen varlığının gösterilmesi ile de kuvvet kazanmaktadır.^{4,15}

Aglütinojen 3'ün ise fimbriyal olmayıp, bir dış membran proteini olduğu ileri sürülmüştür. Bu aglütinojenin de aşılarda bulunması iyi bir korunma sağlamanın şartlarından biri olarak görülmektedir.^{1,4,15}

Diğer aglütinojenler olan 4,5 ve 6 hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Aglütinojenlerin önemli bölümünün (1,2,3) nispeten tanımlanmış olması yanında, bunların izole suşlardan zaman içinde kültür pasajları veya bekleme sonucu kendiliğinden genotipik değişiklikler ile ortadan kalktığı da bilinmektedir.⁴

Filamentöz hemaglütinin:

2x40 nm boyutlarında 126.000-133.000 molekül ağırlığında filamentöz yapıya sahip olan bu proteinin toksik özelliği yoktur.^{17,18}

Koyun, tavuk, kaz gibi birçok hayvanın eritrositlerini aglütine edebilme özelliğine sahiptir. Molekülün bu aktivitesi kolesterol inhibisyonuna duyarlılığı ile karakterizedir.^{1,4} Ayrıca bu toksinin LPF ile birlikte hemaglütinasyon aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir.

1976 yılında Sato ve Arai¹⁹ tarafından yapılan çalışmalarda FHA, o güne kadar tek bir hemaglütinin olarak bilinen proteinden LPF ve FHA olarak ayrı ayrı saflaştırılmış ve daha sonra saf FHA molekülünün SDS-PAGE sisteminde 4 ana alt birim ve 5-6 küçük alt birimden oluştuğu gösterilmiştir.^{4,17}

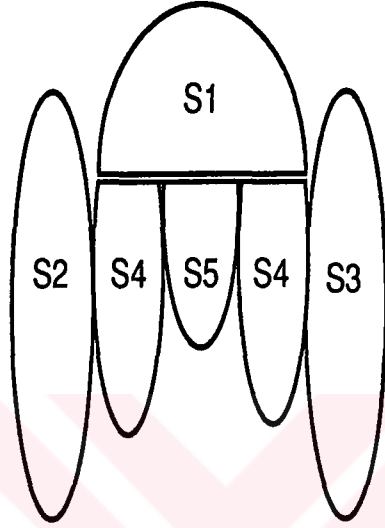
Filamentöz hemaglütinin, patojenez sırasında bakterinin üst solunum yollarına yapışmasını ve kolonizasyonun başlamasını sağladığı ileri sürülmektedir. FHA'ya karşı gelişen antikorların kısa ömürlü olduğu fakat LPF ile beraber iyi bir koruyucu güç oluşturduğu saptanmış ve yeni geliştirilmekte olan hücresiz boğmaca aşısı programlarında bu toksinden geniş olarak faydalanılmıştır.^{1,3,10,17,18}

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda FHA moleküllerinin B. pertussis kolonizasyonunda S. pneumoniae, H. influenzae ve S. aureus gibi bazı patojenlerin de kolay kolonize olmasında rol aldığı ileri sürülmektedir. Bu durumun boğmaca vakalarında görülebilen süperinfeksiyonlarla ilişkili olduğu zannedilmektedir.^{1,20}

Lenfositosis promoting faktör:

B. pertussis'in en önemli virülans faktörüdür. Farklı biyolojik aktivitelerinin olması nedeni ile bu ekzotoksine : Pankreas aktive eden protein (IAP : Islet activating protein), histamine duyarlaştırıcı faktör (HSF :

Histamine sentizing factor), pertussigen ve pertussis toksin (PT) isimleri de verilmiştir.1,3,9,10,11,17,21



Şekil 1 : LPF'nin şematik yapısı ve alt birimleri

LPF, tipik olarak AB modelinde olup, iki ana alt birimden meydana gelmiştir. Bunlardan A komponenti veya S1 enzimatik olarak aktif kısımdır. B oligomeri, hedef hücrelere bağlanarak A komponentinin hücre içine girmesini sağlar. B komponenti; S2, S3, S4 ve S5 olmak üzere 4 alt birimden meydana gelmiştir. Toksik özelliği yoktur (Şekil 1).

Çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarda LPF'nin potent bir toksin olduğu ve boğmaca hastalığı sırasında görülen sistemik belirtilerin büyük bir çoğunluğunun bu toksinin aktiviteleri ile meydana geldiği belirtilmiştir.1,3,4,10,21

LPF'nin en önemli biyolojik aktiviteleri şunlardır;

1. Konak organizmadaki nötrofil, monosit, makrofaj bazofil, NK lenfositleri ve kemik iliği stem hücreleri gibi, immün efektör hücreleri bloke ederek majör hücre tiplerini etkiler ve böylece konağın sekonder enjeksiyonlara hassaslaşmasına neden olur.

2. Pankreasın β hücrelerini aktive ederek, insülinin glikoza bağlı salınımını artırır.

3. Adenilat siklaz regülasyonunu hormonal uyarım gibi modifiye ederek, hücrelerin uyarımını sağlar.

4. Lenfositosis, lökositosis ve monosit migrasyonuna neden olur.

5. T lenfositlerinin supresör aktivitesi ile IgE antikorlarının meydana gelmesini sağlar.

6. Yağ hücrelerinde lipolizise neden olur.

7. Fosfotidil inositol hidrolizinin stimülasyonunu bloke ederek, araşidonatların serbest kalmasına ve bazı hücrelerde kalsiyum mobilizasyonunun meydana gelmesine neden olur.

LPF düşük dozlarda (<10 ngkg-1) hayvanlara verildiği zaman zararlı etki göstermez. Yüksek dozlarda ciddi yan etkiler yapar ve hayvanların ölümüne neden olur.^{1,4,22,23}

Tüm bu aktiviteleri nedeni ile LPF yeni geliştirilmekte olan hücresiz boğmaca aşılarının ana komponentidir.

Lipopolisakkaritler :

Bütün gram negatif bakterilerde yaygın olarak bulunan lipopolisakkaritler B. pertussis'in endotoksinleridir. Bu mikroorganizmadaki lipopolisakkaritlerin yapı ve fonksiyonları diğer mikroorganizmalarinkinden farklıdır.^{1,4,10}

Yapısal olarak; Lipid A ve lipid X olmak üzere iki farklı lipid molekülü ile her üniteye 12-16 monosakkarit içeren iki farklı oligosakkarit zincirinden meydana gelmiştir.

Fonksiyonel olarak; Lipid X'in klasik bir endotoksin aktivitesi vardır. Buna karşılık lipid A'nın pirojenite ve toksisitesi düşük olup, adjuvant ve antiviral aktivite yönünden kuvvetli bir etkiye sahiptir. Oligosakkarit fraksiyon, fare lenfositleri için mitojeniktir. Ayrıca tavşan splenositlerinin aktivitesini ve insan monositlerinden salgılanan interlökin 1'in uyarımını sağlar.^{1,4}

Tam hücre boğamaca aşılarda da bulunan lipopolisakkaritlerin koruyucu etkileri yoktur. Bununla beraber aşılama sırasında görülen ateş, iltihap gibi bazı reaksiyonlardan sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir. Bu etkileri yüzünden de yeni geliştirilmekte olan aşılarda endotoksin bulundurulmaması hedeflenmektedir.^{1,10,11}

Adenilat siklaz :

B. pertussis'in oluşturduğu bu enzim aynı zamanda toksin aktivitesi de göstermektedir. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 70 kd dur. Bu enzim ökaryot hücre içine başka bir proteine bağlanarak girer ve ATP'nin cAMP'ye dönüşümünü katalize eder.^{1,4,24,25,26}

Adenilat siklaz enzimi uygun koşullarda kalmodulin tarafından aktive edilerek fagositlere girer ve endojenöz ATP'nin cAMP'ye dönüşümünü katalizler. Fagositler üzerine bu etki organizmanın enfeksiyon bölgesinde hayatta kalmasına olanak tanır. Bu aktivitelerinin dışında adenilat siklaz toksin, konak organizmanın immün sistemine etki

ederek konak savunmasının bozulmasına neden olur. Bu aşamada ki en önemli faaliyetleri şunlardır;

1. Kemotaksisi, süperoksid oluşumunu ve parçalı çekirdekli lökositlerin mikroorganizmaları öldürmelerini,
2. Alveolar makrofajların oksidatif aktivitelerini,
3. Monositleri ve NK hücrelerini inhibe eder.^{4,10,11}

Dermonekrotik toksin :

Isıya duyarlı ve fareler için kuvvetli öldürücü etkisi olan bu toksin, B. pertussis'in sitoplazmasında lokalize olmuştur. 56°C'de 10 dakika ısıtmakla yok olabilir ve formaldehid gibi kimyasal maddelerle inaktive olur. Bu toksin kobay, koyun, fare, tavşan ve domuzda dermonekrotik etki gösterir.^{1,4}

Molekül ağırlığı 102 kd olup, 30 ve 20 kd ağırlığında iki alt birimi vardır. İmmünojenitesi düşüktür. Farelere düşük dozlarda subkutanöz yol ile enjekte edildiği zaman nekrotik lezyonlara, yüksek dozlarda verildiği zaman ölüme neden olabilir.⁴

Bu komponentin boğmacada ki rolü tam olarak belirlenememesine rağmen pürifiye edilmiş toksinin periferal kan damarlarının vazokonstriksiyonuna, lokal iskemiye, lökositlerde diapedezis ve petesial hemorajiye neden olduğu saptanmıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda toksinin insanda antikor oluşumuna neden olup olmadığı belirlenememiştir.⁴

Trakeal sitotoksin:

B. pertussis'in sıvı kültür süpernatantlarından son zamanlarda izole edilmiş bir ekzotoksindir. Bakteri hücre duvarının peptidoglikanından elde edilmiştir.

Enfeksiyon sırasında bakterinin konak savunmasına karşı mücadelede önemli etkileri olduğu belirlenen bu toksin, özellikle trakeal silia ve epitel hücrelerde lezyonlara neden olur. Hamster trakeal epitel hücrelerinin tek tabakalı hücre kültürlerinde, doza bağlı olarak DNA sentezi inhibisyonuna ve yine hamster trakeal organ kültürlerinde, siliostazis ile hücrelerin nekrozuna neden olduğu belirlenmiştir.^{1,4,5,11}

Hastalıktan korunmada, bu komponente karşı oluşan antikor yanıtının rolü bugün için tesbit edilememiştir.

Boğamaca hastalığı:

Önemli enfeksiyon hastalıklarının başında gelen boğmaca daha çok yeni doğan bebeklerde ve küçük çocuklarda görülen, çok yüksek derecede bulaşıcı özellik taşıyan bir hastalıktır.^{4,8,27}

Hava yolu ile vücuda giren B. pertussis insanların trake ve bronşlarının epitel yüzeylerine yerleşerek hızla çoğalır. 1-3 haftalık bir inkübasyon döneminden sonra ilk belirtiler ortaya çıkar. Bu hastalık;

1. İnkübasyon dönemi
2. Nezle dönemi
3. Spazmodik öksürük
4. İyileşme dönemi olmak üzere başlıca 4 dönem ile karakterize edilmiştir.^{1,4,8,9,27}

inkübasyon döneminden sonra görülen nezle dönemi semptomları, genelde hafif bir soğuk algınlığı, hapşırma ve nazal mukus membranlarının inflamasyonu şeklindedir. Ateş 38,5°C'den daha azdır. Bu dönem sırasında B. pertussis nazofarengial kültürlerden %90 oranında izole edilebilir. Fakat bu dönemde klasik boğmaca öksürüğü görülmediği için primer tanı olanağı yoktur. Bu yüzden bu dönemde çok nadir olarak boğmaca hastalığından şüphelenilir.⁴

Spazmodik öksürük döneminde, infeksiyon aşağı solunum yollarında yaygınlaşır. Nezle döneminden yaklaşık iki hafta sonra öksürük spazmodik bir hal almaya başlar ve bu dönemde öksürük devamlı nöbetler halinde olup çok kuvvetlidir. Non-produktif bir ökrüsükten sonra mukus üretimi ve kusma ile beraber karakteristik boğmaca öksürüğü görülür. Hasta mukusu nefes borusundan çıkarmak için çok fazla gayret sarf eder. Mukusun temizlenmesinden sonra akciğerlere hızla hava girer ve ötme şeklinde bir ses çıkar. Boğmaca öksürüğü denilen bu ses sadece bu hastalığa özgüdür.^{4,5,8,9,25} Bu dönemde hastalarda görülen diğer patolojik değişimler şunlardır;

1. Lenfositlerin artması ile karakterize lökositoz,
2. Kilo kaybı,
3. Bazen hipoglisemi ve nadir olarak ensefalopati.

Spazmodik öksürük döneminin başlamasından sonra pertussis izolasyonu derece derece azalmaya başlar ve hastalığın çok şiddetli safhalarında organizma kültür için yetersiz kalır. Bu safhada mikroorganizmadan çok, bu mikroorganizmadan yayılan toksinler etkili olup, klinik bulgular daha çok toksinlere bağlı olarak ortaya çıkar.^{1,4,27}

İyileşme döneminde, öksürük nöbetleri gittikçe azalarak kaybolur. Fakat paroksizmal dönem semptomları tekrarlıyabilir. Bu nedenle tam olarak iyileşme için birkaç hafta beklemek gerekir.

Boğmaca hastalığı daha çok toksikasyon sonucu oluştuğu için hastalığın seyri sırasında antibiyotiklerin tedavi edici bir etkisi yoktur. Fakat başta eritromisin olmak üzere bazı antibiyotiklerin kullanımı hastaların infektivitesini azaltabilir.

Hastalık, virülans faktörlerin toksikasyonu sonucu oluştuğu için korunmada en etkin faktör aşı uygulamasıdır. Aşı uygulamasının başlamasından bugüne kadar geçen zamanda hastalığın insidansında önemli derecede azalmalar kaydedilmiştir.^{2,4,7,27}

Aşılama ve bağışıklık:

Boğmaca'ya karşı ilk aşı geliştirme fikri Bordet-Gengou'nun 1906 yılında B. pertussis'i izole etmesinden hemen sonra ortaya atılmıştır. O zamandan günümüze kadar uygulanan boğmaca aşılama sayesinde de hastalığın insidansı önemli ölçüde düşmüştür.^{1,4}

Aşılamanın yüksek oranda uygulandığı ülkelerde çok az boğmaca vakası görülmesine karşın, aşı uygulamasının tam olarak uygulanmadığı ülkelerde yer yer fazla sayıda boğmaca vakası gözlenmiştir. Bu nedenle özellikle küçük çocuklarda çok tehlikeli seyreden boğmacaya karşı aşı uygulaması son derece önemlidir.^{1,7}

Günümüzde kullanılan boğmaca aşıları ülkeden ülkeye değişiklik göstermekte ve aşılama takvimleri ile uygulamalar arasında

belirgin farklar görülmektedir. Bugün, boğmaca aşıları başlıca iki tip olarak hazırlanmaktadır. Bunlar;

1. Tam hücre boğmaca aşısı dediğimiz bakteri hücresinin tamamını içeren inaktif aşı ile,

2. Hücrenin komponentlerinden oluşan hücresiz aşıdır.

Her iki aşı da tek başına herhangi bir adsorbant ile veya difteri, tetanoz, polio aşıları ile kombine şekilde hazırlanabilmektedir. Tüm dünyada yaygın olarak tam hücre aşıları kullanılmakla beraber İsveç ve Japonya'da hücresiz boğmaca aşıları kullanılmaktadır. Yeni geliştirilen bu hücresiz boğmaca aşılarının ABD, İngiltere, Danimarka, Norveç gibi ülkelerde de yakın zamanda sistematik uygulamaya gireceği tahmin edilmektedir.^{1,28,29,30}

Tam hücre boğmaca aşısı :

İlk tam hücre boğmaca aşılarının üretimi insan veya hayvan kanı ihtiva eden Bordet-Gengou besiyerlerinde yapılmıştır. Bu ortamlarda hazırlanan aşılar da bakteri süspansiyonları ile birlikte kandan geçen bazı proteinlerde bulunduğundan aşı uygulaması yapılan insanlarda bu aşılar aşı karşı duyarlanlık ve bazı ters reaksiyonlar geliştiği gözlenmiştir. Özellikle insan kanının kullanıldığı aşılar da serum hepatit virüsünün bulunması aşılama yapılan kişiler için büyük bir risk oluşturmuştur. Bu amaçla yeni sentetik ve yarı sentetik besiyerleri geliştirilmiştir. Bunlar;

1. Hornibrook, Cohen-Wheeler tarafından geliştirilen sıvı besiyerleri.³¹

2. Charcoal ihtiva eden modifiye katı Cohen-Wheeler besiyeri,

3. Daha çok hücresiz boğmaca aşısı üretimi için kullanılan Stainer-Scholte, Modifiye-Morse Bray besiyerleridir.^{1,17,32}

Klasik hücresel boğmaca aşısı, B. pertussis'in faz I suşlarının hücrelerini içerir. Üreme ortamından toplanan bakteri hücreleri inaktive edildikten sonra jerm miktarı ve potensi yönünden standardize edilir. Genel olarak difteri-tetanoz toksoidleri ile birlikte alüminyum ve kalsiyum taşıyıcılarına adsorbe edilerek kullanılır. ^{1,5,7,11,22,23}

Hücresel boğmaca aşısı daha çok bakteri aglütinlerine karşı antikor yanıtı çıkardığı için koruyuculuğu bu yöndedir. Aşılama sonucunda B. pertussis'in bilinen bütün antijenlerine karşı antikor titresi artar.¹⁰

1983 Ashworth³⁴, 1984 Baraff³⁵, 1984 Barkin³⁶,1991 Blumberg³⁷ de yaptıkları çalışmalarda tam hücre boğmaca aşısı ile aşılanmış çocuklarda özellikle LPF, FHA, AGG, LPS ve dış membran proteinlerine karşı antikor seviyesinde artış gözlemişlerdir.¹⁰

Tam hücre boğmaca aşıları hastalığın kontrol altına alınmasında tartışmasız bir etki ve iyi bir immünizasyon sağlar. Fakat bu aşıların kapsamında yer alan endotoksin aktivitesi gösteren lipopolisakkaritlerin aşılama yapılan çocuklarda bazı ters reaksiyonlara neden olduğu saptanmıştır. Bunlar; infeksiyon bölgesinde ağrı, kızarıklık, kabarıklık gibi lokal reaksiyonlar ile ateş, uyuklama, sinirlilik, iştahsızlık

gibi sistemik reaksiyonlar şeklindedir. Ayrıca inatçı ağlama, ölüm ve ensefalomyelit gibi nispeten nadir görülen reaksiyonlar da tesbit edilmiştir.^{1,4,23,27}

Bu reaksiyonlar nedeni ile, başta İngiltere, Japonya, İsveç olmak üzere bazı ülkelerde aşı uygulamaları azaltılmış hatta durdurulmuştur. Bunun sonucunda hastalık ve hastalığa bağlı ölümler aşılardan kaynaklanan nedenlerden daha ağır bir tablo oluşturmuş ve aşı uygulamalarından vazgeçilemeyeceği anlaşılmıştır.^{1,3,27,28,29,30}

Hücresiz boğmaca aşısı:

Bu aşılardan temeli mikroorganizmanın çeşitli komponentlerinin kombinasyonuna dayanır. Özellikle LPF gibi çok yönlü biyolojik aktiviteleri olan moleküller ile FHA gibi mikroorganizmanın kolonize olmasında birinci derecede rol alan moleküller saflaştırılarak ve inaktive edilerek aşı olarak kullanılmaktadır. Bu tür aşılarından LPS'nin uzak tutulması sağlanmıştır.^{1,10,11,18,,21,28,29,38,39}

Detoksifiye edilmiş LPF ve FHA ile yapılan immünizasyon çalışmalarında her iki komponent hayvan modellerinde test edilmiş, buna dayanılarak çocuklardaki koruyuculuk ile farelerdeki intracerebral challenge arasındaki ilişki gösterilmiştir. Sonuçta LPF'nin immün yanıt üzerinde iyi bir etkisi olduğu buna karşılık FHA ile birlikte daha güçlü bir antikor yanıtı meydana getirdiği belirtilmiştir.^{3,18,21,27,37,40} Ayrıca bazı hücresiz aşılarında aglütinojenler gibi adhezyonda rol oynayan diğer komponentlerden de faydalanılmıştır. Bugün için Japonya'da halen bileşimleri belirgin olarak değişik birkaç ürün mevcuttur.^{30,38,39,40,41,42}

Genel olarak tüm hücresiz aşılarla yapılan uygulamalardan sonra ise reaksiyon oranlarının çok düşük olduğu gözlenmiştir.^{11,40,41,42} Aşılama kontrolü amacıyla yapılan çalışmalarda in vivo olarak gerçekleştirilen fare koruma testleri yanında, insanlarda bağışıklığı ölçmek için daha çok serum aglütininlerinin in vitro olarak belirlenmesi çalışmaları yapılmaktadır.

Ayrıca, özellikle ELISA yöntemleri kullanılarak değişik komponentlere karşı oluşan antikor yanıtının insanlar ve deney hayvanlarında hassas olarak ölçülmesi de mümkündür.⁴³

Antikor yanıtının ölçülmesi:

Boğmaca hastalığı veya boğmaca aşılamasından sonra oluşan antikor düzeyi;

1. Bakteriyel aglütinasyon

2. ELISA

3. In vitro nötralizasyon

4. İndirekt hemaglütinasyon (IHA)

5. Bakterisidal reaksiyon

6. İmmünoblot

7. İmmünodifüzyon

8. Kompleman fiksasyon gibi, çeşitli test yöntemleri ile belirlenebilir.^{1,10,44}

Bakteriyel aglütinasyon:

Aglütinasyon testi, boğmaca aşısının etkinliğinin British Medical Research Council (1956-59) tarafından gösterilmesi

çalışmalarında geniş olarak kullanılmıştır. Bu çalışmalarda çeşitli suşlardan yapılan bağışıklama durumu; vaka sıklığı, farelerde ve çocuklarda aglütinin titresi yönünden değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonunda, aglütinasyon testinin hastalıktan korunmanın iyi bir göstergesi olduğu gözlenmiştir.^{10,344,45,46}

Bakteriyel aglütinasyon testi çeşitli çalışmalarda bazı farklılıklar göstermekle beraber antijenin konsantrasyonu, kullanılan suş, inkübasyon süresi gibi klinik özellikler test sonucu açısından önemli görülmektedir.

Daha sonra boğmacada aglütinasyon testlerinin, pediatrik popülasyonun epidemiyolojik çalışmalarında önemli bir yeri olmuştur. Test sırasında yapılan işlemlerin pratikliği, az miktarda hasta serumunun kullanılması ve titrasyonlu olarak sonuçların kantitatif ifade edilebilmesi, aglütinasyon testinin geniş olarak kullanılabilirliğini sağlamıştır.

Diğer testler:

Genellikle B. pertussis infeksiyonu geçiren kişilerde, bakterinin değişik komponentlerine yönelik antikor yanıtlarının ölçülmesi veya antikor tipinin belirlenmesi gibi amaçlar için değişik tekniklerin kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalarda EIA, in vitro nötralizasyon, RIA veya immüno blot gibi teknikler kullanılarak, LPF, FHA veya diğer komponentlere karşı IgM, IgA, IgG yanıtı test edilmiştir.^{1,10,47,48,49,50,51}

GEREÇ VE YÖNTEMLER:

Bu çalışmada, çeşitli B. pertussis suşları kullanılarak hazırlanan deneysel tam hücre aşılı ile bağışıklanan kobaylarda oluşan antikor düzeyi, aglütinasyon yöntemi ile belirlendi. Bağışık serumlarda ayrıca anti-FHA düzeyi IHA-nötralizasyon yöntemi ile gösterildi. Bunun yanında, bağışıklamada kullanılan suşların LPF-FHA sentez özelliği, sıvı kültür süpernatantında hemaglütinasyon aktivitesi (HA) bakılarak test edildi.

GEREÇ

Suşlar : B. pertussis'in Tohama, Saadet Gün, Nursel, 19190, 60623 ve 165 numaralı suşları Refik Saydam Hızlısıhha Merkez Başkanlığı Boğmaca Aşısı Üretim ve Araştırma Bölümünden sağlanmıştır.

Tipe özgül aglütinin serumlar: Suşların aglütinojen durumunu belirlemek amacıyla kullanılan aglütinin 1, 2 ve 3 serumları Dr. Preston Department of Bacteriology and Virology Manchester University Medical School İngiltere'den temin edilmiştir.

Filamentöz hemaglütinin : Bağışık serumlarda anti-FHA düzeyini göstermek için IHA-nötralizasyon testinde kullanılan pürifiye FHA, Dr. Erkan Özcengiz, Refik Saydam Hızlısıhha Merkezi Boğmaca Aşısı Üretim ve Araştırma Bölümü Ankara'dan sağlanmıştır.

Deney hayvanları : Bağışıklama çalışmaları için kullanılan 200-250 gram ağırlığındaki kobaylar ile toksisite testlerinde kullanılan 14-16 gram ağırlığındaki fareler Refik Saydam Hızlısıhha Merkezi Deney Hayvanları Üretim Bölümü Ankara'dan sağlanmıştır.

Santrifügasyon işlemlerinde Hetich klinik tip santrifüj ve absorbans ölçümleri için Shimadzu 1201 tip UV-visible spektrofotometre kullanılmıştır.

Besiyerleri:

Modifiye Cohen Wheeler besiyeri 31:

Casamino acids (Difco technical)	10.0gr
Soluble starch (Difco)	1.5gr
Yeast extract (Difco)	2.0gr
NaCl	2.5gr
KH ₂ PO ₄	0.5gr
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.4gr
CaCl ₂	10.0mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	10.0mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	7.0mg
L.Cysteine HCl (Sigma)	30.0mg
Activated charcoal (Merck)	2.0gr
Agar (Difco)	18.5gr
Distile su	1lt

pH : 7,2'ye ayarlanıp tüplerde veya Roux şişelerinde 121°C'de 40 dakika otoklavlandıktan sonra besiyerlerinin yatık pozisyonda katılaşması beklenir.

Modifiye Morse Bray besiyeri¹⁸:

1 litre için,

A) Casamino acids (Difco technical)	10.0gr
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	6.0gr
NaCl	2.5gr
Soluble Starch (Difco)	1.5gr
KH ₂ PO ₄	0.5g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.4gr
CaCl ₂	0.01gr
L-Glutamic acid	0.2 gr
B) Glutation	100mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	10mg
L. Cysteine HCl (Sigma)	40mg
Ascorbic acid	20mg
Nicotinic acid	4mg
L-Prolin	120mg

Kısım (A)nın pH'ı HCl ile 7,2'ye ayarlanır, 120°C'de 20 dakika otoklavda steril edilir. Kısım (B) membran filtrede steril edilir ve soğutulmuş kısım (A)'ya ilave edilir.

YÖNTEMLER

Suşlarda aglütinojen tayini:

Aglütinasyon testinde kullanılacak suşların aglütinojen tayini %0.1 sodyum azid içeren tuzlu su ile sulandırılmış her üç aglütinojene ait liyofilize antiserumlar kullanılarak yapıldı. Bunun için lâm üzerine bir damla antiserum damlatılarak bir öze dolusu Modifiye Cohen-Wheeler besiyerinde üretilmiş olan B. pertussis bakterisi alınarak karıştırıldı. Bir dakika iğerisinde aglütinasyon görölüp görölmediği kaydedildi.

Her bir suş üç antiserum ile de reaksiyona sokuldu. Antiserumların üçü ile reaksiyon veren suşlar faz I olarak kabul edildi.⁵²

Deneysel aşı üretimi³³:

1. Seed lot kùltür : Liyofilize suşların her biri steril fizyolojik tuzlu su ile sulandırılarak, iğerisinde Modifiye Cohen-Wheeler besiyeri bulunan yatık tüplere aktarılıp, 37°C'de 72 saat inkübe edildi. Kùltür, 48 saat aralıklarla yapılan ikinci ve üçüncü pasajlardan sonra 5cc steril fizyolojik tuzlu su ile sulandırılarak aşı üretimi için iğerisinde 125cc katı Modifiye Cohen - Wheeler besiyeri bulunan Roux şişelerine aktarıldı.

2. Aşı kùltürü : Üretim için ekim yapılan Roux şişeleri 48 saat 37°C'de inkübe edildi. Kùltürlerin kontaminasyon yönünden incelenmesinden sonra saf kùltürler kapalı şişelere steril şartlarda toplandı.

3. İnaktivasyon: Toplanan ana süspansiyon, su banyosunda 56°C'de 30 dakika bekletilerek inaktive edildi. Oda ısısında soğutulduktan sonra son aşıda %0.01 oranında olacak şekilde thiomersal ilave edildi.

4. Jerm tayini : 630nm'de OD değeri ölçülen ana süspansiyonun jerm miktarı, Dünya Sağlık Örgütü Standartlarına göre elde edilen kalibrasyon eğrisine dayanılarak belirlendi.

Daha sonra ana süspansiyon, jerm miktarı 15 milyar/ml olacak şekilde sulandırılarak steril olarak şişelendi.

5. Toksikite testi : Aşının toksik özelliğini belirlemek amacı ile yapılan bu test, farelerin aşılama öncesi ve sonraki kilo artışlarının değerlendirilmesi esasına dayanır. Bu amaçla;

- Her aşı için, seçilen aynı cinsteki 14-16 gramlık 10 farenin aşılama öncesindeki toplam kilo durumları belirlendi.

- Daha sonra aşılar 0.5 ml olarak her fareye periton içi olarak verildi. Ayrıca kontrol için seçilen gruba 0,5 ml fizyolojik tuzlu su enjekte edildi.

- Aşılama sonrası her 72 saatte ve 7. günde farelerin kilo artışları tesbit edildi.

Toksikite testinin değerlendirilmesinde;

- 72. saatteki toplam kilo artışının aşılama öncesi kilo durumundan düşük,

- 7. gün sonundaki kilo artışının, kontrol grubundaki artışın %60'ından az ve ölüm oranının %5'den fazla olup olmadığı belirlendi.

Kobaylarda aktif başışıklama ve kan örneklerinin alınması:

Her suşa ait boğmaca aşısı, tam homojenize edildikten sonra üçer kobaya derialtı yol ile 1 ml enjekte edildi. Ayrıca üç kobay kontrol grubu olarak bekletildi. Enjeksiyondan dört hafta sonra kobayların kalbinden 1-2 ml kan alındı. Kanların serumları ayrılarak -20°C'de saklandı. Aglütinasyon ve nötralizasyon testleri çalışılmadan önce serumlar 56°C'de 30 dakika inaktive edildi.

Mikroaglütinasyon testi^{38,53} :

Test antijeninin hazırlanması : B. pertussis suşlarının Modifiye Cohen-Wheeler besiyerindeki 48 saatlik kültüründen tuzlu su ile sulandırılarak alınan hücreler, 10 milyar jerm/ml konsantrasyonunda olacak şekilde toplandı. Sonra üzerine son konsantrasyonu %0.2 olacak şekilde formaldehit eklenerek inaktive edildi. Bu solüsyon mikroaglütinasyon testlerinde antijen olarak kullanıldı.

- U tipi mikrotitre pleytin bir sırasında yer alan her bölüme 0.05ml PBS (pH:7,4) kondu.

- Her sıranın ilk bölümüne 0,05'er ml suşa özgü antiserum koyularak, seri sulandırmaları yapıldı.

- Daha sonra her sırada bulunan bütün bölümlere 0.05'er ml antijen solüsyonu ilave edildi ve parafilmle kapatıldı.

- 37°C'de 2 saat inkübe edildi.

- +4°C'de bir gece bekletildikten sonra sonuçlar titre değeri olarak kaydedildi.

IHA-Nötralizasyon testi:

- U tipi mikrotitre pleytin bir sırasında yer alan her bölüme 0.025ml PBS (pH:7,4) kondu.

- Her sıranın birinci bölümüne, her suşa özgü antiserumdan 0.025ml konularak, seri sulandırılmaları yapıldı.

- Bütün bölümlere 0.025'er ml FHA ilave edildi.

- Pleyt dairesel hareketlerle hafif şekilde çalkalanarak karıştırıldı.

- 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

- Her sırada yer alan bütün bölümlere 0.05'er ml PBS (pH:7,4) ile yıkanmış %0.5'lik horoz eritrositleri ilave edildi.

- Oda sıcaklığında 1 saat bekletilerek hemaglutinasyon aktivitesinin nötralize edilip, edilmediği titre değeri olarak kaydedildi.

Çeşitli suşlarda LPF ve FHA sentezinin araştırılması :

1. Modifiye Morse-Bray besiyerinde kültür :

Modifiye Cohen-Wheeler besiyerinde kültürü yapılan liyofilize B. pertussis suşları tuzlu su ile süspanse edilerek, buradan içinde 200 ml Modifiye Morse-Bray sıvı besiyeri bulunan Fernbach şişelerine 1'er ml inoküle edildi. 37°C'de inkübe edilerek 2. günden itibaren altı gün boyunca her gün örnek alınarak üreme, süpernatant

sıvısında protein ve hemaglutinasyon aktivitesi ölçüldü. Kültürün 630nm dalga boyundaki absorbans değeri üreme miktarının tayin edilmesinde kullanıldı. Süpernatant sıvısının 280nm dalga boyundaki absorbansı protein değeri olarak kaydedildi.

2. Hemaglutinasyon aktivitesinin tayini^{18,53}:

Modifiye-Morse Bray besiyerinde üretilmiş olan bakterilerin kültür süpernatantlarında LPF ve FHA moleküllerinin hemaglutinasyon aktivitesine bakılarak suşların toksin yapma özelliği araştırıldı. Bunun için, taze horoz eritrositleri PBS(pH:7,4) ile üç defa yıkandıktan sonra eritrositlerin %0.5'lik süspansiyonları yapıldı.

U tipi pleytte 0.05ml PBS ile 0.05 ml örneğin seri dilüsyonları yapılarak, üzerine 0.05ml eritrosit süspansiyonu ilave edildi. +4°C'de bir saat içinde hemaglutinasyon oluşumuna bakılarak, aktivite titre olarak kaydedildi.

BULGULAR

Modifiye Cohen-Wheeler besiyerinde üretilen çeşitli B. pertussis suşları, aglütinin 1,2 ve 3'e ait antiserumların herbiri ile reaksiyona sokularak, bunların aglütinojen tip tayini yapıldı.

Tablo 1 : Suşların antiserumlar ile aglütinasyon reaksiyonları

Suşlar	Antiserumlar		
	Aglütinin 1	Aglütinin 2	Aglütinin 3
Saadet	+	+	+
Tohama	+	+	-
Gün	+	+	-
Nursel	+	+	+
165	+	+	+
19190	+	+	-
60623	+	+	+

Tablo 1'de görüldüğü gibi Saadet, Nursel, 165 ve 60623 suşları, antiserumların her üçü ile de pozitif reaksiyon verdi. Tohama, 19190 ve Gün suşları ise aglütinin 1 ve 2 ile pozitif reaksiyon verip, aglütinin 3 ile hiç bir reaksiyon göstermedi.

Antiserumların her üçü ile de pozitif sonuç veren suşlarda aglütinojen 1, 2 ve 3 bulunduğu için faz I, aglütinin 3 ile reaksiyon göstermeyen suşlar faz II olarak kabul edildi.

Daha sonraki aşamada bütün suşlar Modifiye Cohen-Wheeler besiyerinde üretilerek deneysel tam hücre boğmaca aşılıarı hazırlandı. Hazırlanan aşılıar toksisite testlerinden geçirildikten sonra kobayların bağışıklamasında kullanıldı. Daha sonra kobaylardan alına kan örneklerinde serum antikor düzeyi belirlendi.

Mikroaglütinasyon testi ile yapılan çalışmalarda bütün serumlar hem kendi hem de diğeri antijenlerle reaksiyona sokuldu. Her serumdaki antikor düzeyi titrasyon olarak kaydedildi (Tablo : 2).

Tablo 2 : Değışik B. pertussis suşları ile bağışıklanan kobay serumlarında aglütinin titrelerinin mikroaglütinasyon yöntemiyle saptanması

Antijenler	Antiserumlar (Suşa özgü)							Kontrol
	Saadet	Tohama	Gün	Nursel	165	19190	60623	
Saadet	1/256	1/64	1/8	1/16	1/128	1/2	1/256	-
Tohama	1/512	1/256	1/2	1/512	1/4	-	-	-
Gün	1/8	1/2	-	-	-	-	-	-
Nursel	1/128	1/64	-	1/8	-	-	-	-
165	1/128	1/64	-	-	-	-	-	-
19190	-	-	-	-	-	-	-	-
60623	1/256	1/64	-	-	-	-	-	-

Tablo 2'de görüldüğü gibi serumların mikroaglütinasyon titre değerlerinin önemli oranda farklılıklar gösterdiği saptandı. Buna göre en yüksek antikor düzeyi Saadet suşu ile hazırlanan aşı ile bağışıklanan

kobayların serumlarında görüldü. Daha sonra sırasıyla Tohama, 165, Nursel ve 60623 suşları ile hazırlanan aşılarda önemli derecede antikor yanıtı oluştuğu belirlendi. Gün ve 19190 suşlarında ise son derece zayıf bir antikor yanıtı meydana geldiği gözlemlendi.

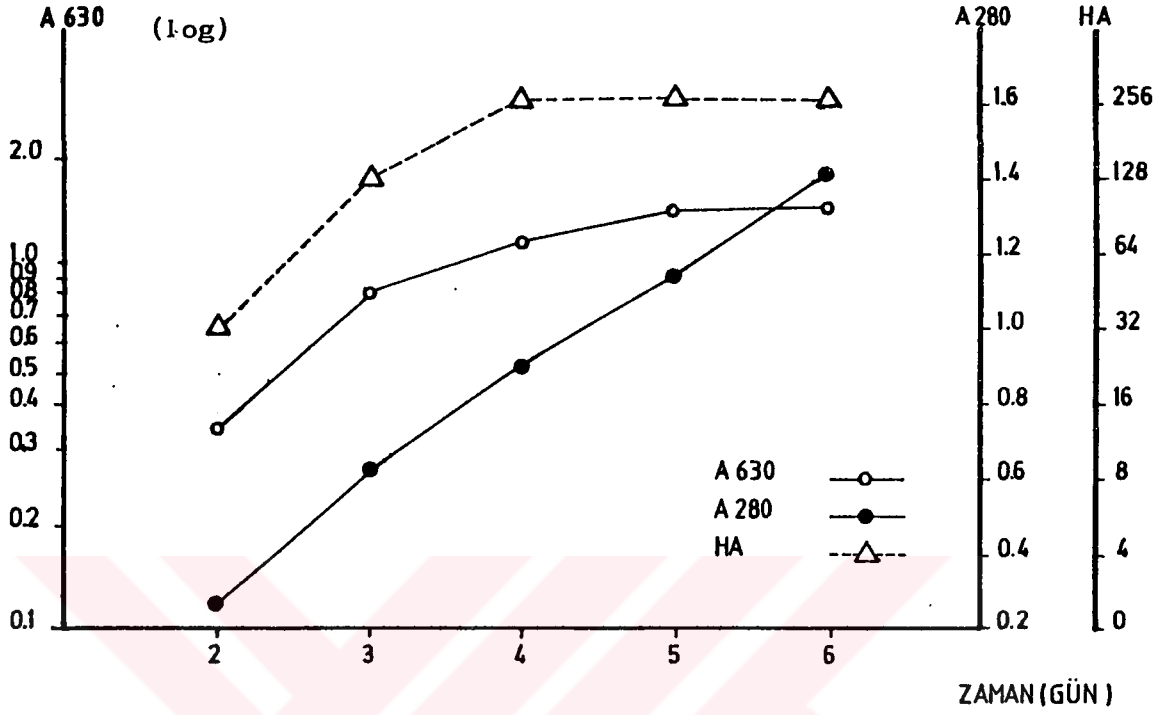
Aynı serumlarda IHA-nötralizasyon testi ile yapılan deneylerde ise anti-FHA düzeyi Tablo 3'de görüldüğü gibi genel olarak aglütinasyon sonuçları ile uyumlu olarak belirlendi.

Tablo 3 : Anti-FHA düzeyinin IHA-Nötralizasyon yöntemiyle belirlenmesi.

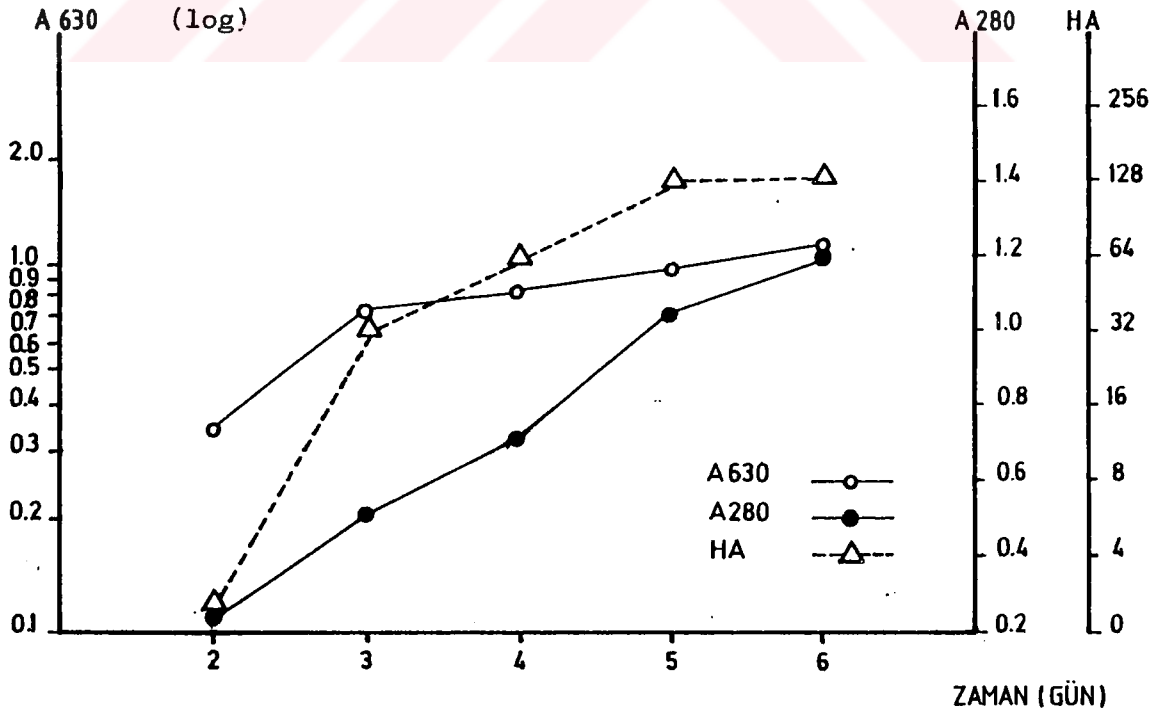
	Antiserumlar							
	Saadet	Tohama	Gün	Nursel	165	19190	60623	Kontrol
Titre	1/128	1/128	1/64	1/128	1/64	-	1/4	-

En yüksek anti-FHA düzeyinin Saadet suşu ile bağışıklanan kobaylarda oluştuğu ve diğerlerinde daha düşük düzeylerde bulunduğu görüldü. 19190 numaralı suş ile hazırlanan aşı ile bağışıklanan kobaylarda ise anti-FHA yanıtı çıkmadığı gözlemlendi.

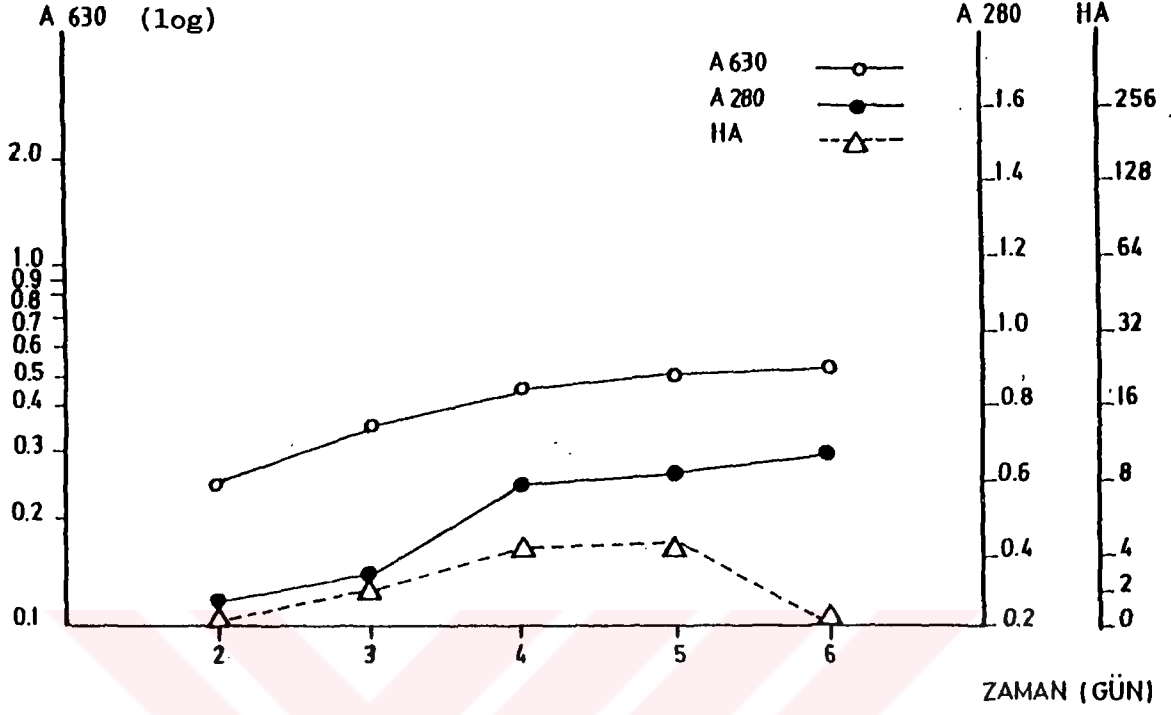
Aynı suşların Modifiye Morse-Bray sıvı besiyerindeki üreme, protein ve LPF - FHA sentez düzeyleri ise Şekil : 2-8'de görüldüğü gibi belirlendi.



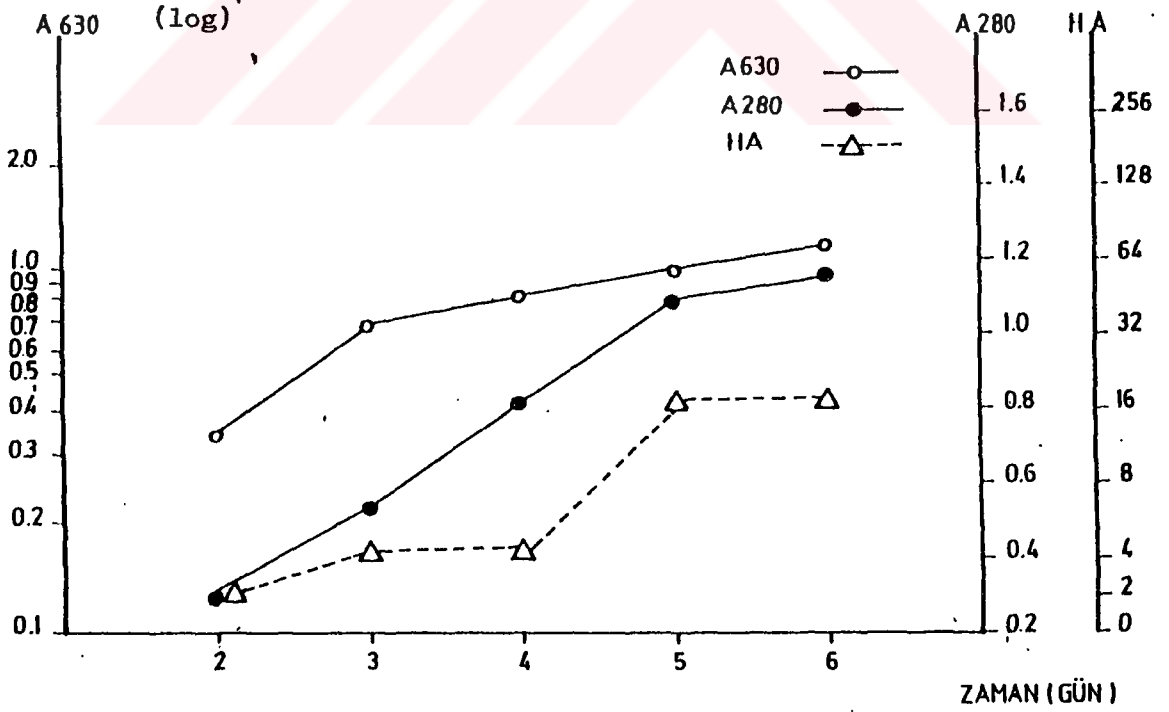
Şekil 2 : Saadet suşunun Modifiye-Morse Bray besiyerinde üreme, protein ve HA aktivitesi



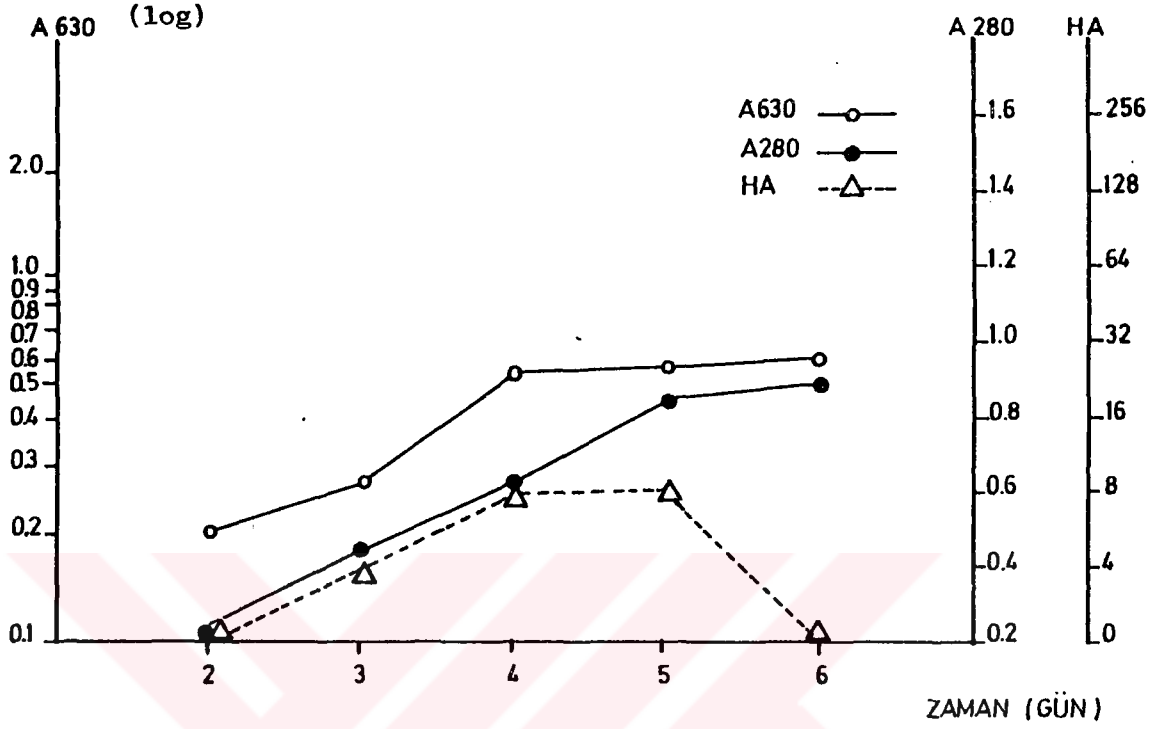
Şekil 3 : Tohama suşunun Modifiye Morse Bray besiyerinde üreme, protein ve HA aktivitesi



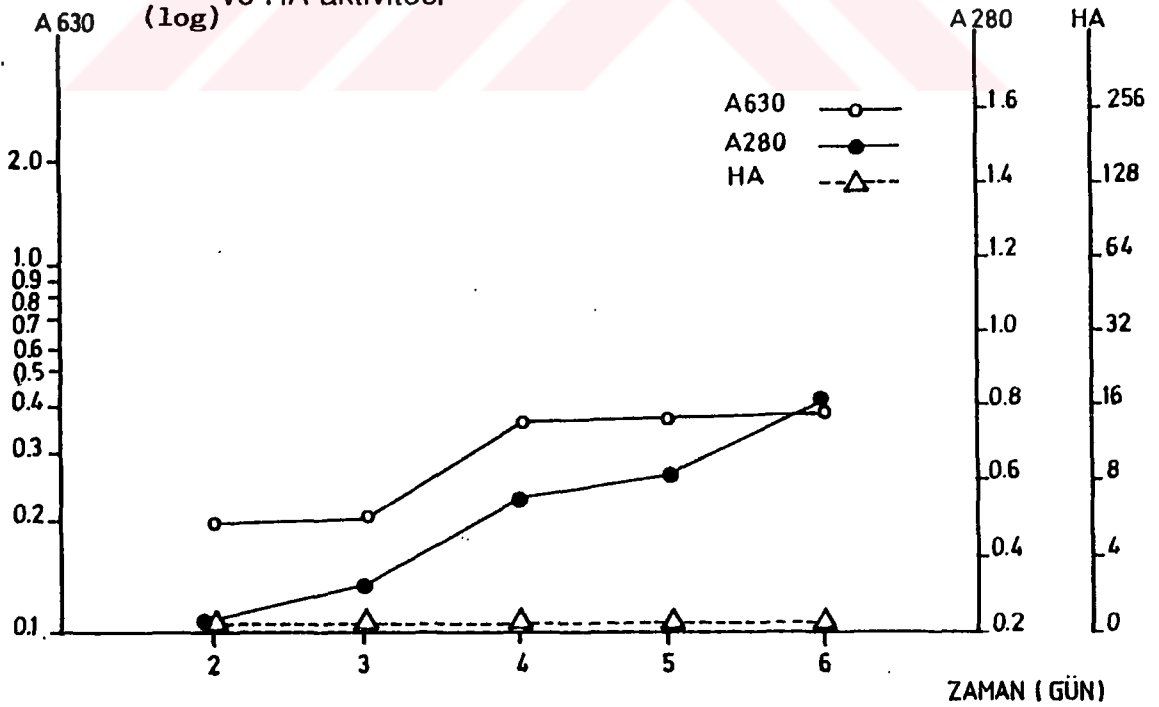
Şekil 4 : Gün suşunun Modifiye Morse-Bray besiyerinde üreme, protein ve HA aktivitesi



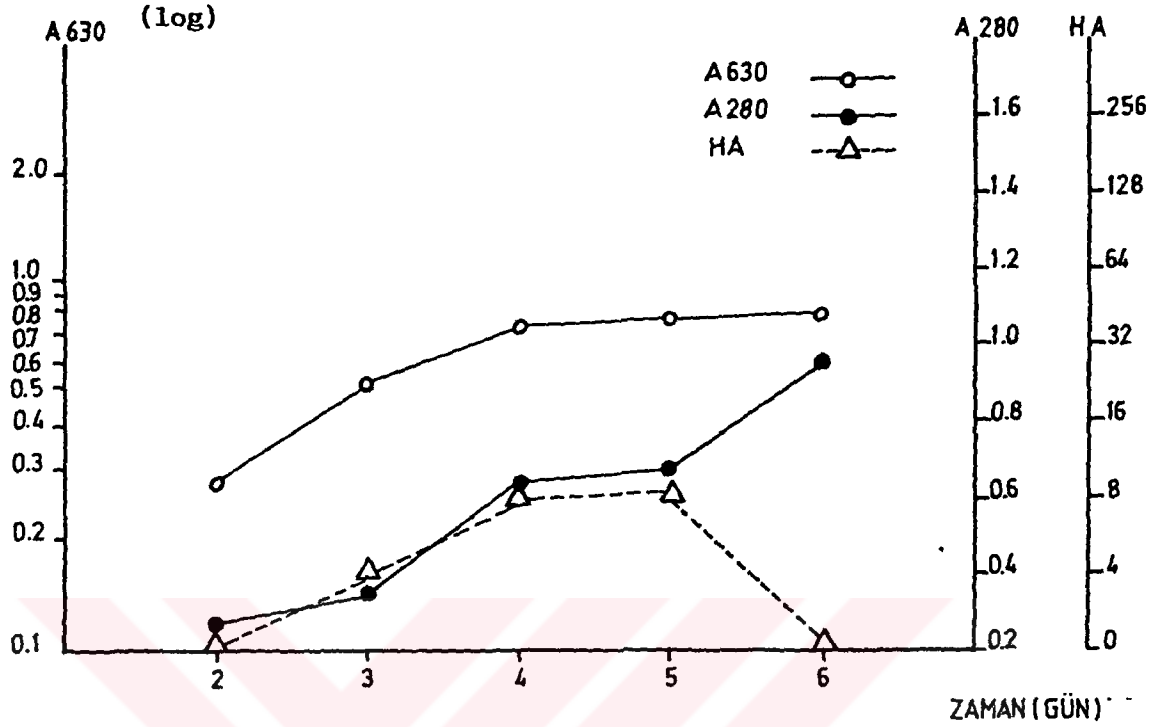
Şekil 5 : Nursel suşunun Modifiye Morse-Bray besiyerinde üreme, protein ve HA aktivitesi



Şekil 6 : 165 suşunun Modifiye Morse-Bray besiyerinde üreme, protein ve HA aktivitesi



Şekil 7 : 19190 suşunun Modifiye Morse-Bray besiyerinde üreme, protein ve HA aktivitesi



Şekil 8 : 60623 suşunun Modifiye Morse-Bray besiyerinde üreme, protein ve HA aktivitesi

Bu deneylerde; Saadet suşunun yüksek üreme aktivitesi yanında, süpernatant protein miktarı ve LPF ve FHA sentezi göstergesi olan HA aktivitesini de yüksek oranda gösterdiği belirlendi. Tohama suşunun ise, Saadet suşundan sonra yukarıdaki aktiviteler yönünden diğerlerine göre daha iyi düzeyde olduğu gözlemlendi. Diğer suşların ise Şekil 4-8'de görüldüğü gibi üreme, protein ve aktivite yönünden oldukça zayıf oldukları saptandı.

TARTIŞMA

Önemli enfeksiyon hastalıklarından olan boğmacanın etkeni *B. pertussis* bütün dünyada çok yaygın olarak bulunan bir mikroorganizmadır. Dünya üzerinde bu mikroorganizmanın identifikasyon ve karakterizasyonunun yapıldığı pek çok suşu vardır. Bu suşların yapısal özellikleri ve bağışıklık oluşturma düzeyleri birbirinden farklıdır.^{54,55}

1930'larda yapılan ilk suş karakterizasyon çalışmalarında, değişik suşların morfolojik ve antijenik yapı bakımından farklı formlarda olduğu belirlenmiştir.⁵⁴

1953'de Andersen⁵⁶ farklı *B. pertussis* suşlarının farklı antijenler içerdiğini göstermiştir. Ayrıca aglütinojenlerin immünize olmuş hayvanlarda farklı aglütininlerin meydana gelmesine neden olduğu belirtilmiştir.

Eldering ve ark.¹³ tarafından yapılan bir çalışmada *Bordetella* cinsine ait 14 tip aglütinojen olduğu gösterilmiş, bunlardan 6 tanesinin *B. pertussis* için spesifik aglütinojenler olduğu, her suшта farklı kombinasyonlarda buldukları ve bu komponentlerin miktar olarak da farklı oldukları, bu nedenle farklı antijenik özellikler gösterdikleri ileri sürülmüştür.

Bununla beraber, çeşitli vakalardan izole edilen *B. pertussis* suşlarında suşa özgü aglütinojen 1 komponentinin ortak olarak hepsinde bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca aglütinojen 2 ve 3'ün de vakalardan izole edilen suşlarda ilk zamanlarda çoğunlukla bulunduğu ileri sürülmüştür.^{52,57}

Bu nedenle bağışıklamada kullanılan aşı suşlarında bazı genel özellikler belirlenmiştir. Örneğin;

Aşı suşlarının aglütinojen 1 yanında 2 ve 3'ü de bulundurması genel olarak birinci derecede önem taşıyan bir özellik olarak kabul edilmiştir. Çeşitli çalışmalarda her üç aglütinojeni içermeyen suşlarla yapılan aşılarda kuvvetli bir bağışıklık oluşmadığı, bu nedenle 1,2 ve 3. aglütinojenin de aşılarda bulunması gerektiği ileri sürülmüştür.^{52,57}

Ancak bu aglütinojenlerin suşta bulunması yanında bunların organizmada yeterli bağışık yanıt çıkararak kendisini immünolojik olarak ifade edebilmesi son derece önemlidir. Bu önem İngiltere'de Medical Research Council⁴⁶ tarafından yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmalarda her aşının çocuklarda ve farelerde oluşturduğu aglütinin titreleri ile hastalıktan korunma veya farelerdeki koruma gücü arasında iyi bir korelasyon olduğu gözlenmiştir.^{1,7,44,54,55}

Ayrıca aşıda kullanılan suşların sahip oldukları aglütinojenler yanında diğer bazı komponentleri sentez edebilme yeteneğinde olması ve bu komponentlerin aşıda bulunması önemlidir.

Çalışmamızda özellikle bu konunun da araştırılması amaçlanmış olup, kullanılan yedi değişik suşun toksin sentezleme özellikleri ve bu suşların aglütinin yanıtı yanında anti-FHA yanıtı oluşturabilme yeteneği araştırılmıştır. Her iki özellik bakımından Saadet suşunun diğerlerine göre oldukça üstün bir suş oluşturduğu saptanmıştır. Her üç aglütinojeni de içeren ve yerli bir izolat olarak uzun senelerdir aşı

suşu olarak kullanılan Saadet suşu ile tek doz aşılanan kobaylarda yüksek titrede aglütinin ve anti-FHA antikoru oluştuğu belirlenmiştir (Tablo 2-3).

Bunun yanında Tohama suşu aglütinojen 3'ü içermemesine karşın aglütinin yanıtı ve anti-FHA yanıtı yönünden kuvvetli bir suş özelliği göstermiştir. Tohama suşunun aglütinin yanıtı çıkarma yönünden 130, 138 ve 460 suşlarına göre de daha iyi olduğu Blumberg ve ark.⁵⁵ tarafından yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir.

Çalışmamızda ise Saadet ve Tohama suşlarının Şekil 2-3'de görüldüğü gibi üreme ve toksin (LPF-FHA) sentezleme özellikleri bakımından da diğerlerine göre, üstün oldukları belirlenmiştir. Gün ve 19190 suşları ile bağışık kobay serumlarında ise aglütinin varlığı yönünden önemli bir değer gözlenmemiştir.

Mikroaglütinasyon çalışmalarında, aşının kendi suşu yanında, diğer suşlar da antijen olarak kullanılmış ve Saadet suşuna karşı aşılı kobay serumlarının diğer antijenlerle de büyük oranda yüksek titrede aglütinasyon oluşturduğu gözlenmiştir.

Bununla beraber mikroaglütinasyon sonuçları genel olarak gözönüne alındığı zaman, testte kullanılan antijenin de önemli olduğu ve bazı serumlarda kendi antijeni ile bir aglütinasyon oluşmamasına karşın diğer suşlarla örneğin, Saadet suşunun antijen olarak kullanılması halinde, aglütinin varlığının belirlenebildiği gözlenmiştir. Bu durum, suşun in vivo ifade yeteneği gibi in vitro ifade yeteneğinin de bu testler açısından son derece önemli olduğunu göstermektedir.

Bu konu ile ilgili olarak, Manclark ve ark.⁴⁴'rı da aglütinasyon testinde kullanılan diagnostik antijenin önemine değinmişlerse de uluslararası bir standart suş belirlenememiş ve aşı çalışmalarında kullanılan aşı suşunun pratik olarak bu test için önerilebileceği ileri sürülmüştür.

Ancak, bizim çalışmamızda; Tablo 2'de görüldüğü gibi Saadet ve Tohama suşlarının, özellikle Saadet suşunun, tüm aşılarda aglütinin titresini belirleme yönünden bir özellik gösterdiğini ve belki standart antijen gibi kullanılabileceğini ileri sürmek olası gözükmektedir. Tohama suşu için benzer bulgular Blumberg ve ark.⁵⁵ tarafından da ileri sürülmüş ve Tohama'nın spesifik bir determinanta karşı oluşan antikor tanımlayan bir özelliğinden söz edilmiştir.

Diğer yandan, B. pertussis suşlarının aglütinojenlerden başka AC, LPF, FHA ve 69Kda protein gibi bazı komponentleri sentez yeteneği de, tam hücre aşılarda bağışıklama yeteneği bakımından büyük önem taşımaktadır. Çünkü bu komponentler B. pertussis'in en önemli virülans faktörleri olarak bakterinin patojenliğini arttırmaktadır. Özellikle LPF, FHA ve AC en önemli virülans faktörleridir. Son zamanlarda bu komponentlerin değişik kombinasyonları ile hücre dışı boğmaca aşısı yapılmış ve bazı ülkelerde sistematik uygulamalarda kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle LPF ve FHA molekülleri hücre dışı boğmaca aşılarda başlıca komponentleri olup, bu moleküllerin koruyuculuğu gösterilmiştir. Tam hücre boğmaca aşısı ise bu komponentleri değişik miktarlarda da içermektedir. 10

LPF ve FHA genellikle patojen suşlarda birarada bulunmakta olup, ikisi de HA aktivitesine sahiptir. Bu nedenle çalışmamızda sıvı kültür süpernatantlarında HA aktivitesi test edilerek bu toksinlerin suşlara göre sentez miktarları araştırılmıştır.

Şekil 2-8'de görüldüğü gibi Saadet suşunun HA aktivitesi yönünden de diğer suşlara göre yüksek değerler gösterdiği belirlenmiş, Tohama suşunun da önemli derecede toksin sentezlediği gözlenmiştir. 19190, 165, 60623, Gün ve Nursel suşlarının ise bu yönden çok zayıf oldukları görülmüştür. Yine bu suşlarla bağışıklanan kobay serumlarında anti-FHA antikor düzeyi bakımından da Saadet ve Tohama'nın yüksek titrelerde antikor oluşturdukları gözlenmiştir (Tablo 3).

Bununla beraber, Nursel, Gün ve 165 suşları düşük derecede HA aktivitesi göstermelerine karşın, bunlarla bağışıklanan kobaylardan Gün ve 165'in serumlarında orta derecede anti-FHA düzeyi belirlenmiştir. Nursel suşu ile bağışıklanan kobay serumunda ise yüksek titrede anti-FHA saptanmıştır. 60623 suşu bu yönden çok zayıf bir yanıt oluşturmuş, 19190 suşu ise hiç bir yanıt meydana getirmemiştir.

Bu sonuçlarla, FHA molekülünün filamentöz yapısı nedeniyle iyi bir antijen olduğunu, aşıda çok az miktarlarda bulunsa da kayda değer seviyede antikor oluşturduğunu ileri sürmek mümkündür. Edwards ve ark.⁵⁴nın farklı tam hücre boğmaca aşılı ile yeni doğan ve çocuklarda yaptıkları bağışıklama çalışmalarında da FHA antikoru oluşturma yönünden aşılar arasında belirgin bir farklılık gözlenmediği bildirilmiştir. Bu durum bizim deneylerimizle uyum göstermektedir. Ancak,

LPF antikoru oluşturma açısından aşılar arasında farklılıklar olduğuna işaret edilmiştir.

Bu nedenle aşı suşu olarak kullanılacak bakterinin LPF-FHA yönünden de yüksek sentez yeteğinde yani patojenitesinin fazla olması gerektiğini vurgulayabiliriz.

Sonuç olarak; B. pertussis suşları arasında, bağışıklama gücü açısından önemli farklılıklar olduğunu ve bu farklılıkların bakterinin yapısal ve hücre dışı komponentlerinin değişik kompozisyon ve miktarlarına bağlı olduğunu bu çalışma sonuçlarını da dikkate alarak söyleyebiliriz.

Bu alışma sonunda aglütinojen 1, 2 ve 3' yapisında bulunduran her faz I suşunun in vivo olarak aynı düzeyde bağışık yanıt oluşturmadığı ve aralarında önemli sayılabilecek farklılıklar bulunduğu belirlenmiştir.

Ayrıca, alışmamızda yeni izolat Saadet suşunun tüm özellikler bakımından diğer suşlardan oldukça farklı ve üstün olduğu görülmüştür. Özellikle, Saadet suşunun B. pertussis'e özgü ortak bir determinantı serolojik olarak ortaya çıkarabilecek özellikte ve yapıda olduğunu da ileri sürebiliriz.

ÖZET

Araştırmanın birinci aşamasında, değişik B. pertussis suşlarının aglütinojen 1,2 ve 3 içerikleri yönünden lâm aglütinasyon yöntemi ile faz tayini yapıldı.

Her suşla üretilen tam hücre boğmaca aşısı ile ayrı gruplar halinde bağışıklanan kobay serumlarında mikroaglütinasyon yöntemiyle aglütinin titresi ve IHA-nötralizasyon yöntemiyle anti-FHA titresi tayin edildi. Saadet suşu ile hazırlanan aşı ile bağışıklanan kobay serumlarında en yüksek aglütinin ve anti-FHA titreleri kaydedildi.

Ayrıca her suşun sıvı besiyerinde üreme, protein ve LPF - FHA sentezleri araştırıldı. Bu sonuca göre de yine Saadet suşunun yüksek üreme ve LPF-FHA sentezleme aktiviteleri gösterdiği belirlendi.

SUMMARY

Studies on the immunization potency and pathogenicity of the different strains of *Bordetella pertussis*

At the first step of this study, the phase determination of the different *B. pertussis* strains has been carried out in term of their agglutinin 1, 2 and 3 contents by using the slide agglutination method.

Agglutinin and anti-FHA titration values of the guinea-pig sera, immunized as different groups by the whole-cell pertussis vaccines produced from each strain have been determined by using microagglutination and IHA-neutralization methods respectively. It has been recorded the highest titer of agglutinin and anti-FHA on the highest titer of agglutinin and anti-FHA on the guinea-pig sera for which immunized with the whole cell pertusis vaccine, Saadet strain.

In addition, it has been studied the production, protein and LPF-FHA synthesis of each strain in the liquid medium. It has been concluded that the Saadet strain has shown high in synthesizing of LPF-FHA and in multiplication.

KAYNAKLAR

1. CHERRY, J.D., BRUNNEL, P.A., GOLDON, G.B., KORZON, D.T. : Report of the Task Force on Pertussis and Pertussis Immunization. Pediatrics., 939-984, (1988).
2. WORLD HEALTH THE MAGAZINE OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION., January-February., (1987).
3. ÖZCENGİZ, E., GÜNALP, A. : Lenfositosis Promoting Faktör (LPF) ve Filamentöz Hemaglutinin (FHA) Moleküllerinin Bağışıklama Gücünün Farelerde Burun İçi Challenge Yoluyla Belirlenmesi. Mik. Bült., 25 : 131-137, (1991).
4. WEISS, A.A., HEWLETT, E.L. : Virulence Factors of Bordetella pertussis. Ann Rev Microbiol., 40 : 661-686, (1986).
5. DOLBY, J.M. : Bordetella, Microbiology (BRAUDE, A.I., ed.) First ed., Igaku, Shoin, Saunders International Edition, 379-287, (1982).
6. WARDLAW, A.C., PARTON, A., HOOKER, J.M. : Loss of Protective Antigen, Histamine-Sensitising Factor and Envelope Polypeptides in Cultural Variants of Bordetella pertussis. J. Med. Microbiol., 9: 89-99, (1976).
7. KETCHUM, P.A.: Microbiology (Introduction for Health Professionals), 361-363, (1984).
8. MOFFET, H.L. : Clinical Microbiology, Second ed, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, Toronto, 78-81, (1980).

9. AKMAN, M., GÜLMEZOĞLU, E. : Tıbbi Mikrobiyoloji, II. Baskı, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 374-376, (1972).
10. GALAZKO, A.M. : Pertussis. The Immunological Basis for Immunization., WHO, EPI, Genova, 1-20, (1993).
11. NİZAR, A. : Vaccination., First ed, Institut Merieux, 58, av. Leclerc 69007, Lyon-France, 131-133, (1986).
12. MILLER, J.J., SILVERBERG, R.J., SAITO, T., HUMBERG, J.B.: An Agglutinative Reaction for Haemophilus pertussis. II. Its Relation to Clinical Immunity. J. Pediatr., 22 : 644-651, (1943).
13. ELDERING, G., HORNBECK, C., BAKER, J. : Serological Study of Bordetella pertussis and Related Species. J. Bacteriol., Vol 74 : 133-136, (1957).
14. ROSS, R.F., MUNOZ, J. : Antigens of Bordetella pertussis, V. Separation of Agglutinin 1 and Mouse-Protective Antigen. Infect. Immun., 243-248, (1971).
15. PRESTON, N.W., ZORGANI, A.A., CARTER, E.J. : Location of the Three Major Agglutinogens of Bordetella pertussis by Immuno-electron microscopy. J. Med. Microbiol., 32: 62-68, (1990).
16. MACAULAY, M : The Serological Diagnosis of Whooping Cough. J. Hyg., 83 : 95-102, (1978).

17. ÖZCENGİZ, E., GÜNALP, A. : Bordetella pertussis ekzotoksinlerinden Lenfositosis-Promoting Faktör (LPF) ve Filamentöz Hemaglütinin (FHA)'nın Yeni Bir Yöntemle Saflaştırılması. Doğa-Tr. J. of. Med. Sci., 14 : 315-323, (1990).
18. ÖZCENGİZ, E., GÜNALP, A. : Bordetella pertussis Ekzotoksinlerinden Lenfositosis-Promoting Faktör (LPF) ve Filamentöz Hemaglütinin (FHA)'nın değişik Sıvı Besiyerlerinde Sentez Miktarı. Doğa-Tr. J. of. Med. Sci., 14 : 307-314, (1990).
19. ARAI, H., SATO, Y. : Separation and Characterization of Two Distinct Hemagglutinins Contained in Purified Leukocytosis Promoting Factor from Bordetella pertussis. Biochemica et Biophysica Acta., 444 : 765-782, (1976).
20. TUOMANEN, E. : Piracy of Adhesins Attachment of Superinfection Pathogens to Respiratory Cilia by Secreted Adhesins of Bordetella pertussis. Infect. Immun., 905-908, (1986).
21. ODA, M., COWELL, J.L., BURSTYN, D.G., MANCLARK, C.R. : Protective Activities of The Filamentous Hemagglutinin and The Lymphocytosis Promoting Factor of Bordetella pertussis in Mice. The J. Infect. Dis., 150: 823-833, (1984).
22. SEKURA, R.D., ZHANG, Y.L., TROLLFORS, B. : Pertussis toxin : Its Role in Pathogenesis and Immunity., Bacterial Vaccines and Local Immunity., Ann Sclavo. 1-2 : 173-174, (1986).

23. DE MAGISTRIS, M.T., RAPPUOLI, R., TAGLIABUE, A. : Human T Lymphocyte Clones Specific for Bordetella pertussis. Bacterial Vaccines and Local Immunity. Ann. Sclavo., 1-2 : 289-293, (1986).
24. ROGEL, A., MELLER, R., HANSKI, E. : Adenylate Cyclase Toksin from Bordetella pertussis. The Journal of Biological Chemistry., 255: 3154-3161, (1991).
25. MUNIER, H., BOUHSS, A., KRIN, E., DANCHIN, A., GILLES, A.M., GLASER, P., BARZU, O. : The Role of Histidine 63 in The Catalytic Mechanism of Bordetella pertussis Adenylate Cyclase. J. Biol. Chem., 267: 9816-9820, (1992).
26. LADANT, D., BREZIN, C., ALONSO, J.M., CRENON, J., GUIZO, N. : Purification and Immunological Characterization of Bacterial and Secreted Adenylate Cyclase of Bordetella pertussis. Bacterial Vaccines and Local Immunity. Ann Sclavo., 1-2 : 295-298, (1986).
27. RAPPUOLI, R., NICOSIA, A., BARTOLONI, A., ARICO, B., PERUGINI, M. : A Recombinant DNA Approach to The Pertussis Vaccine. Bacterial Vaccines and Local Immunity. Ann. Sclavo., 1-2 : 183-189, (1986).
28. ERGİNEL, A. : Difteri-Tetanoz-Boğmaca Karma Aşıları. Aşı Bilgisi, Dünya Bağışıklama Günü., Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları; 5: 51-88, (1987).
29. BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. Developments in Pertussis Vaccines : Memorandum from a WHO Meeting., 63: 241-243, (1985).

30. ASHWORTH, L.A.E., DAY, A., LAMBERT, H.P., LINGHAM, S., LISSAUER, T., MILLER, E., ROBINSON, A., RUTTER, D.A., THOMAS, M.G. : Local and Systemic Immune Responses to Pertussis to Pertussis Infection and Cellular and Acellular Vaccines. Bacterial Vaccines and Local Immunity. Ann. Sclavo., 1-2 : 199-211, (1986).
31. SATO, Y., ARAI, H. : Leucocytosis-Promoting Factor of Bordetella pertussis., I. Purification and Characterization. Infect. Immun., 6: 899-904, (1972).
32. LOTHE, R.A., FROHOLM, L.O., WESTRE, G., KJENNERUD, U. : Stainer and Scholte's Pertussis Medium with and Alternative Buffer. J. Biol. Stand., 13: 129-134, (1985).
33. WHO TECHNICAL REPORTS SERIES. Requirements for Pertussis Vaccine., 127-149, (1990).
34. ASHWORTH, L.A.E., ROBINSON, A., IRONS, L.T., MORGAN, C.P. : Antigens in Whooping Cough Vaccine and Antibody Levels. Induced by Vaccination of Children, The Lancet., 2: 878-880, (1983).
35. BARAFF, L.J., LEAKE, R.D., BURSTYN, D.G., PAYNE, T., CODY, L.C., MANCLARK, C.R., GEME, J. M. : Immunologic Response to Early and Routine DTP Immunization in Infants. Pediatrics., 73: 37-42, (1984).
36. BARKIN, R.M., SAMUELSON, J.S. GOTLIN, L.P. : DTP Reactions and Serologic Response with a Reduced Dose Schedule. The J. Pediatr., 105: 189-194, (1984).

37. BLUMBERG, D.A., : Comparison of Acellular and Whole-Cell-Pertussis. Component Diphtheria-Tetanus Pertussis Vaccines in Infants. *J. Pediatr.*, 119 : 194-204, (1991).
38. SATO, H., SATO, Y. : Bordetella pertussis Infection in Mice : Correlation of Specific Antibodies Against Two Antigens, Pertussis Toxin, and Filamentous Hemagglutinin with Mouse Protectivity in an Intracerebral or Aerosol Challenge System. *Infect. Immun.*, 46: 415-421, (1984).
39. SAVAGE, J.J., DECKER, M.D., EDWARDS, K.M., SELL, S.H., KARZON, D.T. : Natural History of Pertussis Antibody in The Infant and Effect on Vaccine Response. *J. Infect. Dis.*, 161: 487-492, (1990).
40. ÖLIN, P. : Clinical Trials of Acellular pertussis Vaccine in Sweden. An Attempt to Solve The Problem of Pertussis Vaccination. *Bacterial Vaccines and Local Immunity. Ann Sclavo.*, 1-2:165-172, (1986).
41. SATO, H., SATO, Y.: Japanese Acellular Pertussis Vaccine. *Bacterial Vaccines and Local Immunity., Ann. Sclavo.*, 1-2 : 191-197, (1986).
42. RAPPUOLI, R. : Development and Clinical Results an Acellular Vaccine Containing Genetically Detoxified Pertussis Toxin. *Biologicals. J. Biol. Stand.*, 21: 1-42, (1993).
43. GOODMAN, E.Y., WORT, A.J., JACKSON, F.L. : Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of Pertussis Immunoglobulin A in Nasopharyngeal Secretions as an Indicator of Recent Infection. *J. Clin. Microbiol.*, 13: 286-292, (1981).

44. MANCLARK, C.R., MEADE, B.D., BRUSTYN, D.G. : Serological Response to *Bordetella pertussis*. Manual of Clinical Laboratory Immunology., Third ed, American Society for Microbiology., Washington. D.C., 388-394, (1986).
45. MEDICAL RESEARCH COUNCIL. : Vaccination Against Whooping-cough : Relation Between Protection in Children and Results of Laboratory Tests. Brit. Med. J., 2:454-462, (1956).
46. MEDICAL RESEARCH COUNCIL. : Vaccination Against Whooping Cough : Final Report. Brit. Med. J., 1:994-1000, (1959).
47. ZACKRISSON, G., LAGERGARD, T., TARANGER, J., TROLLFORS, B.: Antibody Levels to Pertussis Toxin in Preschool Children in a Non Vaccinating Country. Bacterial Vaccines and Local Immunity. Ann. Sclavo., 1-2 : 347-350, (1986).
48. ZACKRISSON, G., LARGERGARD, T., TROLLFORS, B., KRANTZ, I.: Immunoglobulin A Antibodies to Pertussis Toxin and Filamentous Hemagglutinin in Saliva from Patients with Pertussis. J. Clin. Microbiol., 28: 1502-1505, (1990).
49. GRANSTRÖM, M., GRANSTRÖM, G., LINDFORS, A., ASKELÖF, P.: Serologic Diagnosis of Whooping Cough by an Enzyme Linked Immunosorbent Assay Using Fimbrial Hemagglutinin as Antigen. J. Infect. Dis., 146: 741-745, (1982).

50. GIAMMANCO, A., CHIARINI, A., STROFFOLINI, T., MATTIA, D.D., CHIARAMONTE, M., MOSCHEN, M.E., MURA, I., RIGO, G., TAORMINA, S., SARZONA, A., MAZZA, G., SCARPA, B. : Seroepidemiology of Pertussis in Italy. *Rev. Infect. Dis.*, 13: 1216-1220, (1991).
51. MERTSOLA, J., RUUSKANEN, O., KURONEN, T., VILJANEN, M.K. : Serologic Diagnosis of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Bacterial Agglutination. *J. Infect. Dis.*, 147: 252-257, (1983).
52. PRESTON, N.W. : Effectiveness of Pertussis Vaccines. *Brit. Med. J.*, 2 : 11-13, (1965).
53. ZHANG, J.M., COWELL, J.L., STEVEN, A.C., CARTER, P.H., McGRATH, P.P., MANCLARK, C.R. : Purification and Characterization of Fimbriae Isolated from *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 48: 422-427, (1985).
54. EDWARDS, K.M., DECKER, M.D., HALSEY, N.A., KOBLIN, B.A., TOWNSEND, T., AUERBACH, M., KORZON, D.T. : Differences in Antibody Response to Whole - Cell Pertussis Vaccines. *Pediatrics.*, 88: 1019-1023, (1991).
55. BLUMBERG, D.A., PINEDA, E., CHERRY, J.D., CARUSO, A., SCOTT, J.V. : The Agglutinin Response to Whole Cell and Acellular Pertussis Vaccines is *Bordetella Pertussis* Strain Dependent. *AJDC.*, 146: 1118-1150, (1992).

56. ANDERSEN, E.K. : Serological Studies on *H. pertussis*, *H. parapertussis* and *H. bronchisepticus*. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 33: 202-224, (1953).
57. ABBOTT, J.D., PRESTON, N.W., MACKARY, R.I. : Agglutinin Response to Pertussis Vaccination in The Child. *Brit. Med. J.*, 1: 86-88, (1971).

ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında Gemerek'te doğdum. İlk, orta ve lise tahsilimi Ankara'da tamamladım. 1985 yılında girdiğim Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünden 1989 yılında mezun oldum. 1990-1992 yıllarında SSK Meslek Hastalıkları Hastanesinde biyolog olarak görev yaptım. 1992 yılında Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans programına başladım. Halen bu programa devam etmekte ve Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, Aşı-Serum Üretim ve Araştırma Müdürlüğünde biyolog olarak görev yapmaktayım.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

**Tez Konusu : Değişik Bordetella pertussis suşlarında bağışıklama
gücü ve patojinite yönünden yapılan çalışmalar.**

Hazırlayan : Gülnur TARHAN

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Semra KUŞTİMUR

Anabilim dalı : Mikrobiyoloji

Tarih : 1994

Statü : Yüksek Lisans

ÖZET

Araştırmanın birinci aşamasında, değişik B. pertussis suşlarının aglütinojen 1,2 ve 3 içerikleri yönünden lâm aglütinasyon yöntemi ile faz tayini yapıldı.

Her suşla üretilen tam hücre boğmaca aşısı ile ayrı gruplar halinde bağışıklanan kobay serumlarında mikroaglütinasyon yöntemiyle aglütinin titresi ve IHA-nötralizasyon yöntemiyle anti-FHA titresi tayin edildi. Saadet suşu ile hazırlanan aşı ile bağışıklanan kobay serumlarında en yüksek aglütinin ve anti-FHA titreleri kaydedildi.

Ayrıca her suşun sıvı besiyerinde üreme, protein ve LPF - FHA sentezleri araştırıldı. Bu sonuca göre de yine Saadet suşunun yüksek üreme ve LPF-FHA sentezleme aktiviteleri gösterdiği belirlendi.

**Tez Konusu : Değişik Bordetella pertussis suşlarında bağışıklama
gücü ve patojenite yönünden yapılan çamışmalar.**

Hazırlayan : Gülnur TARHAN

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Semra KUŞTİMUR

Anabilim dalı : Mikrobiyoloji

Tarih : 1994

Statü : Yüksek Lisans

SUMMARY

Studies on the Immunization potency and pathogenity of the different strains of Bordetella pertussis

At the first step of this study, the phase determination of the different B. pertussis strains has been carried out in term of their agglutinin 1, 2 and 3 contents by using the slide agglutination method.

Agglutinin and anti-FHA titration values of the guinea-pig sera, immunized as different groups by the whole-cell pertussis vaccines produced from each strain have been determined by using microagglutination and IHA-neutralization methods respectively. It has been recorded the highest titer of agglutinin and anti-FHA on the highest titer of agglutinin and anti-FHA on the guinea-pig sera for which immunized with the whole cell pertusis vaccine, Saadet strain.

In addition, it has been studied the production, protein and LPF-FHA synthesis of each strain in the liquid medium. It has been concluded that the Saadet strain has shown high in synthesizing of LPF-FHA and in multiplication.