

MYCOPLASMA PNEUMONIAE AŞILARI İLE KOBAYLARDA GECİKMİŞ TIP AŞIRI DUYARLILIĞIN ARAŞTIRILMASI

Dr. Erdal TUNCEL

ÖZET

Bu araştırmada, Mycoplasma pneumoniaenin çeşitli aşı susları tarafımızdan hazırlandı. Bunlar 20 şer adetlik 3 ana gruptaki kobay'lar üzerinde; Burun içi, periton içi ve kas içi yollarla aşılamalar uygulandı. Aşılama, 14 er gün ara ile üç defa tekrarlandı. Her aşılama peryodi içerisinde deri testi uygulandı. III. Aşılamadan 21 gün sonrada Makrofaj Göçü Önlenim Deneyi (MGÖ) için kobaylar öldürülerek periton sıvısı alındı ve sonuçları tartışıldı.

GİRİŞ VE AMAÇ

Önceleri primer atipik pnömoni olarak adlandırılan M. pneumoniae pnömonisi geçiren kişilerin bu hastalığa ikinci defa yakalanma olasılığının çok az olduğu gözlenmektedir (1,2). Tüm Bakteriyel pnömonilerin % 15-20 sini oluşturan M. pneumoniae pnömonisine karşı, toplumu bu enfeksiyona karşı koruyucu nitelikte bir aşı geliştirilmesine yönelik bir çok araştırmalar yapılmaktadır. (1,2,3,4).

Çeşitli ülkelerde, bu konu üzerinde yapılan çalışmalar sonucu, M. pneumoniae hakkında birçok bilgi elde edilmesine karşılık, bağışıklıkta önemli yeri olan antijenik uyarı, enfeksiyonu geçiren kişilerde oluşan koruyucu bağışıklığın mekanizması, kitleleri bu enfeksiyondan koruyabilecek nitelikte bir aşının özellikleri, çeşitli araştırmacıların ilgisini çekmektedir (1,5,6,7,8).

Biz bu araştırmamızda, M. pneumoniae aşı dozu ve enfeksiyon dozu çeşitli yollardan kobaylara vererek, Deri tepkimelerini ve Makrofaj Göçü Önlenim Deneyi (MGÖ) ile hücrel bağışıklığın ikinci bir enfeksiyonda etkisini araştırdık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney hayvanı olarak 400-650 Gr. ağırlığında ve 4-5 aylık 71 adet kobay kullanıldı. M. pneumoniae susları American Type Culture Collection (ATCC) dan

sağlanan FM 15531 ve FM 15992 nolu liyofilize suşları kullanıldı. Besiyeri olarak Kenny (9) nin Conan (3)'in, Hayflick (10)in, Kraybill(11)in, Crowford (12) ve aşı hazırlanmasında kaynak 13 de önerilen besiyerleri kullanıldı.

Kılavuz liyofilize *M. pneumoniae* suşları 2 kobayın burun boşluklarına verildi. 14 gün sonra kobaylar öldürülerek göğüs boşluğundan steril koşullarda akciğer alındı ve kıyıldı. Bu akciğer kıyılıştından gerekli besiyerlerine ekim yapılarak üretildi. Kelton (12) dilusyon yöntemi ile colony-forming-Ünits (CFU) 10^5 mikroorganizma sayısına ayarlandı.

Bu dilusyondan;

- a- Canlı *M. pneumoniae* aşısı
- b- İnaktif *M. pneumoniae* aşısı
- c- Enfeksiyon dozu *M. pneumoniae*
- d- Deri testi antijeni hazırlandı(12,14,15).

Kanda dolaşan antikor saptanamıyan ve deri testleri negatif bulunan

71 kobay; 3 ana ve 2 kontrol olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Her ana grupta 20 tavşan bulunuyordu ve bunlarda her bir grup içerisinde 5 er tavşandan 4 alt grub oluşturuldu.

Birinci ana gruba; burun içi (Bİ) yoldan, ikinci ana gruba periton içi (Pİ) yoldan, üçüncü gruba kas içi (Kİ) yoldan;

- a- Canlı *M. pneumoniae* aşısı (CM)
- b- Canlı *M. pneumoniae* aşısı+Freund'un tam adjuvantı (CM+FA)
- c- İnaktif *M. pneumoniae* aşısı. (İM)
- d- İnaktif *M. pneumoniae* aşısı+Freund'un tam adjuvantı (İM+FA) uygulandı.

Kontrol olarak kullanılan birinci grub 5 adet tavşana Burun içi (Bİ) yoldan enfeksiyon dozu canlı *M. pneumoniae* verildi.

İkinci kontrol gruba ise her birine değişik yoldan olmak üzere aşı buyyonu verildi.

1.2. ve 3. grub kobaylara 1. aşılama 14 gün sonra 2. aşılama, 28 gün sonrada 3. aşılama yapıldı. Her aşı uygulamasının 14. gününde diğer bir araştırmada kullanılmak üzere kalp ponksiyonu ile kan alındı ve deri testi yapıldı.

3. aşılama 21 gün sonrada 5 ana gruptaki tüm kobaylara periton içine mineral oil verilmesini takip eden 5. günde kalpten alınabildiğince kan alınarak ilerde bir araştırmaya konu olmak üzere serumu ayrıldı ve -70°C lik dondurucuda

saklandı. Daha sonra kobaylar eterle öldürüldüler. Karın boşlukları açılarak periton sıvısı alındı. Hücreler ayırt edildi ve bu hücreler M.G.Ö. deneyinde kullanıldı. (16,17).

BULGULAR

1- 1. aşılama 14 gün sonra yapılan deri testi sonuçları:

a) Canlı *M. pneumoniae* (CM) aşısı verilenler: Burun içi (Bİ) yoldan verilenlerin üçünde (3/5), periton içi (Pİ) yoldan verilenlerin ikisinde (2/5), kas içi (Kİ) yoldan verilenlerin birinde (1/5) deri testi olumlu bulundu

b) Canlı *M. pneumoniae*+Freund tam adjuvanı (CM+FA) aşısı verilenler: Bİ yoldan verilenlerin üçünde (3/5), Pİ yoldan verilenlerin ikisinde (2/5), Kİ yoldan verilenlerin ikisinde (2/5), test olumlu bulunmuştur.

c) İnaktif *M. pneumoniae* (İM) aşısı verilenler:

Pİ ve Kİ yoldan verilenlerin üçünde (3/5) test olumlu bulunmuş, Bİ yoldan verilenlerin ise tümünde olumsuz sonuç alınmıştır . (0/5).

d) İnaktif *M. pneumoniae*+Freund'un tam adjuvanı (İM+FA) aşısı verilenler:

Pİ yoldan verilenlerin üçünde (3/5), Kİ yoldan verilenlerin ikisinde (2/5) test olumlu bulunmuş, Bİ yoldan verilenlerin tümünde sonuç olumsuz bulunmuştur. (0/5).

2. II. Aşılama 14 gün sonra yapılan deri testi sonuçları:

a) CM aşısı verilenler:

Bİ ve Pİ yoldan verilenlerin üçünde (3/5), Kİ yoldan verilenlerin ikisinde (2/5) test olumlu bulunmuştur.

b) CM+FA aşısı verilenler:

Bİ, Pİ ve Kİ yoldan aşı uygulananların hepsinde de olumlu sonuç alınan kobay sayısı üç adettir. (3/5).

c) İM aşısı verilenler:

Pİ ve Kİ yoldan verilenlerin üçünde (3/5) sonuç olumlu bulunmuştur. Bİ yoldan verilenlerde ise sonuç tümünde olumsuz olarak değerlendirilmiştir (0/5).

d) İM+FA aşısı verilenler:

Kİ yoldan verilenlerin üçünde (3/5), Pİ yoldan verilenlerin ikisinde (2/5) test olumlu bulunmuş, Bİ yoldan verilenlerde ise hepsinden olumsuz sonuç alınmıştır. (0/5)

3. III. Aşılamadan 14 gün sonra yapılan deri testi sonuçları:

a) CM aşısı yapılanlar:

Bİ yoldan verilenlerin dördünde (4/5), Kİ ve Pİ yoldan verilenlerin de üçünde (3/5) olumlu sonuç alınmıştır.

b) CM+FA aşısı verilenler:

Kİ yoldan verilenlerin dördünde (4/5), Bİ ve Pİ yoldan verilenlerin de üçünde (3/5), test sonucu olumlu bulunmuştur.

c) İM aşısı verilenler:

Kİ ve Pİ yoldan verilenlerin üçünde (3/5) olumlu sonuç, Bİ yoldan verilenlerde ise olumlu sonuç alınamamıştır. (0/5).

d) İM+FA aşısı verilenler:

Kİ yoldan verilenlerin dördünde (4/5), Pİ yoldan verilenlerin ikisinde (2/5) olumlu sonuç alınmış, Bİ yoldan verilen tüm kobaylarda olumsuz sonuç alınmıştır.

Deri testi sonuçları ve M.G.Ö. sonuçları şekil de gösterilmiştir.

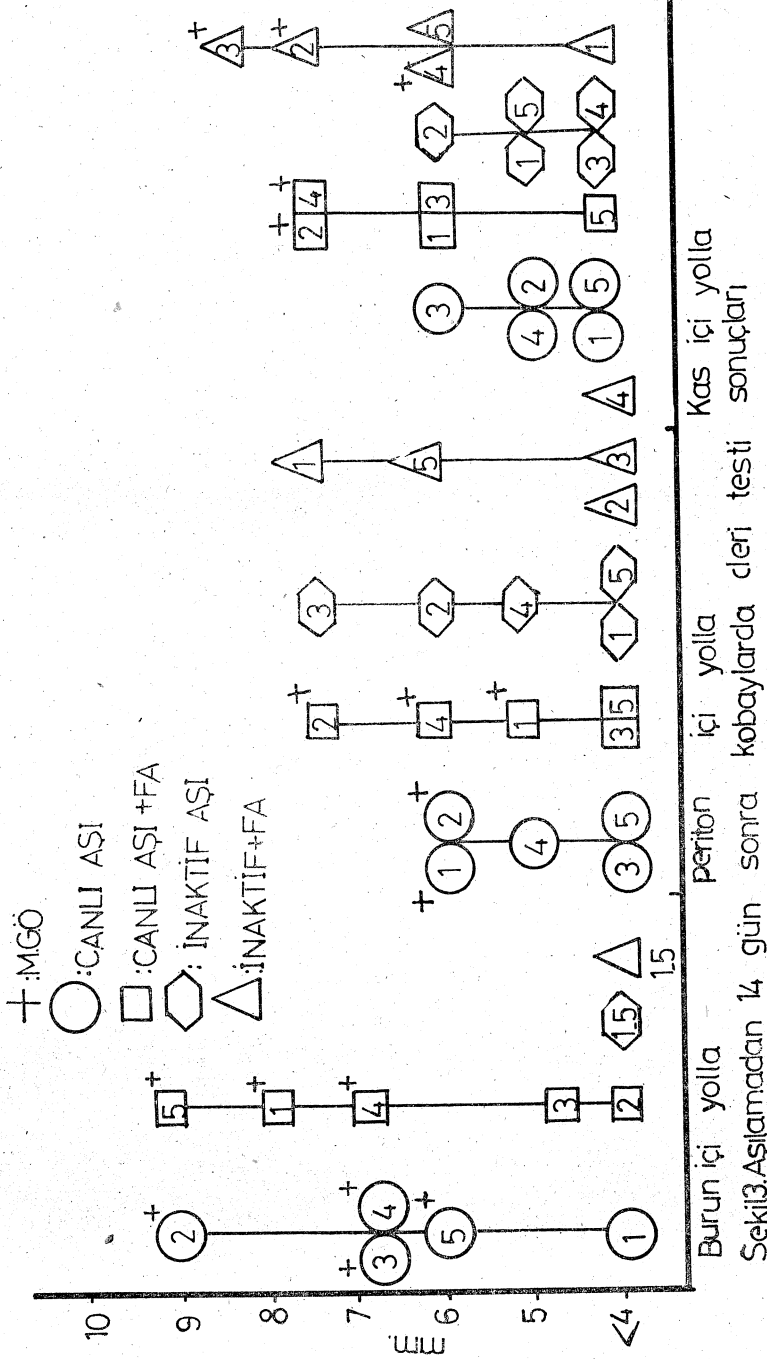
TARTIŞMA

Çeşitli araştırmacılar *M. pneumoniae* pnömonisi tanısı konan olgularda özgül deri tepkimesi testlerinin olumlu sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Akciğer reaksiyonu ile paralel bir şekilde olumlu bulunan deri testleri arasında bir hücrel bağışıklık ilişkisi varsayımı kabul edilerek bu varsayımı kanıtlamaya yönelik çalışmalar yapılmıştır (1,2,15).

Brunner ve arkadaşları (18), *M. pneumoniae* ile enfekte edilip pnömoni oluşturulan çeşitli hayvanlarda hücrel immun cevabın en iyi şekilde kobaylarda geliştiğini bildirmişlerdir. Bizde yaptığımız ön çalışmalarda kobayların tavşanlara oranla daha iyi bağışıklık cevabı verdiklerini saptıyarak deney hayvanı olarak kobayları kullandık.

Uyguladığımız deri testlerinin sonuçları incelendiğinde, yalın, canlı ve inaktif aşı uygulanan kobaylara 14 er gün ara ile yapılan 3 ayrı deri testinden olumlu sonuç saptananlardaki ortak nokta, cevapların ilk 10 saat içinde başlaması, 24 saat içinde en geniş boyutlara ulaşması, 48 saat sonunda ise gerilemeye başlayarak 72 saat sonra görünmez duruma gelmeleridir.

Deri tepkimesinde, kullanılan antijenin biyokimyasal yapısında önemi vardır. Mituzani (15) deri tepkimesi yapabilen antijenin lipid fraksiyonda olmayan, ısıya dayanıklı (ancak 100°C de 0.8 N HCl ile 30 dakika kaynatmakla aktivi-



tesini kaybeden) bir fraksiyonda olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacı başka bir çalışmada M. pneumoniae pnömonili hastalarda deri testi yapmada kullandığı antijenin protein-nitrojen konsantrasyonu 0.02 mg./ml. ye ayarlayarak yaptığı deri tepkimesi testinde olumlu yanıt, alabilmiştir. (19).

Suzuki ve Ark. (7) M. pneumoniae'nin deri tepkimesine neden olabilen antijen bileşiminin polisakkarit-protein fraksiyonunda olduğunu, bu antijen kompleksinin MGÖ. deneylerinde de kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Biz deneylerimizde kullandığımız deri testi ve MGÖ. antijenlerinin hazırlanmasında Mituzani (15) nin önerdiği yöntemi uyguladık.

Araştırmamızda en şiddetli deri tepkimesini Kİ yoldan İM+FA, Bİ yoldan CM ve CM+FA aşısını 3. kez yaptıktan 14 gün sonra uyguladığımız deri testleri sonucu elde ettik.

Bİ yolla FA eklenen aşılarda yapıldığı kobaylarla yalın aşı verilen kobaylar arasında belirgin fark bulunamazken, Pİ ve Kİ yolla aşı uygulamasında özellikle tepkimenin şiddeti bakımından FA eklenmiş aşı yapılanlarla yalın aşı yapılanlar arasında önemli fark bulunmuştur.

Araştırmada elde ettiğimiz deri tepkimesi sonuçlarını ileri sürerek kobayların bu tür aşılama ile bağışık kılındığını ve bu kobayları bundan sonra oluşabilecek bir enfeksiyona duyarlı duruma getirdiğimizi savunmuyoruz. Amacımız deri testlerinden aldığımız sonuçları GTAD in-vitro deneyi olan MGÖ deneyi ile karşılaştırmak ve bunda etkili olan antijenin veriliş yolunu saptamaktır.

Üç değişik yoldan niteliği değişik 4 aşısı 3 er kez ard arda uyguladıktan sonra kobayların periton sıvısından elde ettiğimiz makrofajlarla yaptığımız MGÖ. deneyi sonuçlarına bakacak olursak; Bİ yolla CM ile aşılananlarda yüzde 80, CM-FA aşısı alanlardaysa yüzde 60 oranında MGÖ. deneyini olumlu bulduk. Pİ yoldan aşı uygulamasında da CM aşısı verilenlerde yüzde 40, CM+FA aşısı verilen grupta yüzde 60 oranında MGÖ. deneyi olumlu bulunmuştur.

Kİ aşısı uygulanan gruplarda ise, Freund'un tam adjuvantı eklenmiş canlı ve inaktif aşı verilen gruplarda olumlu sonuç alınmış, CM+FA uygulananlarda yüzde 40, İM+FA uygulananlarda ise yüzde 60 oranında MGÖ. deneyinden olumlu sonuç alınmıştır.

Üçüncü aşından sonra yapılan deri testlerinde Bİ yoldan canlı aşı verilen grupta önemli deri tepkimesi veren 2,3,4, ve 5 nolu kobayların hepsinde MGÖ. olumlu bulunurken CM+FA verilen grupta ise olumlu deri testi veren 1,2,3,4,5 nolu kobaylardan sadece 3 nolu kobayda olumlu bulunamamıştır.

Pİ yolla CM aşısı uygulanan gruplarda deri tepkimesi veren 1,2,4, nolu kobaylardan yalnız 4 nolu kobayda MGÖ. olumlu bulunamamıştır. CM+FA uygulanan grupta deri tepkimesi veren 1,2,4 nolu kobayların hepsinde MGÖ.

olumlu bulunmuştur. İM ve İM+FA aşı uygulananlarda deri testi olumlu bulunarlarda MGÖ. deneyi olumsuz bulunmuştur.

Kİ yolla CM aşısı uygulanan gruplarda deri tepkimesi veren 2,3,4 nolu kobaylar ile, İM verilen Kobay gruplarında 2,3,5 nolu kobaylarda ve CM+FA aşısı uygulanan grupta deri tepkimesi veren 1,2,3 4, nolu kobaylardan 1,3 nolu-sunda, IM-FA verilen ve deri tepkimesi veren 4 nolu kobayda ise MGÖ. olumlu bulunamamıştır. (Bak şekil)

Deri testi olumlu bulunan kobaylarda MGÖ. deneyinin olumsuz bulununun nedenini şöyle açıklayabiliriz: MGÖ. deneyi olumsuz olan deri tepkimele-rinin Jones-Mote tipi bir tepkime olması olarak içindedir (20).

SONUÇ

M. pneumoniae pnömonilerin korunmasında kullanılabilecek nitelikte bir aşı hazırlanmasında temel oluşturabilme amacına yönelik bu araştırma serisinde saptadığımız bulgular şu sonuçları ortaya çıkarmaktadır;

Freund'un tam adjuvantı eklenmiş aşı uygulamalarında deri tepkimesinin yalın aşı uygulamalara oranla daha şiddetli olduğu ve en şiddetli deri tepkimesinin Bİ yoldan CM+FA ve CM aşısı verilenlerle Kİ yoldan İM+FA aşısı verilen grubun 3. kez aşılanmaları sonrası elde edildiği görülmüştür.

Gerek deri testi sonuçları, gerekse MGÖ. deneyi sonuçları gözönüne alındığında Freund'un tam adjuvantı eklenmiş aşı uygulamalarında gecikmiş tip aşırı duyarlılığın daha yüksek oranda uyarıldığı anlaşılmaktadır.

Bİ ve Pİ yoldan ve FA eklenmiş aşı uygulananlarda olumlu deri tepkimesiy-le MGÖ. testi sonuçları uyumluluk göstermektedir. Kİ yoldan aşı uygulanma-larında bu paralellik yalnızca FA eklenmiş canlı (CM+FA) ve inaktif (İM+FA) aşılarda görülmektedir.

SUMMARY

INVESTİGATING THE DELAYED TYPE HYPER SENSİTİVİTY RUSULTİNG FROM MYCOPLASMA PNEUMONİAE VACCİNE IN GUNEA PİGS

In this research various vaccine strains of Mycoplasma pneumoniae were prepared. They were administered intranasally, intra-peritonally and intramuscularly to three groups of Guinea pigs each of which consist of 20 animals.

Vaccination was Repeated Three times with 14 day intervals. Within each vaccination period. Skin tests were carried out. Twentyone days after third appli-cation by killing the guinea pigs their peritoneal fluids were obtained for Macrop-hage Migration inhibition factor experiments, and the results were discussed.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Denny, F.W., Taylor-Robinson, D., Allison, A.C.: The role of thymus-dependent immunity in *Mycoplasma pulmonis* infections of mice J. Med. Microbiol. 5: 327-336, 1972.
2. Taylor, G., Taylor-Robinson, D.: The part played by cell-mediated immunity in *Mycoplasma* respiratory infections, Dev. Biol. Stand., 28: 195-210, 1975.
3. Conant, R.M., Somerson, N.L., Senterfit, L.B.: Immunodiffusion reactions between human sera and *Mycoplasma pneumoniae*, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 129-401-411, 1968.
4. Greenberg H., Helms C.M., Grizzard, M.B.: Immunoprophylaxis of experimental *Mycoplasma pneumoniae* disease: Effect of route of administration on the immunogenicity and protective effect of inactivated *Mycoplasma pneumoniae* vaccine, Infection Immunity, 16, 1: 88-92, 1977.
5. Fernald, G.W., Clyde, W.A.: Protective effect of vaccines in experimental *Mycoplasma pneumoniae* disease, Infect. Immun. 1: 559-565, 1970.
6. Taylor, G., Taylor-Robinson: Effects of active and passive immunization on *Mycoplasma pulmonis*-induced pneumonia in mice, Immunology 30, 5: 611-618, 1976.
7. Suzuki, M., Hayashi, Y., Arai, S., Kumaga, K.: Studies on delayed hypersensitivity of antigens isolated from *Mycoplasma pneumoniae* cell, Japans. Mikrobiol. 20, 3: 191-196, 1976.
8. Mo gabgab, W.J., Marchand, S., Beville, R.: Efficacy of inactivated *Mycoplasma pneumoniae* vaccine in man, Develop. Biol., Standard, 28: 597-608, 1975.
9. Grayston, J.t, Alexander, E.R., Kenny, G.E., Clarke, E.R.: *Mycoplasma pneumoniae* infections: Clinical and epidemiological studies. JAMA. 191: 369-374, 1965.
10. Hayflick, L.: Tissue Cultures on mycoplasmas. Tex. Rep. Biol. Med. 23: (Supl. I), 295-303, 1965.
11. Kraybill, W.H., Crawford, Y.E.: Selective medium and color test for *Mycoplasma pneumoniae*, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 128: 365-369, 1965.
12. Growford, Y.E.: A Laboratory guide to the mycoplasmas of human origin. (Second edition). Namru-4, Great Lakes, Illinois, 1971,
13. Lennett, E.H., Sypaulding, E.H., Truant, J.P., Manual of Clinical Microbiology. Washinton. D.C. 1974, 911.

14. Taylor-Robinson, D., Durcell, R.H., Wong, D.C. and Chanock, R.M.: A colour test for the measurement of antibody to certain mycoplasma species based upon the inhibition of acid production, *J. Hyg.*, 63: 91-104, 1966.
15. Mizutani H.: The antigens participating in the macrophage migration inhibition to *Mycoplasma pnevumoniae*, *American Review of Respiratory Disease* 111: 566-569, 1975.
16. Alkan, Ş.Ş.: Agarozda akyuvar yayılım önlenim deneyi, *Mikrobiyoloji Bülteni*, 10,4: 423-435, 1976.
17. David, J.R., Al-Askari, S., Lawrence, H.S., Thomas, L.: Delayed hypersensitivity in vitro I. The specifity of inhibition of cell migration by antigens, *J. Immunol.*, 93: 264-273, 1964.
18. Brunner, H., James, W.D., Horswood, R.L., Chanock, R.M.: Experimental *Mycoplasma pneumoniae* infection of Young guinea pigs, *J. Infect. Dis.* 127: 315-318, 1973.
19. Mizutani, H., Mizutani, H., Kitayama, T., Hayakawa, A.: Delayed hypersensitivity in *Mycoplasma pneumoniae* infections- *Lancet*, 23: 186-187, 1971.
20. Richerson, H.B., Dvorak, H.E., Leskowitz, S.: Cutaneous basophyl hypersensitivity I. A new look at the Jones-Mote reaction, general characteristic, *J. Exp. Med.*, 132: 546-557, 1970.