

BAKTERİ VIRUSLARINA KARŞI HAZIRLANAN BAĞIŞIK SERUMLARIN K DEĞERLERİ

Doç. Dr. ENVER TALİ ÇETİN

İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Enstitüsü

GİRİŞ

Virusların idantifikasyonu için bunlara karşı hazırlanan bağışık serumlarla nötralizasyon tecrübeleri yapılmaktadır ve bu çeşit çalışmalar virus araştırmalarında çok ehemmiyetlidir. Bakteriyofaj ve faj isimleri de verilen bakteri viruslarının ve konak bakterilerinin kolay üretilebilmeleri ve üzerlerinde kantitatif olarak çalışılabilmesi dolayısıyla bunlarla yapılan nötralizasyon tecrübeleri yüksek derecede kesinlik göstermektedir ve bu tecrübelerde edinilen bilgiler diğer virus çalışmalarına tatbik edilmektedir.

Bir virus kendine uygun nötralize edici antikorla birleştiği zaman nötralize olmakta ve infeksiyöz hassasını kaybetmektedir. Bakteri virusları bu şekilde nötralize olduğu takdirde artık bakteri hücrelerine adsorbe olamamakta ve bakteriyi infekte edememektedir (1). Buna mukabil konak bakteriye adsorbe olan bakteriyofaj üzerine antikorların tesiri olmamaktadır (2). Bu suretle, bir ortamda bakteriye adsorbe olan fajlardan başka serbest fajlar da bulunuyorsa, serbest fajlar antikorlar vasıtası ile nötralize edilebilmekte ve reaksiyon sahasından uzaklaştırılmaktadırlar. Geriye yalnız bakteriye adsorbe olan fajlar kalmakta ve bu infekte bakteriler muhtelif tecrübelerle tâbi tutularak bakteriyofajların hususiyetleri anlaşıl- maktadır. Diğer taraftan bağışık serumlarda mevcut antikorlar antijenik yakınlığı olan bakteriyofajları serolojik olarak gruplara ayırmağı mümkün kılmaktadır (3).

Yukarıda bildirilen hususları araştırmak üzere bakteri viruslarına karşı bağışık serum hazırlamak ve bu serumu muayyen nispetlerde sulandırarak tecrübelerde kullanmak icap etmektedir. Serumun sulandırılma nispeti serumun K değeri ile alâkalıdır. K değeri

bilinirse yapılacak tecrübeye kullanılacak serumun sulandırılma nispeti kolayca bulunabilmektedir. Bunun için de elde edilen serumların K değerini hesaplamak lâzımdır.

Bu yazımızda muhtelif bakteriyofajları uygun zaman aralıklarında tavşanlara şırınga ederek bu tavşanların kanlarında nötralize edici antikörlerin ve serumların K değerlerinin yükselişini göstermek üzere yaptığımız çalışmayı bildirmek istemekteyiz.

MATERYEL VE METOD

Bu tecrübelerde aynı bir konak bakteriye tesirli olan, fakat serolojik olarak birbirinden farklı $T_1, T_2, T_3, T_4, T_5, T_6$ ve T_7 bakteriyofajları (4) ile T_1 bakteriyofajına antijenik yakınlığı nazarı itibare alınarak D_{20} bakteriyofajı kullanılmıştır. Konak bakteri olarak T sistemi fajlarına Escherichia coli B suşu ve D_{20} fajına F_1 suşu alınmıştır. Faj kültürleri buyyonda hazırlanmıştır. Bağışık serumlar tavşanlardan elde edilmiş ve şırıngalar için cm^3 de 2×10^{10} faj partikülü ihtiva eden kültürler kullanılmıştır. Her bakteriyofaj için iki tavşana 6 hafta müddetle bağışıklık verilmiştir. Şırıngalar deri altından ve haftada iki defa yapılmış ve her defasında $1 cm^3$ bakteriyofaj kültürü şırınga edilmiştir. Şırıngalara başlamadan evvel ve yapılan her iki şırıngadan 3 gün sonra tavşanların kulak veninden $8 cm^3$ kadar kan alınmış ve bu kanların serumlarının K değeri tayin edilmiştir. Serumlar $58^\circ C$ de 1 saat ısıtıldıktan sonra kullanılmışlardır. Tecrübelerde aktif kalan faj sayısı jeloz tabaka metodu (5) kullanılarak tayin edilmiştir.

Serumun K değerini tayin etmek için $K = 2,3 \times D / t \times \log Po / P$ formülünden faydalanılmıştır. Bu formülde Po kullanılan faj süspansiyonundaki partiküllerin tecrübenin başlangıcındaki sayısını, P ise t zaman sonra bulunan faj sayısını, t dakika olarak zamanı, D serumun faj serum karışımındaki son sulanma nispetini göstermektedir.

TECRÜBELER

Bir serumun K değerini tayin etmek için serum muayyen nispetlerde sulandırılmış ve bu sulandırılmış serumların her biri ile bakteriyofaj muamele edilerek nötralizasyon tecrübeleri yapılmıştır.

Serum yüksek derecede bağışık olduğu düşünüldüğünde $1/800-1/6400$ gibi fazla nispetlerde, bağışıklık değerinin az olduğu tahmin edildiğinde ise $1/25-1/400$ gibi az nispetlerde sulandırılmıştır. Meselâ T_1 fajının 8 nci defa şırıngasından sonra tavşandan alınan kanın serumunun K değerini tayin etmek için serum, bağışıklık kıy-

metinin yükselmiş olduğu düşünülüyor, 1/400, 1/800, 1/1200, 1/1600 nispetlerinde sulandırılmış ve bu serumun K değeri şu şekilde tayin edilmiştir:

Titresi önceden tayin edilmiş T₁ faj kültürü cm³ de 5 × 10⁶ partikül ihtiva edecek şekilde sulandırılmış ve tecrübeye bu titrede kullanılmıştır. Tecrübeye başlanacağı zaman cm³ de 5 × 10⁶ partikül ihtiva eden bu faj süspansiyonundan 0,5 cm³ alınarak 0,5 cm³ buyyon ile karıştırılmış ve 37° C lik benmariye konulmuştur. Bu tüpten tecrübenin başlangıcında ve sonunda 0,1 cm³ alınıp 10 cm³ buyyon ihtiva eden 6 tüpde 10 ar misli sulandırıldıktan sonra her tüpten 0,2 cm³ ve 0,4 cm³ numuneler alınıp konak bakteri ile beraber jeloz tabaka metodu ile Petri kutularına yayılmış ve Petri kutularında ertesi günü husule gelen bakteriyofaj kolonileri sayılarak kullanılan fajın miktarı tecrübenin başlangıcında ve sonunda hesaplanmıştır. Bu suretle faj kültürünün titresi iki defa denenmiş ve tecrübe esnasında faj titresinde bir azalma husule gelmediği anlaşılmıştır.

Diğer taraftan yukarıda bildirilen muhtelif nispetlerde buyyonda sulandırılmış olan serumların her birinden 0,5 cm³ alınarak 37° C lik benmaride bulunan 4 tüpe-sıra ile konulmuştur. Kronometre kullanılarak bu tüplere birer dakika fasıla ile cm³ de 5 × 10⁶ partikül ihtiva eden faj kültüründen 0,5 cm³ ilâve edilmiştir. Birinci tüpe faj ilâve edildikten 20 dakika sonra bu tüpten 0,1 cm³ numune alınıp 10 cm³ buyyona konulmuş ve burada bu suretle 100 defa sulandırılmıştır. Bu tüpten başka bir pipetle 1 cm³ sıvı alınmış diğer bir tüpde bulunan 9 cm³ buyyona konulmuş ve faj serum karışımı burada 10 defa daha sulandığından, sulanma nispeti 1000 olmuştur. Birinci tüpten numune alınmağa başlanmasından itibaren bir dakika geçtikten sonra, yani ikinci tüpdeki seruma faj ilâve edildikten sonra 20 dakika geçince buradan da aynı şekilde numune alınarak buyyonda sulandırılmıştır. Vakitleri gelince diğer tüplerden alınan numuneler de aynı suretle sulandırılmışlardır. Serum faj karışımından alınan numune buyyona ilâve edildiğinde serum burada 100 ve 1000 defa daha sulanmakta ve bu suretle artık fajla reaksiyon vermeyecek hale gelmektedir. Bunun için karışım 10 cm³ ve 9 cm³ miktarındaki buyyonlarda sulandırıldıktan sonra hatta uzun bir müddet beklenilmesinde bir mahzur yoktur. Bütün tüplerden alınan numuneler sulandırıldıktan sonra, bunlardan 0,2 cm³ ve 0,4 cm³ miktarlarında numuneler alınmış ve jeloz tabaka metodu ile Petri kutularına yayılmışlardır. Petri kutusuna ne miktarda faj süspansiyonu

konulacağı da şu şekilde hesaplanmıştır: Faj kültürü $5 \times 10^6 / \text{cm}^3$ olarak hazırlanmış ve aynı miktar serumla karıştırılınca faj miktarı $2,5 \times 10^6 / \text{cm}^3$ olmuştur. Buradan $0,1 \text{ cm}^3$ alınıp 10 cm^3 buyyon bulunan tüpe ilâve edildiğinde 100 defa daha sulanmış ve faj sayısı $2,5 \times 10^4 / \text{cm}^3$ ve bu tüpten 1 cm^3 alınıp 9 cm^3 buyyon bulunan tüpe ilâve edildiğinde 10 defa daha sulandığından faj sayısı $2,5 \times 10^3 / \text{cm}^3$ olmuştur. Bu serum faj karışımında serumun tesiri olmasaydı 9 cm^3 buyyon bulunan tüpten sulandırılma yapıldıktan sonra $0,2 \text{ cm}^3$ alınıp Petri kutusuna konulduğunda burada 5×10^2 koloni husule gelecekti. Fakat serumun tesiri ile faj partikülleri meselâ % 90 nisbetinde nötralize olurlarsa Petri kutusunda aktif kalan % 10 faj partikülü 50 koloni husule getirebilecektir. Aynı tüpten $0,4 \text{ cm}^3$ alınıp Petri kutusuna yayıldığına ise 100 koloni sayılabilecektir. Daha az faj partikülü bulunabileceği ve serumun daha etkili olabileceği de düşünüleceğinden 10 cm^3 buyyonda 100 defa sulandırılmış faj serum karışımından da $0,2 \text{ cm}^3$ ve $0,4 \text{ cm}^3$ miktarlarında numuneler alınıp Petri kutularına yayılmıştır. Bu suretle her serum faj karışımı için 4 Petri kutusu kullanılmıştır. Petri kutuları 37°C lik etüvde bir gece bırakıldıktan sonra ertesi günü koloniler sayılmıştır. Tecrübenin başlangıcında ve sonunda serumda faj titresini tayin etmek üzere kullanılan Petri kutularındaki koloniler sayılarak yapılan hesapta faj titresini için $2,4 \times 10^6$ sayısı bulunmuştur. Bu, faj kültürü bir misli sulandığından içindeki fajın yarı sayısını göstermektedir. Bundan sonra hangi sulandırma nispetinde serumun % 90—99 nötralizasyon husule getirdiğine bakılmıştır. 20 dakika sonra faj serum karışımlarından serumun $1/1200$ nispetinde sulandırılmış olduğu tüpde faj sayısı $1,9 \times 10^5$ dir. Yüzde ne kadar fajın nötralize olduğunu anlamak için kurulan denklemden: $1,9 \times 10^5 \times 100 / 2,4 \times 10^6 = 7,9$ bulunmuştur. Demek ki aktif kalan faj sayısı % 7,9 dur. Bu nispet % 90—99 nötralizasyon nispeti dahilinde bulunduğundan formüle tatbik edilebilecektir.

$$K = 2,3 \times 2400 / 20 \times \log 2,4 \times 10^6 / 1,9 \times 10^5 \quad K = 276 \times 1,1$$

$$K = 303,6$$

Bu suretle, kullanılan serumun K değerinin 303,6 olduğu anlaşılmıştır.

Bu şekilde yapılan tecrübelerle tavşanlara 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 defa bakteriyofaj şırınga edildikten sonra tavşanların kan serumlarının şırınga edilen suşa karşı K değeri tayin edilmiştir. D_{20} , T_0 ,

Bakteriyofajların kendilerine karşı hazırlanmış bağışık serumlarla denenmesi.	K değerleri				
	Şırınga sayıları				
	4	6	8	10	12
D ₂₀	18	145	272	343	620
T ₆	105	288	460	525	610
T ₄	100	233	303	425	552
T ₇	35	170	215	268	463
T ₃	35	175	304	348	378
T ₂	10	18	33	105	285
T ₁					10
T ₅					5

Şekil: Bakteriyofaj şırıngaları ile tavşan serumunda K değerinin yükselmesi.

T₄, T₇, T₃ ve T₂ fajlarının şırıngalarına devam edildikçe serumların nötralizasyon kabiliyetleri fazılaşmış ve K değerleri de gittikçe artmıştır. K değerlerinin bu yükselişleri şekil 1 de gösterilmiştir. D₂₀ faji şırınga edilen tavşanın serumunun K değeri 4 şırıngadan sonra 18, 6 şırıngadan sonra 145, 8 şırıngadan sonra 272, 10 şırıngadan sonra 343 ve 12 şırıngadan sonra 620 bulunmuştur. T₆ faji için K değerleri; 4 şırıngadan sonra 105, 6 şırıngadan sonra 288, 8 şırıngadan sonra 460, 10 şırıngadan sonra 525 ve 12 şırıngadan sonra 610 bulunmuştur. T₄ faji için K değerleri; 4 şırıngadan sonra 100, 6 şırıngadan sonra 233, 8 şırıngadan sonra 303, 10 şırıngadan sonra 425, 12 şırıngadan sonra 552 dir. T₇ faji için K değerleri; 4 şırıngadan sonra 35, 6 şırıngadan sonra 170, 8 şırıngadan sonra 215, 10 şırıngadan sonra 268, 12 şırıngadan sonra 463 dür. T₃ faji için K değerleri; 4 şırıngadan sonra 35, 6 şırıngadan sonra 175, 8 şırıngadan sonra 304, 10 şırıngadan sonra 348 ve 12 şırıngadan sonra 378 dir. T₂ faji için K değerleri 4 şırıngadan sonra 10, 6 şırıngadan sonra 18, 8 şırıngadan sonra 33, 10 şırıngadan sonra 105, 12 şırıngadan sonra 285 dir.

T₁ ve T₅ fajları iyi antijen kabiliyeti göstermemişler ve bu fajların kültürleri şırınga edilen tavşanların serumlarında K değerleri 6 hafta sonra T₁ faji için 10, T₅ faji için 5 olmak üzere çok az bir artış gösterebilmiştir. Bu fajlara karşı adjuvant yardımı ile yüksek değerli bağışık serum elde etmeğe çalışılmıştır (6). Bunun için de 0,86 cm³ faj, 0,070 cm³ Arlacel A ya damla damla ilâve edilmiş ve pipetle güzelce dakikalarca karıştırılmıştır. Bundan sonra karışıma 0,6 cm³ sıvı parafin ilâve edilmiş ve yine iyice karıştırılmıştır. Bu karıştırma neticesinde süt gibi bir emülsiyon elde edilmiştir. Bu emülsiyon tavşanın her iki tarafında skapüler nahiyede deri altına şırınga edilmiştir. Bu şekilde bağışıklık verilen tavşanlardan elde edilen bağışık serumların K değeri 50—60 a kadar yükselebilmektedir.

Diğer taraftan bağışık serumlar ve homolog olmayan fajlarla da tecrübeler yapılmıştır. Bu tecrübelerle T₂, T₄, T₆ fajları, T₃, T₇ fajları ve T₁, D₂₀ fajları karşılıklı olarak diğerinin serumu ile nötralize olmuşlardır. Yani bu fajlar antijenik yakınlığı olan fajlardır. Fakat homolog olmayan faj kullanıldığı zaman serumun daha az sulandırılması icap etmektedir (7). Bu hususta yaptığımız tecrübelerden bir tanesinde şu netice elde edilmiştir. T₂ fajının 12 defa şırıngasından sonra elde edilmiş olan serumun K değeri T₂ faji için 285 dir. Bu serum T₄ faji ile denendiğinde K değeri 83 ve T₆ faji ile denendiğinde K değeri 45 bulunmuştur.

Bağışık serum ile bu bağışık serumun hazırlanmış olduğu fajla antijen yakınlığı olmayan bir faj nötralizasyon tecrübesine tâbi tutulduğunda K değeri sıfır olarak bulunmaktadır.

MÜNAKAŞA

Bakteriyofajlara karşı bağışık serum elde etmek için hayvanlara şırınga edilecek antijenin antikor husulünü temin edebilecek miktarda olması icap etmektedir. Bunun için yüksek titrede bakteriyofaj kültürü kullanılmaktadır. Tecrübelerimizde 2×10^{10} titrede bakteriyofaj kültürü kullanılmıştır. Aynı antijen ile ve aynı yoldan bağışıklanan muhtelif hayvanların husule getirecekleri antikor titreri değişik olabileceğinden ve herhangi sebeple hayvanlar zayı olabileceğinden en az iki hayvana bağışıklık verilmektedir. Faj partiküllerinin buyyon veya sentetik sıvıda bulunması ile aynı derecede iyi neticeler elde edilmektedir. Faj kültürleri infeksiyözitelerini kaybetmemeleri için ısıtılmamakta ve içlerine formalin ilâve edilmektedir. Bazı bakterilerle hayvanlarda infeksiyonlar olabileceğinden

den bakterileri ayırmak için faj kültürleri süzgeçlerden süzülme-
tedir. Yüksek titrede kültürler kullanıldığında deri altı, ven içi ve
periton içi gibi muhtelif yollardan yapılan şiringalar ile eşit netice-
ler elde edilmektedir. Alçak titrede faj kültürü veya zayıf antijenik
kabiliyeti olan faj kültürü kullanıldığında ise deri altı yolunun daha
üstün olduğu söylenmektedir (1). Şiringalar arasındaki müddet hu-
susî bir ehemmiyet göstermemekte, yalnız uygun zaman aralıkların-
da kâfi miktarda antijen kullanmak icap etmektedir. Tecrübeleri-
mizde 6 hafta müddetle haftada iki defa 1 cm³ fajın deri altına şir-
inga edilmesi ile iyi neticeler alınmıştır.

Bakteriyofaj bağışık serum ile karıştırıldığı zaman nötrale
edilmektedir. Fakat bu reaksiyon anide olmamakta ve yüzde kanu-
nuna göre zamanla ölçülebilen muayyen bir nisbet dahilinde olmak-
tadır (8). Bu nisbet faj konsantrasyonuna, antikorun tesir ve kon-
santrasyonuna, zamana ve hararete bağlıdır. Hararet sabit olduğu
takdirde reaksiyon $K = 2,3 \times D / t \times \log Po / P$ şeklinde ifade
edilmektedir. Bu formül reaksiyona giren fajlar % 90 - 99 nispe-
tinde nötrale olduğu zaman kullanılabilir.

K seruma ait bir değerdir. Serumun K değeri bir defa tayin
edildikten sonra, bakteriyofajın istenilen miktarının nötralizasyonu
için serumun ne kadar sulandırılacağı formülden kolaylıkla hesap-
lanabilmektedir. Zira formülde Po/P nispetini istediğimiz şekilde
alabiliriz, t ise yine istediğimiz zamanı göstermektedir. K da seruma
ait bilinen bir değer olduğundan kıymetler yerine konunca D kolay-
lıkla bulunmaktadır.

Maamafih K'nin değeri, serumun nötralizasyon kıymetinden
mutlak olarak ayrı değildir. Serumun nötralizasyon nispeti yüksel-
dikçe, sulandırılma nispeti D ve serumun K değeri de artmaktadır.
Bununla beraber K kıymeti, muayyen hudutlar dahilinde olmak üze-
re serumun son derece kıymetli bir hususiyetidir.

NETİCE

- 1 — D₂₀, T₆, T₁, T₇, T₃ ve T₂ fajlarının tavşanlara 3—4 defa
şiringasından sonra bile tavşan kanında nötrale edici antikor-
lar yükselmektedir.
- 2 — Tavşanlara şiringa edildiğinde en iyi antijen kabiliyetini
D₂₀ ve T₆ fajları, bunları takiben T₁, T₇, T₃, T₂ fajları göster-
miştir.
- 3 — T₁ ve T₃ fajları tavşanlarda nötrale edici antikorları hu-

sule getirmek için iyi antijen değillerdir. Bu bakteriyofajlar adjuvant ile beraber şırınga edildiğinde nispeten daha iyi neticeler alınmıştır.

- 4 — Bakteriyofajlar tavşanlara şırınga edilmekle tavşan kanında şırınga edilen bakteriyofaja ve buna akraba olan fajlara karşı nötrelize edici antikorlar husule gelmiş ve şırıngalara 6 hafta müddetle devam edildiğinde antikorların miktarı gittikçe yükselmiştir. Muayyen zamanlarda tavşanların kanı alınıp serumunda K değeri tayin edildiğinde, şırıngalara devam edildikçe serumun K değerinin de gittikçe yükselmekte olduğu görülmüştür.

CONCLUSIONS

- 1 — A la suite de trois ou quatre injections des phages D_{20} , T_6 , T_4 , T_7 , T_3 , T_2 respectivement chez les lapins experimentaux, des anticorps neutralisants se sont produits.
- 2 — L'injection chez le lapin a surtout manifesté les propriétés antigéniques des phages D_{20} et T_6 et ensuite des phages T_4 , T_7 , T_3 et T_2 .
- 3 — Les phages T_1 et T_5 ne motrent pas de propriétés antigéniques capables de produire des anticorps neutralisants chez le lapin. Lors de l'injection de ces bactériophages accompagnée de l'adjuvant, les résultats obtenus sont relativement meilleurs.
- 4 — En injectant les bactériophages aux lapins, des anticorps neutralisants à l'égard de ces bactériophages inoculés et leurs phages apparentés deviennent manifestes et si l'on continue les injections pendant 6 semaines le titre des anticorps augmente de plus en plus. On a également constaté qu'en cas d'évaluation à des périodes déterminées, de la valeur de K dans le sérum sanguin des lapins, à mesure que l'on continue les injections, la valeur de K s'élève progressivement.

CONCLUSIONS

- 1 — Following three or four D_{20} , T_6 , T_4 , T_7 , T_3 , and T_2 phage injections respectively to the experimental rabbits, neutralising antibodies were produced.
- 2 — The injection to the rabbit has particularly manifested the

antigenic properties of the D₂₀ et T₅ phages and next those of T₄, T₇, T₃ and T₂₄ phages.

- 3 — T₁ and T₅ phages do not show antigenic properties able to produce neutralising antibodies in the rabbit. While injecting these bacteriophages accompanied by the adjuvant, the results were relatively better.
- 4 — By injecting bacteriophages to rabbits neutralising antibodies towards these inoculated bacteriophages and their related ones become manifest and if injections are continued on for six weeks, the antibody titre increases more and more. In case of evaluation of K in the blood serum of rabbits, at given periods, the more the injections are continued the more the value of K increases.

LITERATÜR

- 1 — ADAMS, M. H. (1950): Methods of study of bacterial viruses in methods in medical research. Vol. II. The year book publishers, Chicago, 1.
- 2 — DELBRÜCK, M. (1945): Effects of specific antisera on the growth of bacterial viruses. *J. Bact.* 50, 137.
- 3 — DELBRÜCK, M. (1946): Experiments with bacterial viruses, *Harvey Lect.* 41, 161.
- 4 — DOMEREC, M., FANO, M. (1945): Bacteriophage, resistance mutants in *Escherichia coli*, *Genetics*, 30, 119.
- 5 — GRATIA, A. (1936): Numerical relations between lysogenic bacteria and particles of bacteriophage. *Ann. Inst. Pasteur*, 57 652.
- 6 — FREUND, J., THOMPSON, K. J., BOUGH, H. B., SOMMER, H. E., PISANI, T. M. (1948): Antibody formation and sensitization with the aid of adjuvants *J. Imm.* 60, 383.
- 7 — LURIA, S.E. (1953): *General virology*, P: 125.
- 8 — ANDREWES, C. H., ELFORD, W. J. (1933): Observations on antiphage sera. I. «The percentage law», *Brit. J. Exp. Path.* 14 367.