

283925

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Mikrobiyoloji Bölümü

SALMONELLA TYPHI'de KORUYUCU ANTİJEN  
ARANMASI

(Doktora tezi)

Hazırlayan

SEVGİ TÜRET

Temmuz  
1970, Ankara

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No:</u>
ÇALIŞMANIN AMACI . . . . .	1
GİRİŞ . . . . .	2
MATERYAL VE METOD . . . . .	7
SONUÇLAR . . . . .	14
Aglütinasyon denemeleri . . . . .	14
Presipitasyon denemeleri . . . . .	18
TARTIŞMA . . . . .	32
ÖZET . . . . .	38
KAYNAKLAR . . . . .	41

## ÇALIŞMANIN AMACI

Tifo çok eski zamanlardan beri bilinen bir enfeksiyon hastalığıdır. Zaman zaman toplumlar arasında salgınlar yaparak çok sayıda insanın ölümüne sebep olmuştur. Bu durumu göz önüne alan hekimler, ciddi korunma tedbirleri alınması gerektiğine inanmışlardır. İşte bu nedenle, sağlam şahısların hastalığa yakanlanmalarını önlemek amacı ile aşılar hazırlanmıştır. XX. yüzyılın başlarında antijen-antikor ilişkileri ayrıntılı olarak incelenmeye başlanınca, her enfeksiyon hastalığında olduğu gibi Tifo'da da bağışıklık sorunu üzerine yönelinmiştir.

Tifo enfeksiyonu geçiren kimselerin sorumlunda teşekkül eden koruyucu antikorların, aşılannak suretiyle bağışıklık kazanmış şahısların serumundaki antikorlara oranla, bazı fraksiyonları bakımından farklılık gösterebileceği düşünülmüş ve çalışmalar ilerledikçe Tifo'daki bağışıklığın, yalnız antijen antikor meselesi olmadığı, hümmoral bağışıklık yanında hüccresel bağışıklıktan da söz edilebileceği anlaşılmıştır.

Tifo enfeksiyonundan veya aşılannmadan sonra teşekkül eden bağışıklık meselesi, bugün bile tartışma konusudur, bir çok nedenlerle henüz aydınlanmamış kısımları mevcuttur.

Biz de bu konudaki çalışmalara bir katkıda bulunabilmek amacı ile, antijenik yapılarını bildiğimiz çeşitli Salmonella ve bazı enterobacteriaceae familyası tiplerine karşı tavşanlardan elde ettiğimiz bağışık serumları, Tifo enfeksiyonu geçiren hastaların ve aşılannmak suretiyle bağışıklık kazanmış çocukların serumlarını aglütinasyon ve presipitasyon deneyleri ile karşılaştırdık.

## GİRİŞ

Salmonella türü bakteriler, insanlar ve sıcak kanlı hayvanlar için patogen olan mikroorganizmlerdir. İnsanlarda değişik klinik tabloda septisemi, gastro-enteritis ve besin zehirlenmelerine sebep olurlar.

İlk kez, 1880 yılında Eberth <sup>1</sup>, Tifo hastalığından ölmüş bir kimsenin dalak ve mezenter lenf bezlerinde Tifo basillerini görmüş, 1882 de Gaffky bakteriyi ayırıp saf kültürünü elde etmiştir. Daha sonra Salmon'un bu bakterilerin bugünkü tanıdığımız Salmonella türüne ait olduğunu ortaya koyması ile, bu araştıracının adına saygı maksadıyla SALMONELLA bakterileri denmiştir. Salmonella'lar, bakteriyologların ve serolojistlerin üzerinde en çok çalıştığı bir gruptur. Şimdiye dek 1000 den fazla serotipi tespit edilmiş olup, her sene de yeni serotipler eklenmektedir <sup>2</sup>. Enterobacteriaceae familyasına mensupturlar. Bu cins içinde yalnız insanlarda ve yalnız hayvanlarda veya her ikisinde de hastalık meydana getiren bir çok bakteriler bulunmaktadır. Gram-negatif, Laktozu fermante etmeyen, hareketli sporsuz, fakültatif anaerob mikroorganizmlerdir. Bir çok şekerlere etkilidirler. Şeker fermentasyonu çeşitli türlerin ayırt edilmesinde kullanılabilirse de, bu usul, antijen analizleri kadar güvenilebilir sonuç vermez <sup>3</sup>.

Salmonella'ların Kauffmann <sup>4</sup> tarafından yapılan sınıflandırması, absorbe edilmiş serumlarla yapılan aglütinasyon deneylerine dayanmaktadır. Salmonella türleri, biyosimik deneyler ve antijen analizleri ile teşhis edilebilirler. Bu bakterilerin, serolojik özelliklerinin değerlendirilebilmesi için antijenik yapılarının ve bunların immuno kimyasının bilinmesi gerektir.

Salmonella'ların başlıca 3 tip antijenleri vardır<sup>5</sup>.

1. "H" ya da kirpik antijenleri: Isıya, asidlere ve alkole dayanıksız antijenlerdir. Yalnız hareketli Salmonella'larda bulunur.

2. "O" ya da Vücut (somatik) antijenleri: Isıya, alkol ve sulu asidlere dayanıklıdır. Bütün Salmonella'larda bulunur.

3. "Vi" antijenleri: 60°C de ısıtmak suretiyle, veya asidler veya fenolle tahrip edilebilir. Bu antijenler, bakterinin anti-O serumu ile aglütinasyonuna engel olurlar.

Salmonella'ların "O" antijenik özelliği mikroorganizmanın hücre duvarındaki özel yapısından dolayıdır. Çeşitli metodlarla yapılan ekstraksiyonlarla "O" antijeninin özgül polisakkarit, lipoid ve protein gibi kompleks yapılardan meydana geldiği tespit edilmiştir. "Vi" antijeninin bileşimi ise bir gliko-lipid olup bu antijenin bulunuşu bakterinin fagositazonu zorlaştırır<sup>6</sup>. "Vi" antijeni taşıyan Salmonella typhi suşlarının, bakteriyofajlarla tiplendirilmesinde özel bir değeri vardır.

Salmonella serotipleri arasındaki çapraz reaksiyon IX, XII somatik antijenleri veya "d" flageller antijeni ile ilgilidir.

Bir çok organizmlerin "Vi" antijeni farklıdır. S şeklinde bulunan Salmonella tipleri taşıdıkları müşterek antijenik faktörlerden dolayı birbirleri ile serolojik ilişkiler gösterirler. Terminal şeker olarak isimlendirilen ve Salmonella'lara "O" antijenik özelliğini veren şekerler, saf olarak da elde edilmiştir. Bunlar sığır veya yumurta albüminine bağlandıktan sonra elde edilen suni antijenler ile özgül serumların elde edilmesi mümkündür. Yine bu serumlar özgül antijenler ile presipitasyon ve presipitasyon önlenim reaksiyonları vermektedirler.

## BAĞIŞIKLIK

Salmonella typhi, Salmonella paratyphi A, Salmonella paratyphi B gibi tipler insanlarda septisemi yapabildikleri gibi vücudun lenf sistemi ile çeşitli organlarında yerleşebilirler.

Tifo enfeksiyonlarının aşı ile önlenbilmesinin mümkün olup olmayacağı XIX. yüzyılın sonlarına doğru denenmeye başlanmıştır. <sup>7</sup>

Bir çok hastalıklara karşı bir veya en fazla iki çeşit aşı kullanılırken, Tifo için çok çeşitli aşilar ortaya konmuştur. Besredka'nın dediği gibi "Aşı ambarları Tifonunki kadar bol olan hiç bir hastalık yoktur". Tifo aşısı konusundaki ilk denemeler laboratuvar hayvanları üzerinde yapılmıştır. Tifo basillerinin virulansının ve koruyuculuğunun gösterilmesinde en iyi deney hayvanının, fareler olduğu bulunmuştur. <sup>8</sup>

İlk aşı denemelerinde bir kısım araştırmacılar, Tifo enfeksiyonunda aşının koruma değerinin olduğundan bahsederken, bir kısmı hiç koruma değerinin olmadığını savunmuşlardır. <sup>9</sup> İlk denemelerde aşı, küçük dozlarda canlı veya 60°-120°C de ısıyla öldürülmüş olarak kullanılmıştır. Daha sonra yüksek derecelerde ısıtmak, süzmek, mekanik işlemler veya otoliz yoluyla bakterileri parçalamak şimik maddelerin tesirinden faydalanmak gibi metodlar denenmiştir. Isı yerine kloroform, eter, aseton veya alkolle öldürmek prensibine dayanılarak aşı hazırlamak gibi teknikler uygulanmıştır. Kuvvetli ve emin bir bağışıklık temini için, damar içi, oral veya adaleye aşı tatbiki yapılmış ve bu amaçla uzun yıllar harcanmıştır. Oral aşı tatbikinde hümorale immunite yanında lokal immunite de bahis konusu olmuştur. Isı ile öldürülerek ağızdan verilen basillerin, bağışıklık yönünden daha etkili olduğu ileri sürülmüştür. <sup>39</sup>

İnsanlarda ilk aşı denemesini Almanya'da Pfeiffer ve Kolle yapmıştır. Bu araştırmacılar 60°C de ısıtıp Lizol veya fenol ile

korudukları aşığı kullanmışlardır. Daha sonra 1905 yılında Russel tarafından Tifo aşısı saha denemelerine başlanmıştır.

Tifo antijenlerinin kimyasal yapıları üzerindeki çalışmalar geliştikçe, aşı metodları üzerindeki çalışmalarda da ilerlemeler kaydedilmiştir. "H", "O" ve "Vi" antijenlerinin belirli şekilde aydınlanması, bilhassa "Vi" antijeninin tam olarak tanınmasından sonra aşı hazırlama tekniklerinde çok değişiklikler yapılmıştır. Bir çok araştırmacı Tifo aşısının "O" ve "Vi" antijenlerine sahip bulunması gerektiğini ileri sürmüştür. <sup>10, 11</sup> Tifo immunizasyonunda "Vi" antijeninin büyük rol oynadığı fikrinin savunulduğu yıllarda, ısı, fenol veya formol "Vi" antijenini kısmen de olsa harabedebileceği için alkol ile öldürülmüş aşuların kullanılmasına başlanmıştır. Alkol ile hazırlanmış Tifo aşuları ile immunizasyondan sonra "Vi" antikorlarında daha yüksek titre bulunmuştur. Fakat "Vi" antikorları, Tifo enfeksiyonuna karşı farelerde koruma gösterdiği halde insanlarda kayde değer bir önem göstermemiştir.

Bugün de halâ Tifo'daki immunizasyon mekanizmasında rol oynayan antijenik fraksiyon bilinmemektedir. Toba ve Koba Yaski, Tifo'daki immunizasyonun hüморal bir bağışıklıktan çok hücre sel olabileceğine işaret etmişlerdir. <sup>12</sup> İnsanlarda enfeksiyon yapan Tifo türünün, hayvanlarda enfeksiyon yapmayı ş nedeni gibi açıklanamayan sorunlar mevcuttur. İnsanda toxic ve allerjik reaksiyonlara sebep olmayan bir aşı kontrolü için güvenilir laboratuvar deneyleri de bulunamamıştır.

WHO Teşkilâtı 1954'den beri Merkez Laboratuvarları kurarak Tifo aşısının hazırlanmasını ve tatbikini standard hale getirmiştir. Bu çalışmalarda Tifo enfeksiyonuna karşı gittikçe azalan bir seviyede ve en az üç sene süren bağışıklık sağlama gücünde aşular hazırlanmıştır. aynı senelerde yapılan araştırmalarda Tifo aşısı için Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> suşu en uygun aşı suşu olarak kabul edilmiştir. Hazırlanan çok

çeşitli aşular arasında aseton ve fenol aşuları en çok güvenilir neticeyi vermiştir. Şempanzelerde meydana gelen Typhoid'e benzer enfeksiyon, bu aşularla geniş ölçüde korunabilmektedir. On Beşinci WHO Komitesi 1962 yılında bu iki tip aşuyu milletlerarası aşı hazırlama referansı olarak kabul etmiştir.<sup>12</sup> Laboratuvar çalışmaları ile, saha çalışmaları çoğu kez paralel gitmediği için bu konuda WHO tarafından desteklenen belirli memleketlerdeki 5 laboratuvar çalışmalarına devam etmektedirler.



## MATERYAL VE METOD

### DENEYLERDE KULLANILAN SUŞLAR

<u>Suşlar</u>	<u>Antijenik yapıları</u>	<u>Katalog No:</u>
Salmonella typhi Ty <sub>2</sub>	9, 12 Vi d	521
Salmonella loma-linda	9, 12 - a e,n,x	139
Salmonella gaminara	16 - d 1,7	150
Ballerup	- Vi -	155

Suşlar, Refik Saydam Hıfzasihha Enstitüsü Liyofilize suş koleksiyonlarından temin edildi. Liyofilize suşlar önce adi agar besiyerine ekildi, sonra "H" "O" "Vi" antijenlerini geliştirmek amacı ile özel besiyerlerinde üretildi.

#### "H" ANTİJENİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Adi besiyerinde üreyen kolonilerden Craigie<sup>13</sup> tüpüne ekim yapıldıktan 24 saat sonra, kılcal tüpten yayılarak besi yerine kadar ilerlemiş bakterilerden alınıp anti-d serumu ile l<sub>1</sub> aglütinasyonu yapıldı. "H" antijeninin geliştiğine emin olduktan sonra balon içindeki adi buyyona ekim yapıldı. 24 saat enkübe edilerek "H" antijeni gelişmiş saf kültür elde edildi.

#### "Vi" ANTİJENİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Adi besiyerinde üremiş kolonilerden düzgün kenarlı S formundaki bakteriler seçilerek Dorset<sup>14</sup> besiyerine ekim yapıldı. (Bu besiyeri yumurta ihtiva eder ve "Vi" antijeninin gelişmesini sağlar.)

Bu besiyerinde 24 saat içinde üreyen bakterilerle Anti-Vi serumu kullanılarak lâmda aglütinasyon yapıldı. "Vi" antijeninin geliştiğine emin olduktan sonra adi agara ekim yapıldı.

#### "O" ANTİJENİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Bu antijenin geliştirilmesi için özel bir besiyeri kullanılmadı. Esasen dayanıklı olan "O" antijeni için adi agar besiyerine ekim yapıldı.

Bu şekilde antijenleri geliştirilen suşlardan Salmonella typhi Ty<sub>2</sub>, Salmonella gaminara, Salmonella loma-linda ve Ballerup ile Difco anti-Vi, anti-O, anti-d serumları kullanılarak lâmda aglütinasyon denemesi yapıldı (Tablo 1).

#### HASTA SERUMLARI

Cebeci Tıp Fakültesi İntaniye Kliniğinde yatan tifo geçirmiş veya geçirmekte olan hastalardan temin edilen 12 serum üzerinde çalışıldı. Bunlardan büyük bir kısmı erken tedavi görmüş hastalardı.

#### AŞILI ÖĞRENCİ SERUMLARI

Dumlupınar İlk Okulu III. Sınıf öğrencilerinden Tifo Aşısı muntazam yapılmış ve her sene tekrarı yapılan 5 öğrenciden kan alındı. Kan serumlarında Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> den elde edilen "H", "O", "Vi" antijenleri ile aglütinasyonları yapılarak antikor titreleri ölçüldü. ve presipitasyon deneyleri yapıldı.

#### İMMUNİZASYONDA KULLANILAN ANTİJENLERİN HAZIRLANMASI

Deneylerde kullanılan Salmonella typhi Ty<sub>2</sub>, Salmonella loma-linda, Salmonella gaminara ve Ballerup suşlarından, tavşanlarda immun serum elde etmek için immunizasyon antijenleri hazırlandı.

Antijenik faktörleri geliştirilen suşlar, bol miktarda bakteri elde etmek için Roux şişelerindeki adi agara ekildi. Kültürler 18-20 saat enkübe edildi. Bu zamanın sonunda serum fizyolojik ile toplanan kültürden gram boyaması yapılarak kültürün saf kültür olduğu tesbit edildi. Toplanan bakteriler agzı kapalı şişelerde stok kültür olarak buz dolabında saklandı.

Tavşanların immunizasyonu için canlı bakteri kültürü kullanıldı. Stok kültürden McFarland IV eşeline göre sulandırılan bakteri süspansiyonları ile tavşanlar immunize edilmeğe başlandı.

Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> suşundan hazırlanan Aseton ve Fenol aşılarda WHO laboratuvarından temin edildi. Standard aşı hazırlama tekniğine göre hazırlanan Typhoid vaccine (asetone-inactivated) ve Typhoid vaccine (Heat-phenol-inactivated) ampulleri 50 ml serum fizyolojik ile sulandırıldıktan sonra kullanıldı. (Bunlar 10<sup>9</sup>/ml germ ihtiva ederler.)

#### BAĞIŞIK SERUM HAZIRLANMASI

Deneylerde kullanılan suşlara karşı bağışık serum elde etmek için 2 Kg kadar ağırlığındaki Yeni Zelanda tavşanları kullanıldı. Her çeşit antijen için üç tavşan olmak üzere 6 grup halinde deneyler yapıldı.

Tavşanlara enjeksiyonlar, 0.5 cc - 1 cc - 2 cc - 3 cc ve 4 cc olmak üzere 4 er gün ara ile 5 enjeksiyon şeklinde ve Intra-Venöz olarak yapıldı. Son enjeksiyondan sonra 7 gün beklenip, tavşanlar kesilerek bütün kanları toplandı, ve serumları ayrıldıktan sonra küçük tüplere taksim edilerek -20°C de saklandı.

#### AGLÜTİNASYON DENEYİ

Deneylerde kullanılan suşlara karşı tavşanlardan elde edilen bağışık serumların, hasta serumlarının ve aşıllı öğrenci serumlarının

Gruber-Widal deneyi ile titreleri ölçüldü. Aglütinasyon deneylerinde aglütinasyon antijeni olarak, immunizasyonda kullanılan canlı antijenler ile Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> susundan ayrılan "H", "O", "Vi" antijenleri kullanıldı. "H" antijeni elde etmek için Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> suyu yumuşak agarda üretildi, serum fizyolojik ile toplandı, 37°C de 6-8 saat bekletildikten sonra içine % 02 formalin ilâve edildi ve 24 saat bekletildi. O antijeni elde etmek için bol miktarda üretilen bakteri kültürü 100°C de 2 saat kaynatıldı. "Vi" antijeni için canlı organizmler kullanıldı. Bütün serumların 1/100 1/200 1/400 1/800 1/1600 1/3200 1/6400 1/12800 seri dilusyonları yapıldıktan sonra üzerlerine antijen ilâve edilerek 1 gece etüvde bekletildi. Sonuçlar 24 saat sonra aglütinasyon ile okundu.

#### PRESİPİTASYON ANTİJENİNİN HAZIRLANIŞI

Presipitasyon deneylerinde kullanılan solubl (suda eriyen) antijenin hazırlanması 2 ayrı teknikle yapıldı. 1- Aseton ile muamele edilerek 2- Ultra-sonic vibrasyon ile parçalayarak.

##### 1- Aseton ile muamele edilerek hazırlanan antijen:

"H", "O", "Vi" antijenleri geliştirilen bakteriler, Roux şişelerindeki adi agara ekilerek 24 saat müddetle enkübe edildi. Ertesi gün serum fizyolojik ile toplanan bakteri süspansiyonu kendi hacminin üç misli aseton ile muamele edildi.<sup>15</sup> Bakterilerin iyice karışması, 1 saat süre ile magnetik karıştırıcıda tutmak suretiyle sağlandı. Sonra arasıra çalkalanarak oda derecesinde bir gece bekletildi. Ertesi gün üstteki aseton dökülüp aynı şekilde yeni aseton ilâve edildi. Bu işleme üç gün arka arkaya devam edildi. Aseton ile karışık bakteri parçaları daha sonra Buchner hunisinden süzüldü. Sonra da havada kurutulularak, havanda dövülüp toz haline getirildi.

5 gram aseton ile kurutulmuş toz bakteri, 50 ml. distile su ile iyice süspansiyone edildikten sonra bir gece buz dolabında bekletildi.<sup>16</sup> 24 saat sonra süspansiyon santrifüj edildi, çöküntü 50 ml distile su ile tekrar süspansiyone edilip bir gece daha buz dolabında bekletildi. En son santrifüjden sonra üstte kalan sıvı ayrılıp distile suya karşı 48 saat müddetle diyaliz edildi ve diyalizden çıkarılan mayi antijen olarak kullanıldı.

## 2- Ultra-sonic-vibrasyon ile antijen hazırlanması:

Antijenik faktörleri geliştirilen bakteriler Roux şişelerindeki adi agara ekildi, 24 saat sonra üreyen koloniler serum fizyolojik ile toplandı, 50 cc lik beher-glas içine toplandı. Her bakteri ayrı ayrı Branson-sonic cihazında, buz içinde 15' 125 Watt' parçalandı. Süspansiyon 3000 devirde santrifüj edilerek üstte kalan sıvı antijen olarak kullanıldı.

## PRESİPİTASYON AGARININ HAZIRLANIŞI

Presipitasyon denemelerinde, Ouchterlony'nin<sup>17</sup> Agar-Gel-diffuzyon tekniği kullanıldı.

### Agarın Terkibi

#### Borat tamponu

Borik asid . . . . .	6.184 gr.
Sodyum tetraborat . . . . .	9.536 gr.
Sodyum klorür . . . . .	4.384 gr.
Distile su . . . . .	1000 cc.

Maddeler eritildikten sonra Ph kontrolü yapıldı (Ph 7,2-7,4) Bu şekilde hazırlanan Borat tamponundan 5 cc alınıp 94 cc serum fizyolojik ve 0.85 gr. agar (Difco) ile karıştırılıp **eritildi** ve Petri kutularına döküldü. Deneylerde 8 cm. çapındaki petri

kutuları kullanıldı ve 15 cc agar kondu. Agarın içine kontaminasyona engel olmak amacı ile 1/1000 lik Merthiolate çözeltisinden % 10 oranında ilâve edildi.

#### PRESİPİTASYON DENEYİ

Presipitasyon agarlarında, özel delici ile 5 mm çapında ve birbirinden 8 mm uzaklıkta çeşitli durumlarda delikler açılarak deneyler yapıldı. Çok değişik tertiplerde antijen ve antiserumlar açılan oyuklara konuldu. 2 gün oda derecesinde ve bir gece de buz dolabında bekletildikten sonra meydana gelen bandlar kaydedildi.

#### PRESİPİTASYON AGARLARININ BOYANMASI

Presipitasyon bandları meydana geldikten sonra boyanma işlemi yapıldı. <sup>18</sup> Anlamlı bandların meydana geldiği plâklar seçilerek önce serum fizyolojik ile yıkama işlemi yapıldı. Bir gece oda derecesinde üzerlerini kaplayacak kadar serum fizyolojik ilave edilerek bekletildi. Sonra agar plâkları üzerine yuvarlak kesilmiş, serum fizyolojikle ıslatılmış kurutma kâğıtları kondu, ve bir gece etüvde kurumaya bırakıldı. Agarlar tamamen kuruduktan sonra üzerine boya dökülerek 5 dakika müddetle çalkalanarak boyandı. Fazla boyayı ortamdaki kaldırmak için yıkama solüsyonu kullanıldı. Yıkama solüsyonu ile 20 dakika ara ile 3 kez yıkandı.

#### Deneyde kullanılan solüsyonlar

		Boya Çözeltisi	
Amido Blak	. . .	.10B . . .	. 1gr.
Asetat tamponu	. . .	. . .	.900 cc.
Gliserin	. . .	. . .	.100 cc.
		Asetat tamponu	
Asetik Asid	. . .	60 gr/lt . . .	.500 cc.
Sodyum Asetat	. . .	N/10 13.60 gr/lt	500 cc.

Yıkama Solüsyonu

Metil Alkol . . . . .	45 cc.
Asetik Asid . . . . .	10 cc.
Distile su . . . . .	45 cc.

Bu şekilde boyanan plâklardaki presipitasyon bantları mavi renkte görüldüğü için renksiz zemin üzerinde belirlendi.

## SONUÇLAR

### AGLÜTİNASYON DENEYLERİ

a) Deneyleerde kullanılan Salmonella typhi Ty<sub>2</sub>, Salmonella gaminara, Salmonella loma-linda ve Ballerup suşlarının, Difco-anti-O, anti-Vi ve anti-d serumlarıyla lâma aglütinasyonu yapıldı (Tablo 1). Kullanılan suşların Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> ile bilinen antijen benzerlikleri doğrulandı.

TABLO 1 . Deneyleerde kullanılan suşların anti-O, anti-Vi ve anti-d serumlarıyla lâma yapılan aglütinasyon sonuçları.

Bakteriler	Serumlar		
	Anti - O	Anti - Vi	Anti - d
Salmonella typhi Ty <sub>2</sub>	+	+	+
Salmonella gaminara	-	-	+
Salmonella loma-linda	+	-	-
Ballerup	-	+	-

b) Tavşanlar deneyleerde kullanılan suşlara karşı immunize edildikten sonra, serumlar, immunizasyonda kullanılan antijenlerle tüp aglütinasyonu yapıldı.



TABLO 2. Tavşanların immunizasyonunda kullanılan antijenler ve bu antijenlere karşı elde edilen anti-serumların aglütinasyon ile ölçülen antikor titreleri.

İmmünizasyon da Kullanılan Antijenler	Tavşan No:	Aglütinasyon				Titreleri			
		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
Salmonella typhi Ty <sub>2</sub> (Canlı)	1	+	+	+	neg	neg	neg	neg	neg
	2	+	+	+	+	neg	neg	neg	neg
	3	←		öldü	→				
Salmonella typhi Ty <sub>2</sub> (Fenol)	1	+	+	+	+	neg	neg	neg	neg
	2	+	+	+	+	neg	neg	neg	neg
	3	+	+	+	+	+	neg	neg	neg
Salmonella typhi Ty <sub>2</sub> (Aseton)	1	+	+	+	+	neg	neg	neg	neg
	2	+	+	+	+	neg	neg	neg	neg
	3	+	+	+	+	+	neg	neg	neg
Salmonella lomo-lında	1	+	+	+	+	neg	neg	neg	neg

TABLO 2. Tavşanların immunizasyonunda kullanılan antijenler ve bu antijenlere karşı elde edilen anti-serumların aglütinasyon ile ölçülen antikör titreleri.

İmmünizasyon da Kullanılan Antijenler	Tavşan No:	Aglütinasyon				Titreleri			
		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800
Salmonella typhi Ty <sub>2</sub> (Canlı)	1	+	+	+	neg	neg	neg	neg	neg
	2	+	+	+	+	neg	neg	neg	neg
	3	←			öldü	→			
Salmonella typhi Ty <sub>2</sub> (Fenol)	1	+	+	+	+	neg	neg	neg	neg
	2	+	+	+	+	neg	neg	neg	neg
	3	+	+	+	+	+	neg	neg	neg
Salmonella typhi Ty <sub>2</sub> (Aseton)	1	+	+	+	+	neg	neg	neg	neg
	2	+	+	+	+	neg	neg	neg	neg
	3	+	+	+	+	+	neg	neg	neg
Salmonella loma-linda (Canlı)	1	+	+	+	+	neg	neg	neg	neg
	2	+	+	+	neg	neg	neg	neg	neg
	3	←			öldü	→			
Salmonella gaminara (Canlı)	1	+	+	+	+	+	+	neg	neg
	2	←			öldü	→			
	3	←			öldü	→			
Ballerup (Canlı)	1	+	+	+	+	neg	neg	neg	neg
	2	+	+	+	+	+	neg	neg	neg
	3	←			öldü	→			

c) Tablo 2 de en yüksek aglütinasyon titresi veren tavşanların serumları, Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> den elde edilen "H", "O", "Vi" antijenleri ile aglütinasyon yapıldığında; Salmonella loma-linda O, Salmonella gaminara H, Ballerup Vi antijenleri ile en yüksek titre gösterdi. Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> susunun canlı, fenol ve aseton ile hazırlanmış antijenlerine karşı elde edilen bağışık serumlarda "H", "O", "Vi"

titreleri diğer serumlardan daha yüksek bulundu (Tablo 3).

TABLO 3 . Tavşanlardan elde edilen bağışık serumların Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> "H" "O" "Vi" antijenleri ile yapılan aglütinasyon sonuçları.

Bağışık Serumlar	Tavşan No:	Salmonella typhi Ty <sub>2</sub> antijenleri		
		H	O	Vi
S.typhi Ty <sub>2</sub> (canlı)	2	1/3200	1/3200	1/800
S.typhi Ty <sub>2</sub> (Fenol)	3	1/400	1/800	1/1600
S.typhi Ty (Aseton)	3	1/800	1/1600	1/800
S. loma-linda (canlı)	1	neg	1/3200	neg
S. gaminara (canlı)	1	1/6400	neg	neg
Ballerup (canlı)	2	neg	neg	1/1600

d) Tifo enfeksiyonu geçirmiş veya geçirmekte olan hastaların (Cebeci Tıp Fakültesi İntaniye Servisi) serumları, hazırladığımız Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> "H" "O" "Vi" antijenleri ile aglütinasyon yapıldığında bir kısmı hiç reaksiyon vermediği halde diğer bir kısmı çok yüksek olmayan aglütinasyon titreleri gösterdi (Tablo 4).

TABLO 4 . Tifo enfeksiyonu geçirmiş veya geçirmekte olan hastaların serumları ile Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> "H" "O" "Vi" antijenlerinin aglütinasyon sonuçları.

Hasta Serumları		Salmonella typhi Ty <sub>2</sub> antijenleri		
Sıra No:	Adı,Soyadı	H	O	Vi
1	H.Ö.	neg	neg	neg
2	S.H.	neg	neg	neg
3	H.N.	neg	neg	neg
4	S.Ö.	1/100	neg	neg
5	B.A.	1/100	1/200	1/100
6	A.A.	neg	1/100	neg
7	S.A.	neg	1/100	neg
8	K.K.	1/400	1/200	1/400
⑨	H.Y.	1/800	1/400	1/400
10	S.T.	1/100	1/400	1/100
11	M.K.	1/200	neg	neg
12	Ö.İ.	1/100	1/200	neg

e) Tifo aşısı olmuş öğrenci serumları ile (Dumlupınar İlk Okulu III. sınıf) aynı denemeler yapıldığında "O" antikoruna çok düşük bulunmuş 5 öğrenciden iki tanesinde 1/400 "H" antikorları, bir tanesinde de 1/200 "Vi" antikorları tesbit edilmiştir (Tablo 5).

TABLO 5. Aşılı öğrenci serumlarının Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> "H" "O" "Vi" antijenleri ile yapılan aglütinasyon sonuçları.

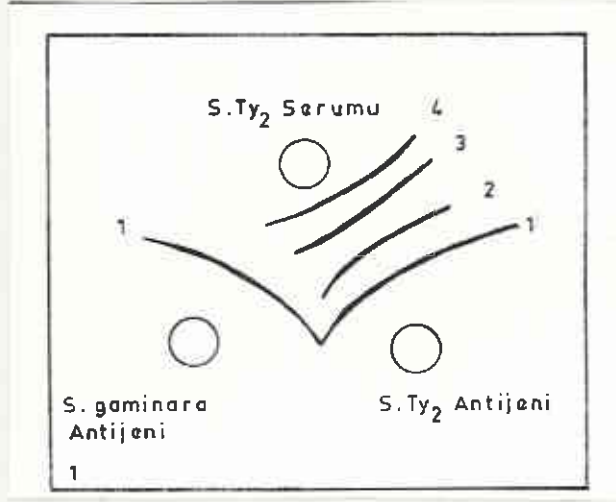
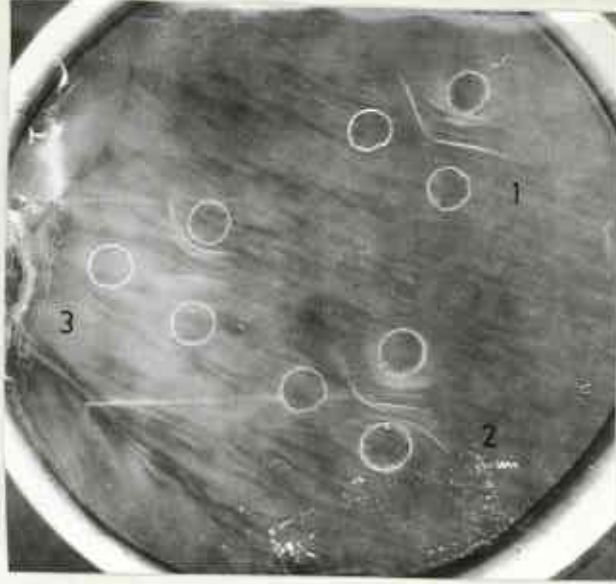
Aşılı Öğrenci Serumları		Salmonella typhi Ty <sub>2</sub> antijenleri		
Sıra No:	Adı.Soyadı	H	O	Vi
1	H.Ö.	1/200	neg	neg
2	H.Y.	1/400	1/100	neg
3	A.B.	1/400	neg	1/200
4	C.K.	1/100	neg	neg
5	A.A.	1/200	1/100	1/100

#### PRESİPİTASYON DENEYLERİ

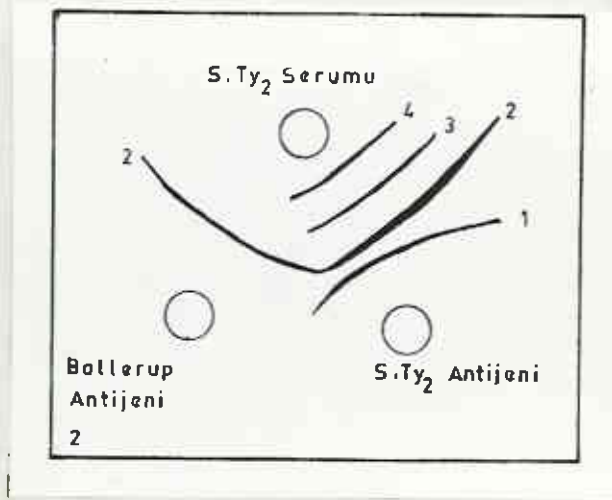
1. Elde edilen bağışık serumlar ve antijenlerle agar-gel-diffuzyonu tekniği ile yapılan presipitasyon deneylerinde:

a) Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> canlı organizmlerine karşı tavşandan elde edilen bağışık serum ile Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> presipitojeni (aseton ile hazırlanan) arasında 4 presipitasyon bandı elde edildi. Bu bandlar, antijen tarafından sayılarak 1, 2, 3, 4 diye numaralandı ve sonraki denemelerde aynı sıra takip edildi.

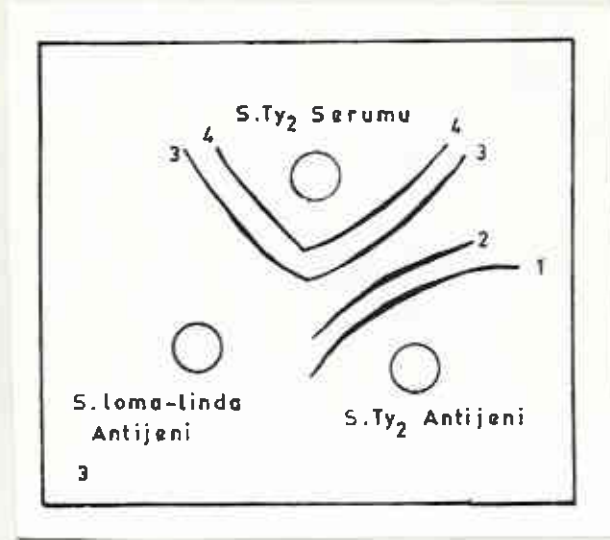
b) Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> serumu ile karşılaştırılan Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> ve Salmonella gaminara antijenleri 1 No:lu presipitasyon çizgisi (Şekil 1), Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> ve Ballerup 2 No:lu presipitasyon çizgisi (Şekil 2), Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> ve Salmonella loma-linde 3 ve 4 No:lu presipitasyon çizgileri ile iştirakli görüldü. (Şekil 3).



ŞEKİL 1 . Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> serumunun, Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> ve Salmonella gaminara antijenleri ile presipitasyon deneyinde karşılaştırılması.

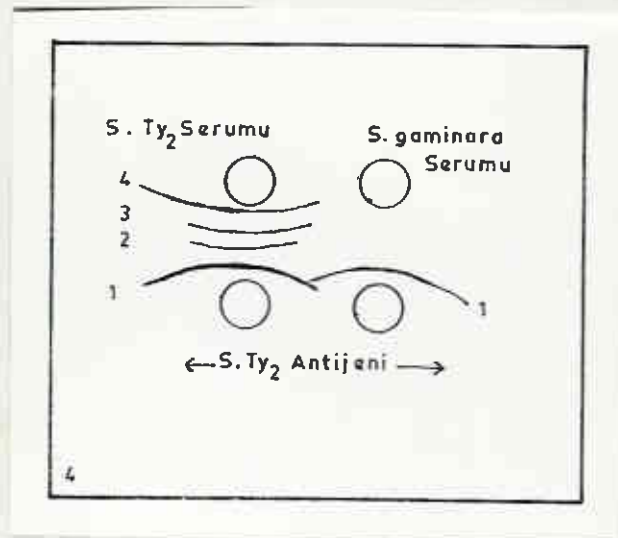
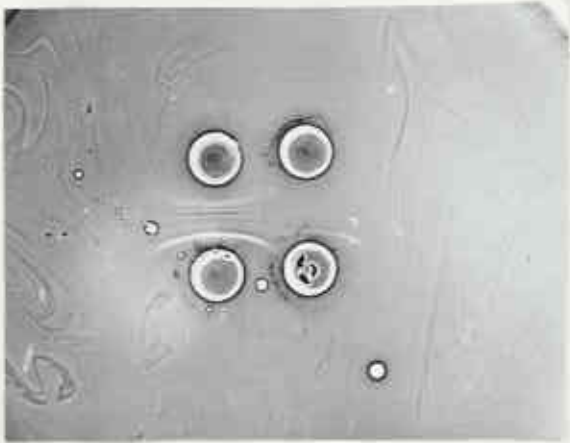


ŞEKİL 2 . Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> serumunun, Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> ve Ballerup antijenleri ile presipitasyon deneyinde karşılaştırılması.

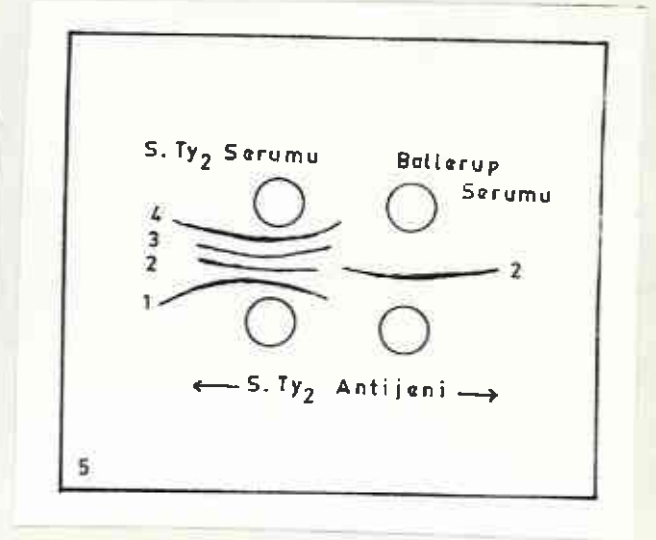
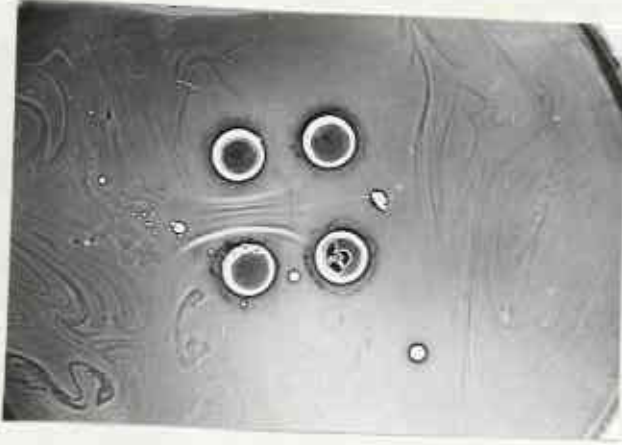


ŞEKİL 3 . Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> serumunun, Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> ve Salmonella loma-linda antijenleri ile presipitasyon deneyinde karşılaştırılması.

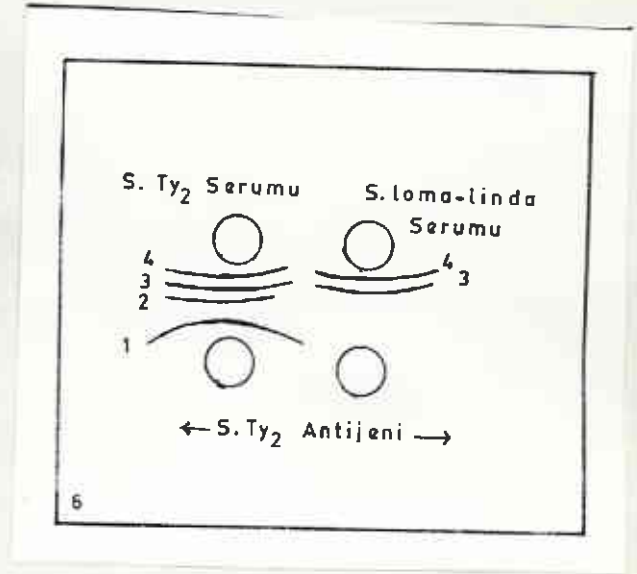
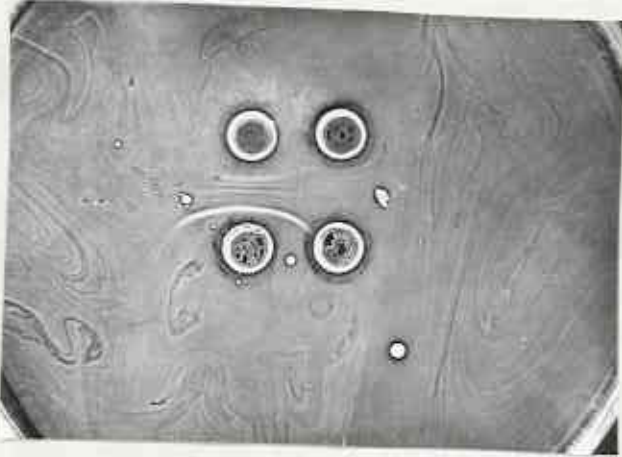
c) Bu presipitasyon denemeleri bir kez de ters olarak yapılmış, yani Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> antijeni Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> serumu ile karşılaştırılırken diğer serumlarla da karşılaştırılmıştır. Bu denemeye göre de yine Salmonella gaminara 1 No:lu presipitasyon çizgisi ile, Ballerup 2 No:lu presipitasyon çizgisi ile, Salmonella loma-linda 3 ve 4 No:lu presipitasyon çizgisi ile iştirakli identik görünüm vermiştir (Şekil 4, 5, 6, 7, 8).



ŞEKİL 4 . Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> antijeni ile Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> ve Salmonella gaminara bağışık serumlarının karşılaştırılması,

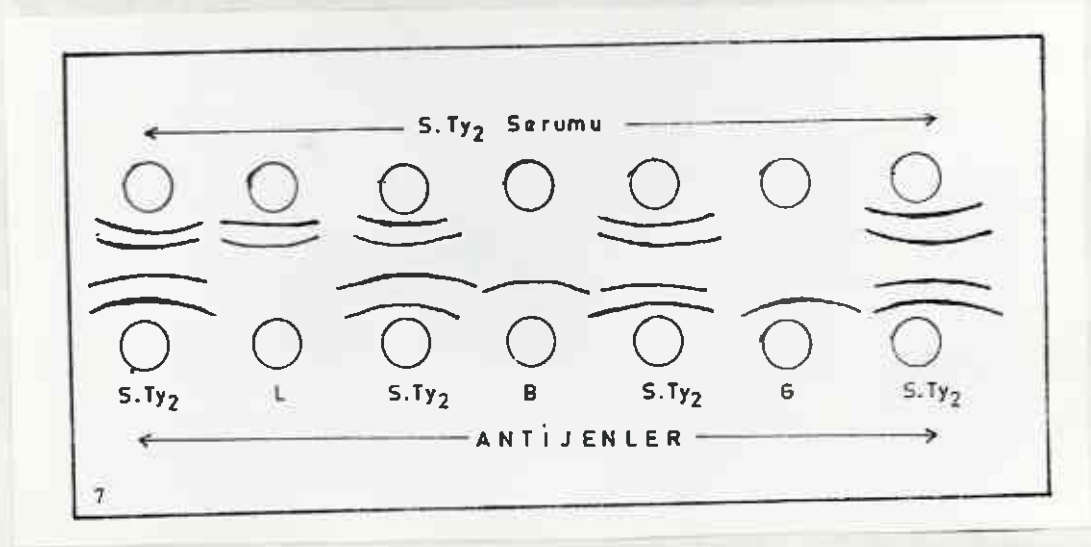
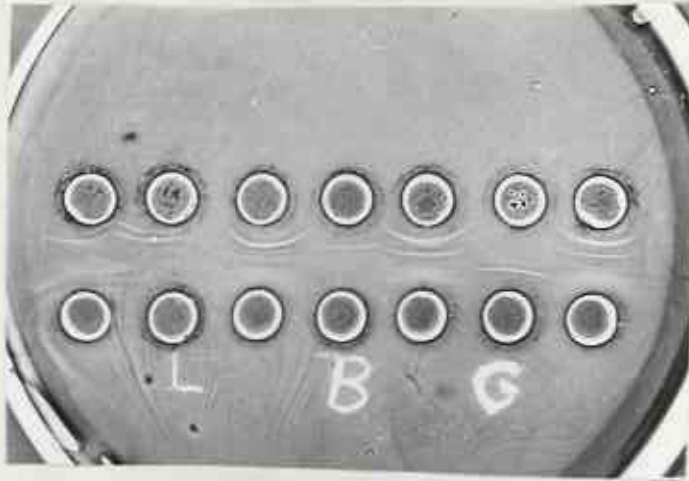


ŞEKİL 5 . Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> antijeni ile, Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> ve Ballerup bağışık serumlarının karşılaştırılması.

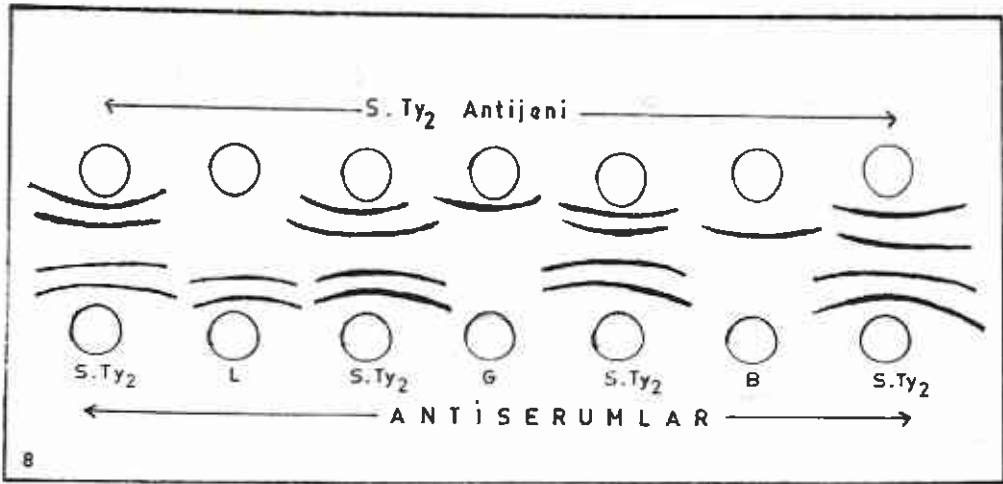
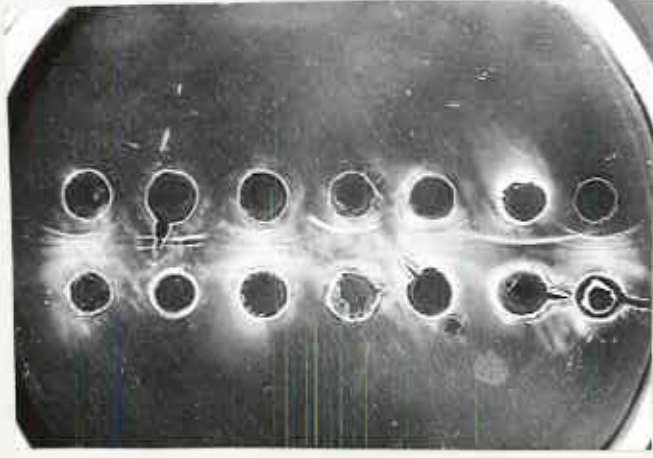


ŞEKİL 6 . Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> antijeni ile, Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> ve Salmonella loma-linda bağışık serumlarının karşılaştırılması.





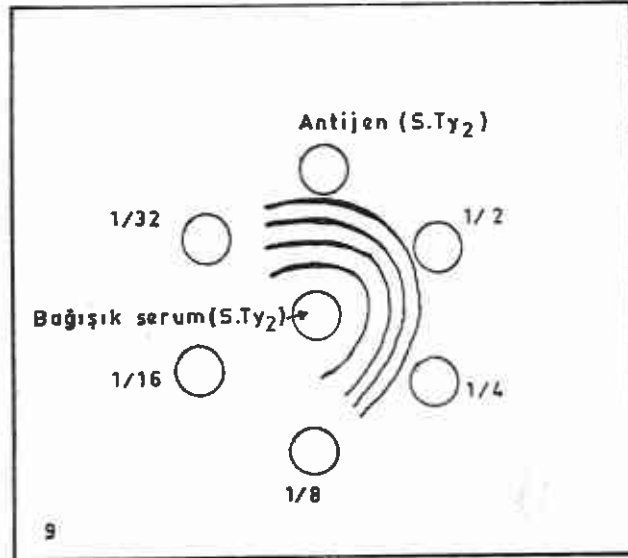
ŞEKİL 7 . Salmonella Ty<sub>2</sub> serumunun, S. loma-linda, S. gaminara ve Ballerup antiijenleri ile, aralarında S. typhi Ty<sub>2</sub> antiijeni olduğu halde karşılaştırılması.



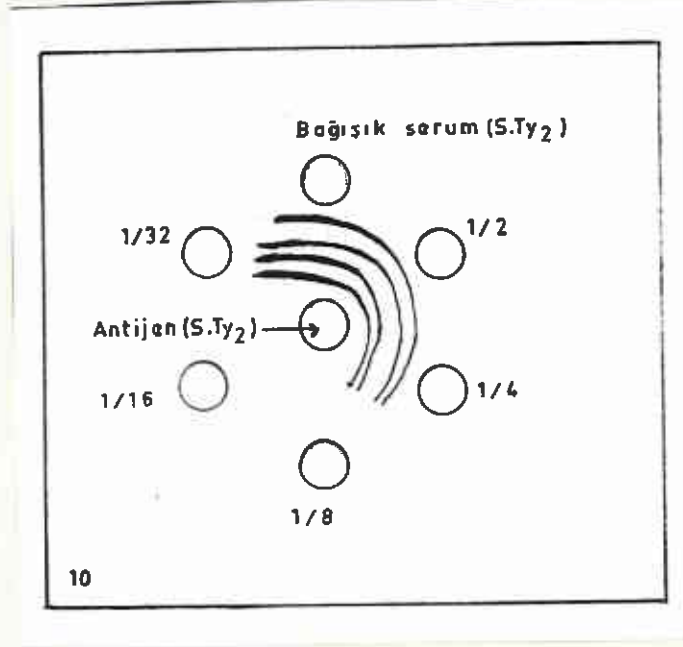
ŞEKİL 8 . Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> antijeninin, S. gaminara, Ballerup ve S. loma-linda serumları ile aralarında S. typhi Ty<sub>2</sub> serumu olduğu halde karşılaştırılması.

d) Bu sonuçlara göre presipitasyon çizgilerinden 1 No:lu bandın "H" 2 No:lu bandın "Vi", 3 ve 4 No:lu bandların da "O" anti-jenine ait olduğu anlaşılmıştır.

e) Değişik konsentrasyonların sonuçlara etkisi olabileceği düşüncesi ile deneylerde kullanılan bağışık serum ve presipitonejenleri 1/2, 1/4, 1/8 ... olarak seri sulandırılmaları yapılarak optimal oran bulundu. Agar-gel-diffuzyonunda bağışık serumlar ve presipitonejenler sulandırılmadan kullanıldığında en belirli presipitasyon bandları elde edildi. Örnek olarak Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> bağışık serumu ve antijeni ile böyle bir deneme yapıldığında Şekil 9-10 daki görünümeler meydana geldi.



ŞEKİL 9. Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> bağışık serumuna karşı Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> antijeninin seri sulandırılmaları ile yapılan presipitasyon denemesi.

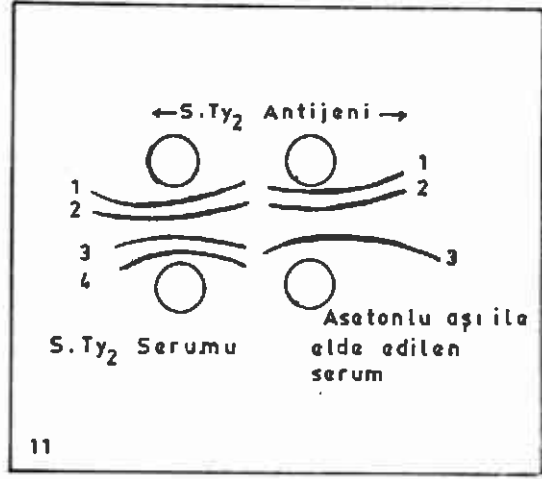
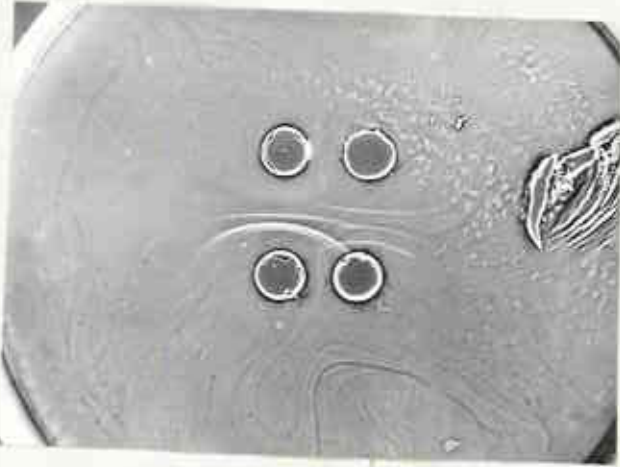


ŞEKİL 10 . Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> antijenine karşı Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> bağışık serumunun seri sulandırılmaları ile yapılan presipitasyon denemesi.

2. WHO Laboratuvarlarından temin edilen standard olarak hazırlanmış aşılarda yapılan presipitasyon deneyleri:

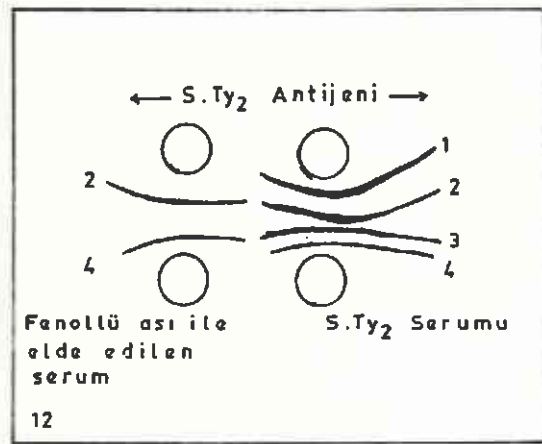
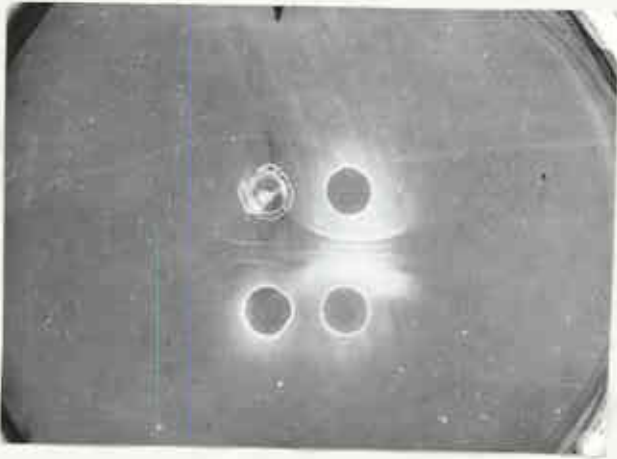
Aseton ve fenol ile hazırlanmış aşılarda immunize edilen tavşan ile serümları/ kendi hazırladığımız Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> presipitojeni arasındaki presipitasyon denemelerinde:

a) Aseton aşısı ile hazırlanan bağışık serumda 1, 2, 3 No:lu presipitasyon bandları meydana geldi, 4 No:lu yani ikinci "0" bandı görülmedi (Şekil 11).



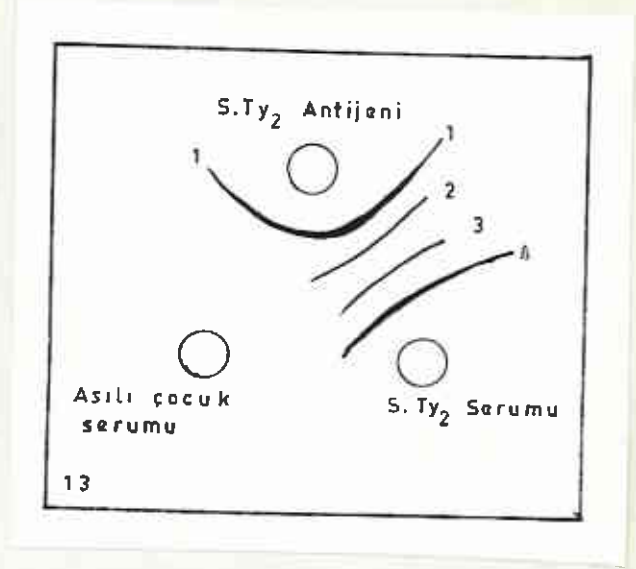
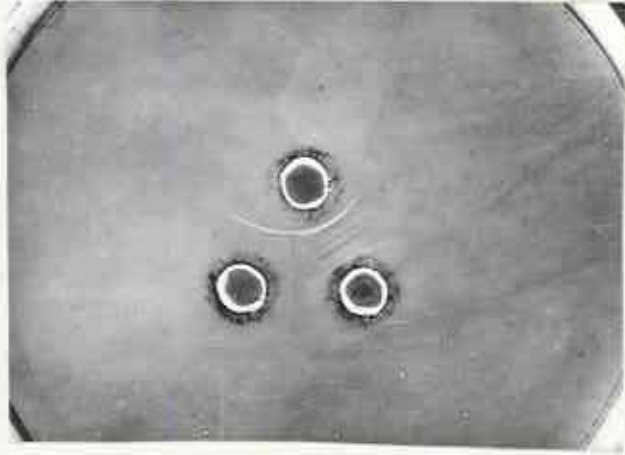
ŞEKİL 11 . Aseton aşısına karşı elde edilen bağışık serumun S. typhi Ty<sub>2</sub> antijeni ve serumu ile karşılaştırılması.

b) Fenol aşısı ile hazırlanan bağışık serum da ise 1 ve 3 No:lu presipitasyon bandları yani "H" ve birinci "O" bandları görülmeyip 2 No:lu "Vi" ile 4 No:lu "O" bandları oluştu (Şekil 12).



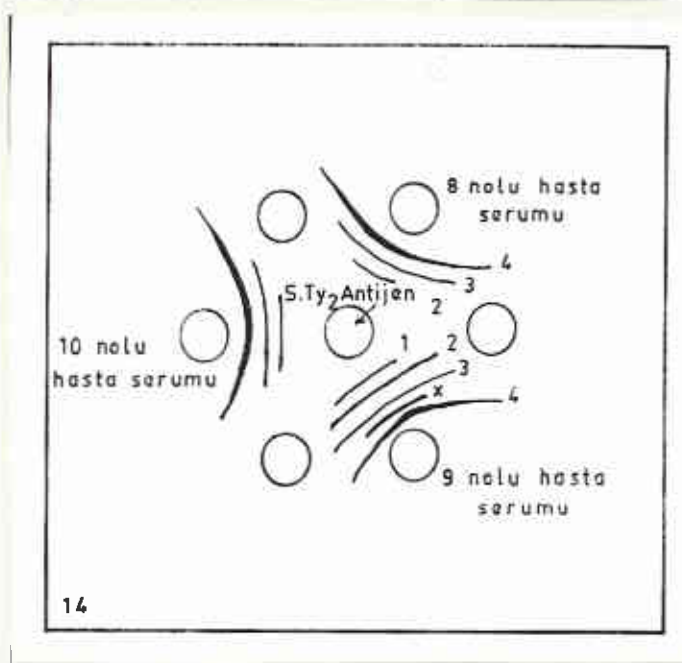
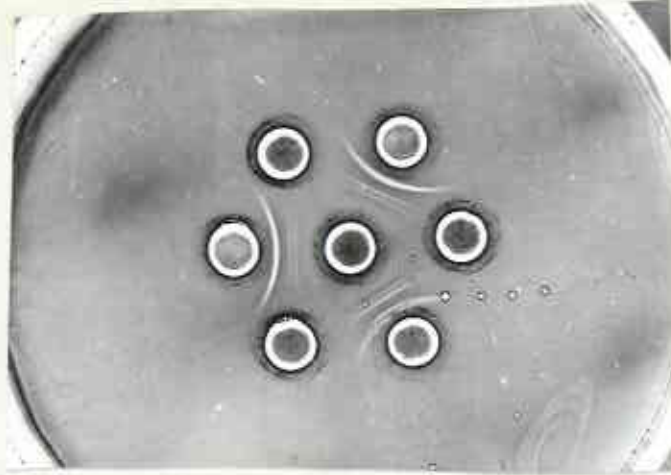
ŞEKİL 12 . Fenol aşısına karşı elde edilen bağışık serumun, Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> bağışık serumu ve antijeni ile karşılaştırılması.

3. Tifo aşılı çocukların serumları *S. typhi* Ty<sub>2</sub> antijeni ile karşılaştırıldığında 5 serumdan 3 ü negatif ikisinde ise 1 No:lu yani "H" antijeni ile iştirakli band görüldü (Şekil 13).

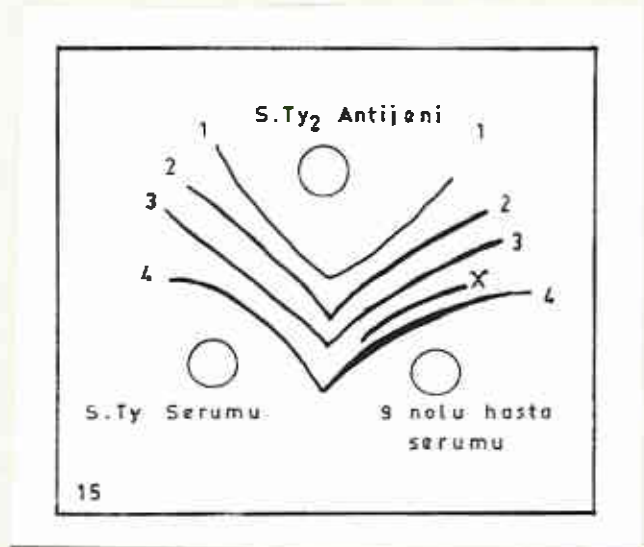
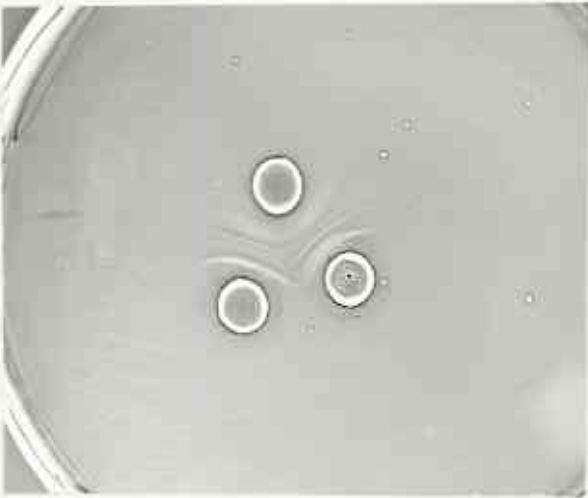


ŞEKİL 13 . Tifo aşısı olmuş öğrenci serumu ile *Salmonella typhi* Ty<sub>2</sub> bağışık serumu ve antijeninin karşılaştırılması.

4. Tifo enfeksiyonu geçirmiş ve geçirmekte olan hasta serumları ile aynı deneyler yapıldığında; Tablo 4 de bildirilen hastalardan 8, 9, 10 No:lu hasta serumları hariç 9 tanesinde hiç presipitasyon bandına rastlanmadı (Tablo 7). 8 ve 10 No:lu hasta serumlarında "H" bandları hariç diğer üç band yani "Vi" ve iki "O" antijenleri ile identik bandlar görüldü. (Şekil 14). 9 No:lu hasta serumunda ise 5 band meydana geldi bu bandlardan 4 ü *Salmonella typhi* Ty<sub>2</sub> antijenleri ile identik olup fazla olan bir band ise iki "O" bandı arasında, oldukça belirli, ince ve kısa olarak teşekkül etti (Şekil 15).



ŞEKİL 14 . 8, 9, 10 No:lu hasta serumlarının S. typhi Ty<sub>2</sub> antijeni ile karşılaştırılması ve (x) bandının ayrılması.



ŞEKİL 15 . 9 No:lu hasta serumunun, S. typhi Ty<sub>2</sub> bağışık serumu ve antijeni ile karşılaştırılması.



5. Presipitasyon deneylerinde kullanılan antijenlerin aseton ekstraktı ve sonikasyon metodu ile hazırlanmasının, presipitasyon bandlarının teşekkülüne değişik etkisi olmadı. İki tip antijen ile de aynı sayı ve görünümde bandlar bulundu.

6. Aglütinasyon deneyleri ile presipitasyon deneylerinin birlikte karşılaştırılmaları Tablo 6, 7, 8 de özetlendi.

TABLO 6 . Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> den hazırladığımız antijenler ile bağışık serumların aglütinasyon ve presipitasyon sonuçları.

Taysan No	Bağışık Serumlar	S. typhi Ty <sub>2</sub> aglütinasyon antijeni ile			S. typhi Ty <sub>2</sub> presipitasyon antijeni ile
		H	O	Vi	
2	S. typhi Ty <sub>2</sub> (canlı)	1/3200	1/3200	1/800	4 Band (H, Vi, O <sub>1</sub> , O <sub>2</sub> )
3	S. typhi Ty <sub>2</sub> (Fenol)	1/400	1/800	1/1600	2 Band (Vi, O <sub>2</sub> )
3	S. typhi Ty <sub>2</sub> (Aseton)	1/800	1/1600	1/800	3 Band (H, Vi, O <sub>1</sub> )
1	S. loma-linda (canlı)	neg	1/3200	neg	2 Band (O <sub>1</sub> , O <sub>2</sub> )
1	S. gaminara (canlı)	1/6400	neg	neg	1 Band (H)
2	Ballerup (canlı)	neg	neg	1/1600	1 Band (Vi)



TABLO 7 . Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> den hazırladığımız antijenler ile Tifo geçirmiş veya geçirmekte olan hastaların serumları ile yapılan aglütinasyon ve presipitasyon sonuçları.

Hasta Serumları		S.typhi Ty <sub>2</sub> aglütinasyon antijeni ile			S.typhi Ty <sub>2</sub> presipitasyon antijeni ile
Sıra no:	Adı ve Soyadı:	H	O	Vi	
1	H.Ö.	neg	neg	neg	neg
2	S. H.	neg	neg	neg	neg
3	H. N.	neg	neg	neg	neg
4	S. Ö.	1/100	neg	neg	neg
5	B. A.	1/100	1/200	1/100	neg
6	A. A.	neg	1/100	neg	neg
7	S. A.	neg	1/100	neg	neg
8	K. K.	1/400	1/200	1/400	3 Band (Vi, O <sub>1</sub> , O <sub>2</sub> )
9	H. Y.	1/800	1/400	1/400	5 Band (H, Vi, O <sub>1</sub> , <del>O<sub>2</sub></del> , O <sub>2</sub> )
10	S. T.	1/100	1/400	1/100	3 Band (Vi, O <sub>1</sub> , O <sub>2</sub> )
11	M. K.	1/200	neg	neg	neg
12	Ö. İ.	1/100	1/200	neg	neg

TABLO 8 . Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> antijenleri ile Tifo aşıllı çocukların serumları arasında yapılan aglütinasyon ve presipitasyon sonuçları.

Tifo aşıllı çocuk Serumları		S. typhi Ty <sub>2</sub> antijenleri ile			S. typhi Ty <sub>2</sub> presipitasyon antijeni ile
Sıra no:	Adı ve Soyadı:	H	O	Vi	
1	H. Ö.	1/200	neg	neg	neg
2	H. Y.	1/400	1/100	neg	1 Band ( H )
3	A. B.	1/400	neg	1/200	1 Band ( H )
4	C. K.	1/100	neg	neg	neg
5	A. A.	1/200	1/100	1/100	neg

## TARTIŞMA

Endemik bölgelerde yapılan araştırmalarda, Tifo enfeksiyonu geçirmemiş ve Tifo aşısı olmamış bazı şahısların kan serumları Tifo basili ile aglütinasyon vermektedir. <sup>19</sup>

Şahısların Tifo enfeksiyonuna karşı korunmasında aşı ile bağışıklık teminine çalışılır. Aşının bağışıklık yaratma gücü yeterli olmadığı için bu konuda araştırmalara devam edilmektedir. <sup>20, 21</sup>

Tifo aşısı saha çalışmalarına 1954 yılında Yugoslavya'da başlanmıştır. daha sonra, Britanya, Polonya ve Rusya'da devam edilmiştir. <sup>22</sup>

İlk aşı denemelerinde hazırlanan aşılardan, azalan seviyede olmak üzere 3 yıl koruma sağladığı görülmüştür. <sup>23</sup> 1953 yılında Tifo aşısı hazırlanmasında her laboratuvarın standard teknikler üzerinde çalışmaları kararlaştırılmıştır. <sup>24</sup> Saha denemeleri ile, laboratuvar çalışmalarının birlikte gitmesi en çok arzu edilen bir durumdur, fakat çoğu kez aralarında bir paralellik bulunamamıştır. <sup>35, 36</sup> Araştırmacılar, bunun nedenini Tifo basilinin insanda yaptığı enfeksiyon ve bu enfeksiyon sonucu meydana gelen bağışıklığın hiç bir deney hayvanında gösterilemeyeşine bağlamışlardır. <sup>40</sup> Şempanzelerde Tifo'ya çok benzer bir enfeksiyon meydana getirilebilmiş ve bu enfeksiyon aşı ile önlenbilmişse de, insandaki bağışıklığın yeterli olup olmadığını gösteren mükemmel bir laboratuvar testi bulunamamıştır. <sup>25, 26</sup> Her çeşit aşı hazırlama tekniğinde antijenik yapıda bozulan veya kaybolan bir komponentin olması düşünülmüştür. <sup>17</sup>

Yugoslavya'da 1954-56 yılları arasında yapılan saha çalışmasında çeşitli metodlarla hazırlanmış aşılardan denenmiştir. <sup>24</sup> Her tip aşı için

12.000 şahıs immunize edilmiş ve eljeksiyonlar 3 hafta ara ile iki zerk şeklinde yapılmıştır. 2 yıl esnasında aşılanan şahıslardan yalnız 31'inde Tifo enfeksiyonu görülmüştür. Bunlardan 23'ü alkol ile hazırlanmış, 9'u ısı ile hazırlanmış aşılarla immunize edilmiş şahıslardır. Yine bu denemelerden sonra, alkol aşısının ısı ile öldürülüp koruyucu olarak fenol ilâve edilmiş aşılarla oranla "Vi" antikor titreleri daha yüksek bulunmuştur.<sup>27,28,29</sup> Bu yıllarda "Vi" antijenine karşı meydana gelen antikorların insanları Tifo enfeksiyonlarına karşı korumada yeterli olduğu zannedildiğinden "Vi" antijeni ihtiva eden alkol aşıları çok tutulmuştur. Daha sonraki çalışmalar "Vi" antikorlarının korumada önemli olmadığını göstermiştir.<sup>30</sup> Aseton aşısı ile fenol aşısı da "Vi" antikorları bakımından karşılaştırıldığında Aseton aşısından sonra daha yüksek "Vi" antikorları dikkati çekmiştir. Bazı laboratuvarlar yüksek "Vi" antikorları elde edemeyişlerinin nedenini, kullandıkları tavşanların "Vi" antikorları için gerekli genetik kapasitede olmayışına bağlamışlardır. Farelerde yapılan koruma deneylerinde "Vi" antijeni, korumada bir öneme sahip olmakla beraber, "O" antijeni veya tayin edilemeyen somatik başka bir antijen korumada daha önemli bulunmuştur.<sup>30</sup> Bazı araştırmacılar da Tifo aşısından sonra insanlardaki serolojik cevabı incelemişler "Vi" ve "O" antikor seviyeleri ile koruma gücü arasında herhangi bir uygunluğa rastlamamışlardır.<sup>31</sup> Bunun yerine "H" antikorlarını daha önemli bulmuşlardır. Sonraları korumada "O" ve "Vi" antijenlerinin birlikte rol oynadığı savunulmuşsa da 1960 dan sonraki çalışmalarda "H" antijeni korumada çok ilgili görülmüştür. Tavşanlar aseton veya fenol aşıları ile immunize edildiğinde meydana gelen "H" antikorları, insandaki antikor cevabı ile en çok ilgili bulunmuştur.<sup>12</sup> Diğer bir grup araştırmacı da şempanzelerin Tifo ateşine karşı korunmasında "H" antijeninin gerekli olmadığını savunmuşlardır.<sup>32</sup> Bu bilim adamları, antikor titrelerini, aglütinasyon veya passif hemaglütinasyon denemeleri ile ölçmüşler insan veya tavşan

serumları ile farelerde ve tavuk embiriyosunda koruma deneyleri yapmışlardır. Bu laboratuvar deneylerinin sonuçlarına göre aseton aşısı bugün en çok öncelik kazanan bir aşıdır. Bundan sonra fenol aşısı ve alkol aşısı gelir. Yugoslavya'da yapılan bir çalışmaya göre aseton aşısı % 94 ısı-fenol aşısı da % 71 koruma göstermiştir.<sup>31</sup>

Şimdiye dek yapılan çalışmalarda çoğu kez birbirine zıt, bazan da birbirini destekleyen fikirler bu konudaki çalışmalar ilerledikçe daha çok görülmüştür. Antijenik analizlerle Salmonellaların yapısı aydınlandıkça, çalışma sahaları daha ince testlerle bunları ortaya çıkarmak şekline dönüşmüştür. Salmonellaların "H", "O", "Vi" antijenleri aglütinasyon denemeleri ile gösterilebilmiştir. İnsanların Tifo enfeksiyonlarına karşı korunmasında bu 3 antijenik komponentten hangisinin sorumlu olduğu ispatlanamamıştır. Salmonellaların aglütinasyon denemeleri ile tespit edilemeyen diğer bazı komponentleri immune-diffuzyon metodları ile gösterilebilmiştir.<sup>33</sup> Bir çok Salmonella cinsi bakterilerde, "H", "O" "Vi" antijenik faktörleri dışında, agar-gel-diffuzyonu ile yapılan presipitasyonda çapraz reaksiyonlar veren antijenler görülmüştür.<sup>34</sup> Kauffmann-White şemasındaki "D" grubu bakterilerinden elde edilen ekstratlarla yapılan presipitasyon denemelerinde 6 presipitasyon bandı görülmüştür. Bunlardan birinci band grup özgürlüğü gösteren IX; XII antijenine, 2. band "Vi" antijenine ve 3. band da flageller "d" antijenine aittir. Diğer üç band ise grup "D" özgürlüğü göstermeyen Shigella flexneri, Shigella sonnei, Proteus vulgaris ve Klebsiella'larda da bulunabilen presipitasyon bandlarıdır. Presipitasyon denemelerinde çapraz reaksiyon veren presipitasyon bandları, aglütinasyon denemeleri ile gösterilemeyen, bakteri hücresinin yüzeyinde bulunmayan antijenlere aittir. Fakat presipitasyon denemesi ile gösterilebilen bu çapraz reaksiyon veren antijenler, kimyasal analiz metodları kadar güvenilir değildir. Presipitasyon metodlarının enterik bakteriler için standard hale getirilmesi zorunluğu vardır.

Çalışmalarımızda Salmonellaların "H" "O" "Vi" antijenleri dikkate alınarak aglütinasyon ve presipitasyon deneyleri ile incelendi. Antijenik yapısı bizce bilinen Salmonella gaminara Salmonella loma-linda ve Ballerup suşlarının, Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> suşu ile antijenik benzerlik gösteren komponentleri aglütinasyon ve presipitasyon deneyleri ile tespit edildi (Tablo 6). Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> suşunun "H" "O" "Vi" antijenleri geliştirildikten sonra bu organizmler canlı olarak tavşanlara zerk edildiğinde bu antijenlere ve diğer komponentlerine karşı antikor elde edildi. Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> canlı organizmlerine karşı tavşanlardan elde edilen bağışık serum ve Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> presipitasyon antijeni, agar-gel-diffuzyon metodu ile presipitasyon yapıldığında, teşekkül eden 4 banddan birisinin "H", birisinin "Vi" ve ikisinin de "O" bandı ile ilgili olduğu, "H" antijeni ihtiva eden S. gaminara, "Vi" antijeni ihtiva eden Ballerup ve "O" antijeni ihtiva eden S. loma-linda suşları ile yapılan karşılaştırmalardan anlaşılmıştır (Tablo 6, Şekil 7,8)

Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> antijeni ve bağışık serumu arasında meydana gelen presipitasyon bandlarının ne olduğu bizce bilindikten sonra kan kültürleri pozitif bulunmuş 12 Tifo'lu hasta serumu ile S. typhi Ty<sub>2</sub> presipitasyon antijeni karşılaştırıldı. Neticede 9'u negatif, 3'ü pozitif sonuç verdi. Pozitif sonuç verenlerden ikisi üçer band ile müştereklik gösterdi. Bir tanesi de 4 müşterek band ve ayrıca beşinci bir "X" bandı ile (O<sub>1</sub> ve O<sub>2</sub> bandları arasında) dikkati çekti. "X" bandı çok kısa, belirli ve O<sub>2</sub> bandına çok yakın oluşum gösterdi (Şekil 14, 15). Diğer hasta serumlarında ve tavşan serumlarında göremediğimiz bu ilâve bandın mahiyeti hakkında fazla bir şey söyleyemeyeceğiz, aynı hastadan izole edilen S. typhi suşu ile yapılacak ilerdeki çalışmalarımızda, bu husus tetkik edilecektir.

Tifo aşılı 5 çocuktan yalnız ikisinde "H" presipitasyon bandı tespit edildi. (Tablo 8, Şekil 17). Bu sonuç aşı hazırlama sırasında bir çok komponentlerin kaybolabileceği fikrini uyandırdı.



Standard aseton ve fenol aşıları ile immunize ettiğimiz tavşan serumlarında *S. typhi* Ty<sub>2</sub> canlı organizmlerine karşı elde edilen bağışık seruma oranla presipitasyon bandlarında azalma dikkatimizi çekti. (Tablo 6) Aseton aşısı ile hazırlanmış anti serumlarda "H", "Vi", ve "O<sub>1</sub>" bandlarında iştirak görüldüğü halde "O<sub>2</sub>" antijenine ait band görülmedi. Fenol aşısı ile immunize edilmiş tavşan serumlarında ise, "Vi" ve "O<sub>2</sub>" antijenleri ile iştirakli bandlar bulundu. Böylece iki ayrı teknikle hazırlanan aşılarda değişik komponentlerde kaybolma dikkati çekti.

Araştırmacılar Tifo aşısı denemelerini yaparlarken, antijen tipinin, dozunun ve immunizasyon yolunun antikor cevabını etkilediğini görmüşlerdir.<sup>37</sup> Örneğin farelerde yapılan koruma deneylerinde aşı I.P. olarak tatbik edildiğinde, (musin içinde süspansiyone) aseton aşısı, fenol aşısına oranla 3, 69 kere daha kuvvetli koruma göstermiştir.<sup>38</sup> Subcutan aşılama ise aseton aşısı 0,78 kere daha kuvvetli koruma göstermiştir. Yine bir çok araştırmacı canlı ve S formundaki organizmlerin I.P. yolla zerkedilmesinden sonra çabuk ve yüksek antikor cevabı elde etmişlerdir.

Romanya'da 1965 yılında yapılan bir araştırmada ise, okul öncesi çocuklar oral yolla aşılama ya tabi tutulmuştur. 56° C de ısıyla öldürülüp % 20 alkol ile korunmuş aşı ağız yolu ile 24 veya 48 saat ara ile tatbik edildiğinde, hümorale immunite yanında lokal immuniteden de söz edilmiştir. Çocuklardan alınan kan serumları ile tavuk embriyosunda ve farede koruma deneyleri ve aglütinasyon deneyleri yapılmış, neticede ağız yolu ile aşı tatbikinden 20-30 gün sonra bir de S.C. aşılama uygulandığında en iyi koruma verdiği savunulmuştur.<sup>39</sup>

Biz çalışmalarımızda immunizasyonu I.V. olarak yaptık, ve standard hazırlanmış aşılardan hariç diğer organizmleri canlı olarak zerkettiler.

Agar-gel-diffuzyonu ile bağışık serumlar ve antijenler arasında

yapılan presipitasyon denemelerinde her zaman aynı sonucu alabilmek için oyuklara konacak antijen ve antikorun volümetrik ölçüsünün titizlikle ayarlanması, agarların petrilere döküldükten sonra en fazla iki gün içinde kullanılması gibi bazı faktörlerin diğer faktörler yanında göz önünde tutulması lâzım geldiğini gözledik. Çeşitli faktörlerin agar-gel diffuzyonunu etkilediğini bir çok araştırmacılar ifade etmiştir.<sup>41</sup> Örneğin kimyasal bir takım maddelerin etkisine dayanılarak antijenler kademeli olarak fraksiyonlara ayrıldığında, işlem uzatıldıkça değişik tipte antijenler elde edilmiştir. Bazı araştırmacılar antijen hazırlamada sonic cihaz kullanmışlar ve bakteri ince yapılarına kadar parçalanabildikçe türler arasında o nisbette identik bantlar tespit edilebileceğini savunmuşlardır.<sup>42</sup>

Deneylerimizde aseton ekstraktı ile hazırlanan presipitasyon antijeni ve sonikasyon yapılarak hazırlanan antijen arasında, presipitasyon bantlarının oluşma şeklinde bir fark görülmedi. Aseton ekstraktı ile hazırlanan antijenin meydana getirdiği bantları elde edebilmek için bakteriler 15 dakika 125 Watt'da sonikasyona tabi tutulduğunda belirli, halbuki 5-10 dakikalık süreler sonunda ise çok belirsiz bantlar meydana gelmiştir.



### ÖZET

Salmonella enfeksiyonlarına karşı aktif immunizasyonda kullanılan aşuların her zaman aynı koruma gücünde olmayışı ve değişik metodlarla aşı hazırlanmasında kaybolan veya bozulan komponent. ve komponentlerin aşının koruma gücüne etkisi olabileceği düşüncesi ile bazı çalışmalar yaptık.

Deneylerimizde, tavşanlarda hazırladığımız bağışık serumları, doğal enfeksiyon geçirmiş hasta serumlarını ve Tifo aşılı çocuk serumlarını Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> den elde ettiğimiz "H", "O", "Vi" antijenleri ile aglütinasyon ve yine aynı bakterinden elde ettiğimiz presipitasyon antijeni ile presipitasyona tabi tuttuk. Antijen analizleri yapabilmek için Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> ile müşterek antijenleri olan Salmonella loma-linda (O), Salmonella gaminara (H) ve Ballerup (Vi) bakterilerini, Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü suş koleksiyonundan, standard aseton ve fenol aşularını da WHO laboratuvarlarından temin ettik.

Sonuçlar şöyle özetlenebilir:

1. Presipitasyon için, aseton ekstraktı veya sonik dalgalarla parçalamak suretiyle elde edilen antijenlerin band meydana getirme yeteneklerinde bir fark görülmedi.

2. Salmonella typhi Ty<sub>2</sub> canlı organizmlerine karşı tavşandan elde edilen bağışık serumlar "H", "O", "Vi" aglütinan antijenleri ile 1/3200, 1/ 3200 ve 1/800 aglütinasyon titreleri verdi (Tablo 6). Aynı serum presipitasyon antijeni ile 4 presipitasyon bandı meydana getirdi (H, Vi, O<sub>1</sub>, ve O<sub>2</sub>).

3. Fenol aşısına karşı tavşandan elde edilen bağışık serum "H", "O", "Vi" antijenleri ile 1/400 1/800 1/1600 aglütinasyon titreleri ve presipitasyon antijeni ile 2 presipitasyon bandı, (Vi, O<sub>2</sub>), aseton aşısına karşı elde edilen bağışık serum ise 1/800 1/1600 1/800 titreler ve 3 presipitasyon bandı (H, Vi- O<sub>1</sub>) meydana getirdi.

4. S. loma-linda, S. gaminara ve Ballerup canlı organizmlerine karşı hazırlanan bağışık serumlar, S. typhi Ty<sub>2</sub> aglütinasyon ve presipitasyon antijenleri ile :

S. loma-linda "O" ile 1/3200 "H" ve "Vi" negatif aglütinasyon ve iki presipitasyon bandı (O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>),

S. gaminara "H" ile 1/6400 "O" ve "Vi" ile negatif aglütinasyon ve bir presipitasyon bandı (H),

Ballerup "Vi" ile 1/1600 aglütinasyon "O" ve "H" ile negatif aglütinasyon, bir presipitasyon (Vi) bandı verdi.

5. Tifo enfeksiyonu geçirmekte olan 12 hasta serumlarından 9'unda ya çok düşük veya negatif aglütinasyon ve negatif presipitasyon bulundu. Üç hasta serumundan 8 No:lu da "H", "O", "Vi" aglütinasyonu 1/400 1/200 1/400, 10 No:lu da 1/100 1/400 1/100 titre ve 3 presipitasyon bandları görüldü (Vi, O<sub>1</sub> ve O<sub>2</sub>), 9 No:lu ve hastalığı uzun süreden beri geçirmekte olan hasta serumunda ise 1/800 1/400 1/400 aglütinasyon titreleri ve 5 presipitasyon bandı bulundu. (H, Vi, O<sub>1</sub>, X, O<sub>2</sub>). O<sub>1</sub> ve O<sub>2</sub> arasında meydana gelen ayrı bir band "X" olarak işaretlendi.

6.

6. Tifo aşısı olmuş 5 çocuk serumundan ikisinde 1/400 "H", birinde de 1/200 "Vi" ve 1/100 "O" aglütinasyon titresi görülmüş olup "H" titresi 1/400 olan iki serumda birer presipitasyon bandı (H) meydana geldi.

7. Aşılı çocuklarda, deneysel hayvan zerkleri ile elde edilen serumlarda ve aglütinasyon titresini yüksek olan hasta serumlarında rastlanılan bandların bulunmaması, aşuların hazırlanışında antijenitelerinde kayıplar olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca 9 No:lu hastada rastlanılan ve bizim deneysel zerklerde dahi tespit edemediğimiz bir antijenik stimülusun doğal enfeksiyonda meydana gelmesi; aşı hazırlamada, antijenik fraksiyonların kaybolması fikrini kuvvetlendirmektedir.

Kaynaklar:

1. Payzın, S., ve ark. ; Sağlık Hizmetinde Mikrobiyoloji, II. Özel Mikrobiyoloji. A.Ü. Tıp Fak. Yayınlarından (1968)
2. Lüderitz, O., Staub, A.M., ve Westphan, O. "Immunochemistry of O and R Antigens of Salmonella and Related Enterobacteriaceae" Bac. Rev. 30 ; 192 (1966)
3. Topley ve Wilson ; Principles of Bacteriology and Immunity, The Williams and Wilkins Co., 5 Edit. Cilt 2, s. 2461 (1964)
4. Kauffmann, F. ; Acta. Path. Microbiol. Scand. 49; 393 (1960)
5. Akman, M., ve Gülmezoğlu, E. ; Tıbbi Mikrobiyoloji , (Review of Medical Microbiology, 1964, 6. baskı'dan çeviri) H.Ü. Tıp Fakültesi yayını (1966)
6. Berkin, T., Tuna, I., ve Alkış, N. ; "Normal ve Klinik man Tifo Şüpheli Serumlarda Vi antikorunu Araştırılması" Türk Hij. Tec. Biol. Der. XX. sayı 1; (1958)
7. Gören, S., ve Akyay, N. ; "Tifo Aşılarının Aktivitesini Tayinde Kullanılan Metodlar ve Buna Dayanılarak Aşıların Değerlendirilmesi Üzerinde Kritikli bir Etüd., Türk. Hij. Tec. Biol. Der. XVI (1956)
8. Grinnel, J. ; "A New Type of Typhoid and Paratyphoid Vaccine" J.Exp.Med. 56 ; 907 (1932)
9. Felix, A. ; "A New Type of Typhoid and Paratyphoid Vaccine" Brit. Med. Journal. 1 ; 391 (1941)
10. Jenkin, C. R., ve Rowley, D. ; "Partial Purification of the Protective Antigen of Salmonella typhimurium and Its Distribution Amongst Various Strains of Bacteria" Australian J. of Exp. Biol. and Med. Sc. 43; 65 (1965)
11. Whiteside, E.R., ve Baker, E.E. ; "The Vi Antigens of the Enterobacteriaceae" J. of Immunol. 83 680 (1959)
12. Walter Reed Army Ins. of Research; "Preparation of Dried Acetone - Inactivated and Heat - Phenol - Inactivated Typhoid Vaccines " Bull. Wld. Hlth. Org. 30; 635-646 (1964)
13. Craigie, J.; "Preparation of "H" Antigens" J. of Immunol 21; 417 (1931)
14. Harris ve Coleman ; Diagnostic Procedures and Reagents 4. Ed. (1963)
15. Spaun, J., ve Uemura, K. ; "International Reference Preparations of Typhoid Vaccine" Bull. Wld. Hlth. Org. 31; 761 (1964)
16. Whiteside, R.E., ve Baker, E.E. ; "Antigenic Analysis of Salmonella Typhosa and Related Salmonellas" J. of Immunol 88; 650 (1962)

17. John, R., ve Preer, J.R. ; "A Quantitative Study of a Technique of Double Diffusion in Agar" J. of Immunol. 77; 52 (1956)
18. Bösel, B., ve ark.; Lab. Synopsis Diagnostic Reagents Bulletin. LLDYD BROTHERS. (1964)
19. Akyay, N. ; "Türkiyede Salmonella Intanları : I. Salmonella Intanlarının Dağılışı" Türk. Hij. Tec. Biol. Der. XVI (1956)
20. Cvjetanovic, B., ve Uemura, K. ; "The Present Status of Field and Laboratory Studies of Typhoid and Paratyphoid Vaccine" Bull. Wld. Hlth. Org. 32 ; 29 (1965)
21. Polish Typhoid Committee ; "Controlled Field Trials and Laboratory Studies on the Effectiveness of Typhoid in Poland" Bull. Wld. Hlth. Org. 34; 211 (1966)
22. Spaun, J.; "Studies on the Influence of the Route of Immunization In the Active Mouse Protection Test With Intraperitoneal Challenge For Potency Assay of Typhoid Vaccine" Bull. Wld. Hlth. Org. 31 ; 793 (1964)
23. Spaun, J., ve ark. ; "Laboratory Toxicity Test of Field Trial Typhoid Vaccines" Bull. Wld. Hlth. Org. 33 ; 673 (1965)
24. Yugoslav Typhoid Commission ; "Field and Laboratory Studies with Typhoid Vaccines" Bull. Wld. Hlth. Org. 16 ; 897 (1957)
25. Typhoid Panel, UK Department of Technical Co-Operation ; "Controlled Field Trial of Acetone - Dried and Inactivated and Heat-Phenol- Inactivated Typhoid Vaccines in British Gurana" Bull.Wld. Hlth. Org. 30 ; 631 (1964)
26. Hejfec, L. B., ve ark. ; "A Controlled Field Trial and Laboratory Study of Five Typhoid Vaccines in the U.S.S.R." Bull. Wld. Hlth. Org. 34 ; 321 (1966)
27. Yugoslav Typhoid Commission ; "A Controlled Field Trial of the Effectiveness of Acetone - Dried - Inactivated and Heat - Phenol - Inactivated Typhoid Vaccines in Yugoslavia" Bull. Wld. Hlth. Org. 30 ; 623 (1964)
28. Polish Typhoid Committee ; "Evaluation of Typhoid Vaccines in the Laboratory and in a Controlled Field Trial in Poland" Bull. Wld. Hlth. Org. 32 ; 15 (1965)
29. Walter Reed Army Ins. of Research ; "Physical and Chemical Studies of Two Dried Inactivated Typhoid Vaccines (Vaccine K and L)" Bull. Wld. Hlth. Org. 30 ; 647 (1964)
30. Fişek, N., ve ark. ; "Mouse Challenge With Salmonella Typhosa T5501 in Testing the Potency of Typhoid Vaccines" Bull. Wld. Hlth. Org. 20 ; 1257 (1959)
31. Benenson, A.S. ; "Serological Responses of Man to Typhoid Vaccines" Bull. Wld. Hlth. Org. 30 ; 653 (1964)

32. Tully, J. G., ve Triggerth, D.W. ; "Studies on Infection and Immunity in Experimental Typhoid Fever" J. Inf. Dis. 112 ; 118 (1963)
33. Barber, C., Vlădoianu, I. R., ve Dimache, G.H. ; "Contributions to the Study of Salmonella. Immunological Specificity of Proteins Sereprated from S. Typhi" Immunology 11 ; 287 (1966)
34. Holme, T., ve Edebo, L. ; "Studies of Salmonella Antigens by the Agar - Gel Presipitin Test" Acta. Pat. Microbiol. Scand. 65 ; 287 (1965)
35. Barber, C., ve ark. ; "Contributions to the Study of Salmonella" Immunology 12 ; 411 (1967)
36. Chernokhuosiova, E., ve ark. ; "Study on the Production of FgG , IgA and IgM antibodies to Somatic Antigens of Salmonella Typhi in Humans" Clin. Exp. Immunol. 4 ;407 (1969)
37. Kenny, K., ve Herzberg, M., "Antibody Response and Protection Induced by Immunization with Smooth and Rough Strains in Experimental Salmonellosis" J. of Bac. 95 ; 406 (1968)
38. Pitman, M., ve Bahner, J. H. ; "Laboratory Assays of Different Types of Field Trial Typhoid Vaccines and Relationship to Efficacy in Man" J. of Bac. 91 ; 1713 (1966)
39. Vlădoianu, I.R., ve ark. ; "The Effectiveness of Oral Vaccination of Young Children Against Typhoid and Paratyphoid A and B" Bull. Wld. Hlth. Org. 32 ; 37 (1965)
40. Archer, J. R., ve Rowley, D. ; "A Quantitative Comparison of the Antigenic Structure of a Virulent and Avirulent Strain of S. Typhimurium" Immunology 17 ; 551 (1969)
41. Ribi, E., Milner, C. K., ve Perrine, D.T. ; "Endotoxic and Antigenic Fractions From the Cell Wall of S. enteritidis" Immunology 82 ; 75 (1959)
42. Corlisle, H. N., ve ark. ; "Immunodiffusion Studies with Pasteurella tulerensis Antigen - Rabbit Antibody System S" J. of Immunology 89 ; 638 (1962)

