

ÇEŞİTLİ YOLLARDAN VE DEĞİŞİK NİTELİKLİ M. PNÖMONİAE AŞISI UYGULANAN KOBAYLARDA DOLAŞAN ANTİKOR DÜZEYLERİ

Dr. Erdal TUNCEL x

ÖZET

Mycoplasma pneumoniae'nin canlı ve ısıyla öldürülmüş şekilleri yalın halde ve ayrıca Freund'un tam adjuvanı karışımı ile değişik nitelikte aşı materyalleri hazırlandı.

Bu aşılarda; 3 ana gruptaki 60 adet kobaya burun içi, periton içi ve kas içi aşılamalar uygulandı.

Sonuçta; Aşılanan tüm kobaylarda III. aşılama sonrası antikor titrelerinin aritmetik ortalaması şu şekilde saptandı: Kompleman birleştiren antikor titresi en

yüksek, kas içi CM+FA aşısı verilen kobaylarla (147.2), soğuk aglutinasyon antikorları en fazla burun içi canlı aşı alan kobaylarda (71.8), üreme inhisisyon antikor titresi en fazla burun içi CM+FA aşısı alan kobaylarda saptandı.

GİRİŞ VE AMAÇ

Ürogenital sistem hastalıklarındaki yerlerinin tam olarak bilinmemesine karşın; Mycoplasma pneumoniae (M. pneumoniae) diye adlandırılan bu mikroorganizimlerin primer atipik pnömoni (M. pneumoniae pnömonisi) etkeni olduklarının anlaşılmasından sonra bu konu üzerinde yoğun çalışmalar başlatılmıştır. (1,2,3,4,5,6,7).

M. pneumoniae pnömonisi geçirip iyileşen kişilerin bu hastalığa ikinci defa yakalanma olasılığının çok az olmasına karşın; duyarlı deney hayvanlarına çeşitli yollarla uygulanan değişik nitelikteki aşılamalar sonrası, görünüşte bir immün cevabın oluştuğu, fakat bunun koruyucu nitelikte olmadığı çeşitli araştırmacılarca saptanmıştır (8,9,10,11). Enfeksiyonu geçiren kişilerde oluşan bu bağışıklığın mekanizmasını açıklamaya yönelik laboratuvar çalışmalarının ilk aşamasında etkenin antijenik yapısı üzerinde durulmuştur. (12,13) M. pneumoniae'nin çeşitli

antijenik fraksiyonları elde edilmiş, duyarlı deney hayvanlarına herbir fraksiyonun enjeksiyonu sonrası bunlara karşı serumda oluşan özgül antikor titreleri ölçülmüş ve enfeksiyonu geçiren insanlarda oluşan koruyucu nitelikteki bağışıklıkla laboratuvar koşullarında saptanan bu bulgular arasında ilişki kurulmağa çalışılmıştır. (14,15,16).

Biz bu araştırmamızda; *M. pneumoniae* aşı dozu ve enfeksiyon dozu uygulanan kobay gruplarında yüksek titrede dolaşan antikorlar oluşturmaya çalıştık ve sonuçta oluşan bu dolaşan antikorların yeni bir enfeksiyonda koruyuculuk derecesini, kitleleri bu enfeksiyondan koruyabilecek nitelikteki bir aşının özelliklerini belirtmeye çalıştık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney hayvanı olarak 400-650 Gr. ağırlığında ve 4-5 aylık 71 adet kobay kullanıldı. *M. pneumoniae* suşları; American Type Culture Collection (ATCC) dan sağlanan *M. Pneumoniae* FM 15531 ve FM 15992 nolu liyofilize suşlar kullanıldı. Besiyeri olarakta çeşitli araştırmacıların önerdiği besiyerleri kullanıldı. (10,17,18,19,20,21).

Liyofilize suşlar ATCC'un önerdiği şekilde üretildi. Colony-Forming-Unit'e göre dilusyonu yapıldı ve bu dilüsyondan:

- a) Canlı *M. pneumonia* aşısı (CM)
- b) İnaktif *M. pneumoniae* aşısı (İM)
- c) Enfeksiyon dozu *M. pneumonia*
- d) Kompleman birleştiren antijen
- e) Üreme inhibisyon antijeni hazırlandı. (17,22,23).

Deneye alınan kobaylar 3 ana ve 2 kontrol olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Herbir ana grupta 20 kobay bulunuyordu ve bunlarda her bir ana grup içerisinde 5'er kobaydan 4 alt grub oluşturuldu.

Birinci ana gruba; burun içi (Bİ), ikinci ana gruba; periton içi (Pİ), üçüncü ana 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 + Freund'un tam adjuvantı (İM+FA) uygulandı.

Kontrol olarak kullanılan birinci grub 5 adet kobaya Bİ yoldan enfeksiyon dozu canlı *M. pneumoniae* verildi.

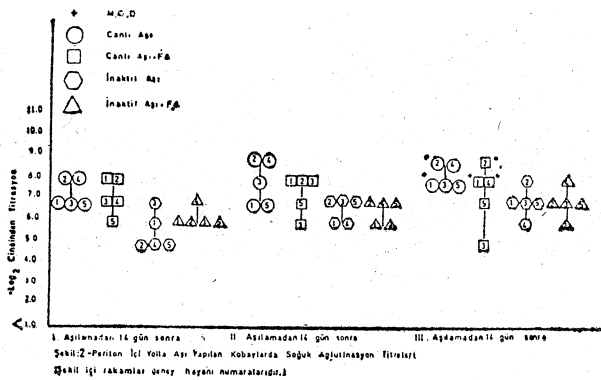
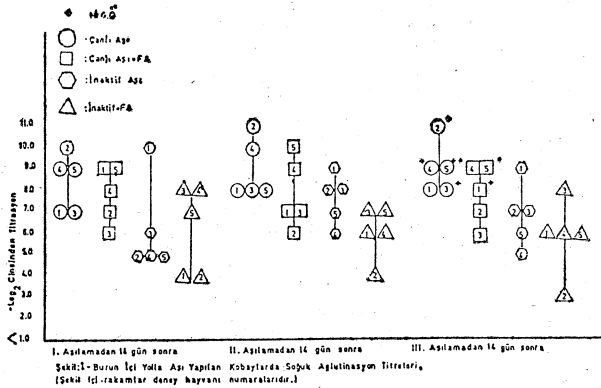
İkinci kontrol gruba ise her birine değişik yoldan olmak üzere aşı buyyonu verildi.

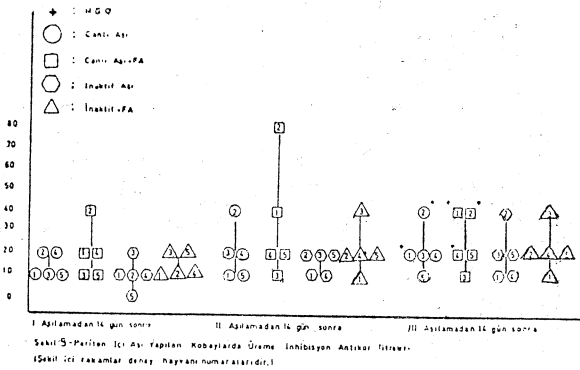
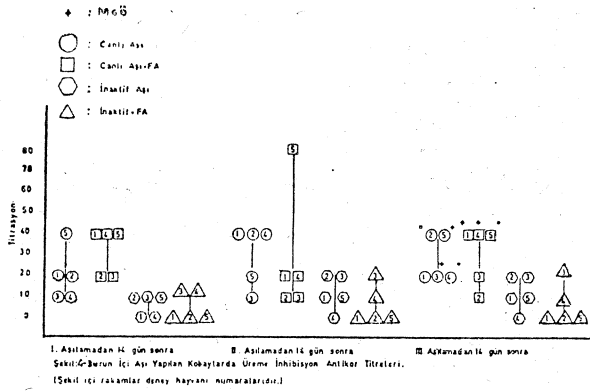
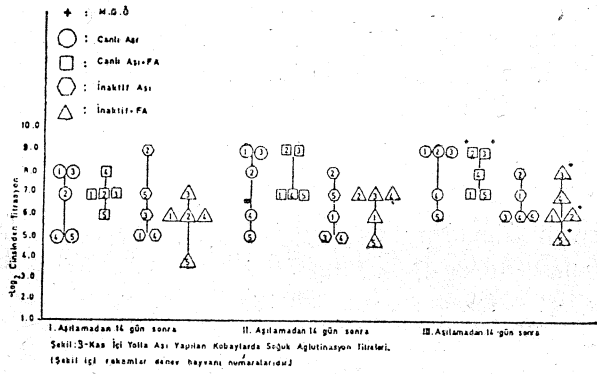
3 ana gruptaki 60 kobaya 2. aşılama, 3. aşılama ve enfeksiyon dozu verilmesinden önce ve sonrası kalp ponksiyonu ile kan alındı, serumu ayırt edildi ve bu serumlardan soğuk aglutinasyon (SA), kompleman birleştirmesi, deneyi (KBD) ve üreme inhibisyon testi (Üİ) uygulandı. 22,24,25).

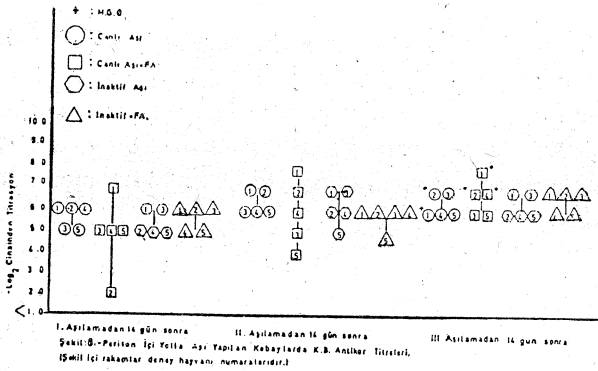
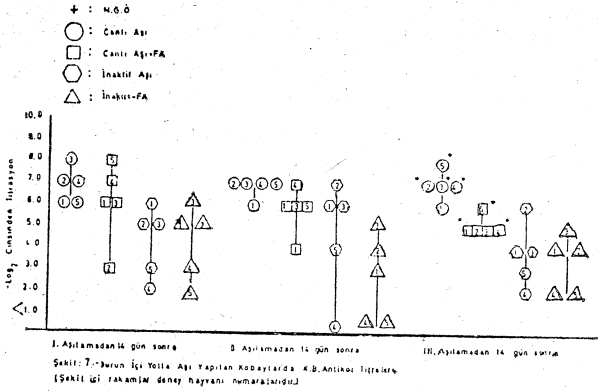
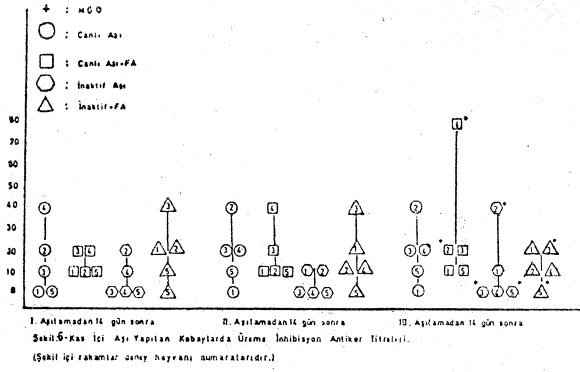
BULGULAR

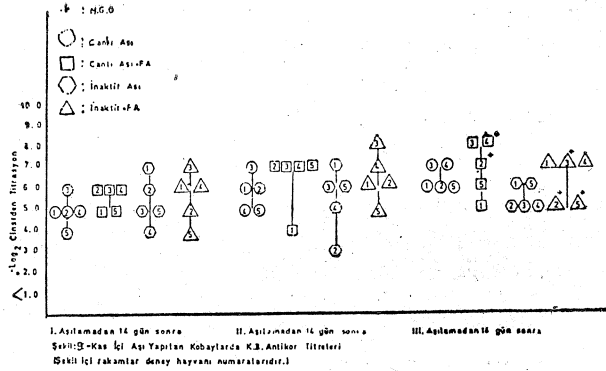
Aşılamaya başlamadan önce deneye alınan kobayların tümünden kan alınmış ve serumlarında soğuk aglutinasyon (SA), kompleman birleşmesi deneyi (KBD) sonuçları olumsuz, üreme inhibisyon (Üİ) testleri ise 1/10 nun altında bulunmuştur.

Yöntem bölümünde belirtildiği gibi deneye alınan tüm kobaylara 3 değişik yolla ve değişik nitelikli 4 tür aşı uygulanmış ve I,II. ve III. aşılama 14. gün sonra yapılan soğuk aglutinasyon deneyi sonuçları; Şekil: 1,2,3 de, üreme inhibisyon deneyi sonuçları Şekil: 4,5,6 da ve kompleman birleşmesi deneyi sonuçları; Şekil: 7,8,9 da gösterilmiştir.









TARTIŞMA

Çeşitli araştırmacılar, *M. pneumoniae* pnömonisi geçiren kimselerde bir bağışıklığın meydana geldiğini, aşı yapılan gönüllerde ise dolaşan antikorlarda artış olmasına karşın duyarlılığın devam ettiğini saptadılar (8,9,10,11) Bu konuda yapılan çalışmalar sonucu; Adı geçen infeksiyondan korunmada hücresel bağışıklığında önemli yeri olduğu kanısına varmışlar ve bağışıklamada, bu tip bir bağışıklığın sağlanması, gerekli aşılardan geliştirilmesi ve verilmiş yolları için yoğun çalışmalar sürdürülmektedir (23,26,27,28).

Biz de araştırma serimizin konusunu içeren deri tepkimesi, MGÖ. ve pnömoni lezyonları yanından; çeşitli yollardan ve değişik nitelikli aşı uygulanan kobay gruplarında *M. pneumoniae* mikroorganizmine karşı oluşan dolaşan antikorların durumu nedir, bunu açıklığa kavuşturmak istedik.

Soğuk aglutinasyon titrelerinde; Bİ yolla canlı aşı verilen kobaylar ile Pİ ve Kİ yolla canlı aşı verilen kobaylar arasında Bİ lehine önemli bir fark saptanmıştır. ($t=4$; $P<0,05$ ve $t=4.1$; $P<0.05$).

Bİ ve Kİ yolla yapılan aşı tekrarlanmalarında soğuk aglutininlerde önemli bir artış saptanamamıştır. Sadece Pİ yolla canlı aşı uygulanan kobaylarda birinci aşı ile üçüncü aşı tekrarlarında önemli bir antikor yükselmesi görülmüştür. ($t=2.6$; $P<0.05$). Buna benzer aglutinin yükselmesi Pİ yolla CM+FA aşısı verilen kobaylarda görülmüş, birinci aşı ile üçüncü aşı tekrarlanmasında önemli bir fark bulunmuştur ($t=3.9$; $P<0.05$).

Bu durum diğer aşı cinslerinde bulunamamıştır. Bİ ve Kİ yolla aşılanan gruplarda verilen aşı türlerinin de oluşturdukları soğuk aglutinin titrelerinde önemli bir fark saptanamamıştır. Sadece Pİ yolla canlı aşı uygulanan kobaylar ile inaktif aşı uygulanmış kobaylar arasında canlı aşı lehine önemli derecede aglutinin yüksel-

mesi görülmüştür. ($t_1=3.3; t_2=3.2, t_3=3.1; P<0.05$) Aynı şekilde CM+FA uygulanan kobay grubu ile İM+FA aşısı verilen kobaylar arasında CM+FA aşısı lehine, soğuk aglutinin yükselmesi görülmüştür. ($t=2.6; P<0.05$) MGÖ ve deri tepkimesi arasında ise bir ilişki kurulamamıştır. Şekil: 1,2,3).

Üreme inhibisyon antikor titrelerinde birinci aşılama CM+FA aşısı verilen kobaylarda Bİ yolla aşılanaanlar ile Kİ yolla aşılanaanlar arasında Bİ lehine antikor yükselmesi saptanmıştır. ($t=3.3; P<0.05$) Diğer gruplarda birinci aşılamaaların verilış yolları arasında bir fark saptanamamıştır.

İkinci aşılamaada sadece IM+FA uygulanan kobaylar arasında Bİ yolla aşılanaan kobaylarla Pİ yolla aşılanaanlar arasında Bİ lehine önemli bir fark saptanmıştır. ($t= 2.6; P<0.05$) Diğerlerinde ise bir farklılık bulunamamıştır.

Bİ, Bİ ve Kİ yolla aşı uygulanan kobay gruplarında birinci aşı ile aşı tekrarlamaaları arasında üreme inhibisyon (Üİ) antikor titrelerinde bir artma saptanamamıştır, ancak Pİ yolla canlı aşı uygulanan kobaylarda Bİ yolla inaktif aşı uygulananlar arasında canlı aşı lehine önemli bir fark saptanmıştır. ($t=3.8; P<0.05$) Aynı şekilde CM+FA aşısının Bİ yolla verilmesiyle İM+FA aşısının Bİ yolla verilmesi arasında CM+FA lehine Üİ antikor titrelerinde bir fark bulunmuştur. ($t= 5.1; P<0.05$) (Şekil: 4.5.6)

Şekil 7.8.9 da görüldüğü gibi kompleman birleştiren antikor titreleri değışik yollardan ve değışik nitelikli aşı uygulanan kobay grupları arasında az çok bir farklılık göstermektedir.

Birinci aşılamaalarda Bİ yoldan canlı aşı alan gruplar ile KI yoldan canlı aşı alanlar arasında Bİ aşı lehine ($t=2.6; P<0.05$) ve yapılan ikinci aşılamaalarda Bİ yoldan canlı aşı alanlar lehine önemli bir fark bulunmuştur. ($t=2.4; P<0.05$) Yine ikinci defa İM+FA aşılamaalarda Bİ aşılama ile Kİ aşılama arasında Kİ lehine; Bİ aşılama ile Pİ aşılama arasında da Pİ lehine önemli bir fark saptanmıştır ($t=3.1; P<0.05$) ve ($t=5.3; P<0.05$).

Üçüncü aşılamaalarda; CM+FA alan kobay grupları arasında Pİ yolla aşılanaanlar ile Bİ yolla aşılanaanlar arasında Pİ lehine ($t=2.6; P<0.05$); İnaktif aşı uygulanan kobaylarda Pİ yoldan aşı verilenler ile Kİ yoldan aşı verilenler arasında Pİ lehine olmak üzere önemli bir fark saptanmıştır.

İM+FA ile yapılan üçüncü aşılamaalarda Bİ yoldan aşılanaan kobaylar ile Kİ yoldan aşılanaan kobaylar arasında Kİ lehine ($t=3.1; P<0.05$) ve Bİ yolla aşılanaanlarla Pİ yolla aşılanaanlar arasında Pİ yolla aşılanaanlar lehine önemli bir fark saptanmıştır. ($t=4; P<0.05$).

Çeşitli yollardan verilen aşı türlerinin gruplarda meydana getirdiğı KBA. titreleri de karşılaştırıldı. Buna göre Bİ yoldan canlı aşı uygulanan gruplar ile inaktif aşı verilen gruplar arasında canlı aşılama lehine önemli bir fark saptanmıştır.

tır. ($t_1 = 2.7$, $t_2 = 3.6$ ve $t_3 = 2.6$; $P < 0.05$) Bİ yolla aşılamadaki bu farkın canlı aşının lokal bir infeksiyonu sonucu oluşabileceği düşünülebilir. Nitekim canlı organizma ile yapılan Bİ aşılmalarda mikroorganizmler peroksidaz enzimleri dolayısıyla, akciğerlerde lezyonlar oluşturabilmekte ve böylece antikor yapan hücrelerin infiltrasyonunu sağlamaktadır. (29) Diğer bir düşünce şekli de canlı organizmaların buralarda uzun müddet kalarak antikor yapan hücreleri sürekli biçimde uyarım yapmalarıdır. İnaktif aşılar da bu durum söz konusu değildir.

KBA titrelerinde aşılama sonucu bir yükselme görüldü ise de aşı tekrarlarında genellikle önemli bir farklılık saptanmadı. Ayrıca, KBA ile MGÖ ve deri tepkimeleri arasında bir ilişki gözlenemedi.

SONUÇ

Buraya kadar elde edilen bulgularımıza göre kobay gruplarındaki aşılmalarda aşının tek başına verilmesi ile Frenud'un tam adjuvantı karışımıyla birlikte verilmesi, kobaylarda dolaşan antikor titrelerinde önemli bir artışa neden olmamıştır.

KBA titrelerinde aşılama sonucu bir yükselme görüldü ise de aşı tekrarlarında önemli bir artış görülmedi. KBA'ları ile MGÖ ve deri tepkimeleri arasında bir ilişki de bulunamadı. Aynı ilişki soğuk aglutinasyonda da gözlenemedi.) Ancak SA. ve KBA'nın Üİ den daha erken geliştiği ve KBA. titresini ile SA. titrerinin hastalığın akut dönemi ile nekahat dönemi arasında bir ayırımı yarıyabileceğini ortaya koymaktadır.

Bİ yolla canlı aşı uygulamalarında inaktif aşılarla oranla daha yüksek düzeyde KBA, SA ve Üİ antikorları saptanmıştır.

SUMMARY

CIRCULATING ANTIBODY LEVELS IN GUINEA PIGS VACCINATED WITH DIFFERENT QUALITY OF M. PNEUMONIAE VACCINES THROUGH VARIOUS WAYS

Different quality of pure vaccines as well as with Freund's complete adjuvant were prepared from live and heat killed Mycoplasma pneumoniae forms. These vaccines were applied intra nasally, intra peritonally and intra muscularly to sixty guinea pigs in three groups.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Hers J.F., Mosurel, N.: Acute respiratory disease associated with pulmonary involvement in military servicemen in the Netherlands, Amer. Rev. Resp. Dis. , 100: 498-506, 1969.

2. Bartholomew, L.E.: Isolation and characterization of *Mycoplasma* (PPLO) from patients with rheumatoid arthritis, systems lupus erythema nodosum and Reiter's syndrome, *Arthr. Rheumat.*, 8: 376-388, 1965.
3. Katz, H.I.J., Wooten, J.W., Davis, R.G., and Griffin, J.P.: Stevens-Johnson syndrome report of a case with culturally proved *Mycoplasma pneumoniae* infection, *Jama.*, 199: 504-506, 1967.
4. Taylor-Robinson; The importance of mycoplasmas in respiratory infections, *Develop. Biol., St.*, 28: 56-100, 1978.
5. Steele, J.C., Gladstone, R.M.: Thanasop, S. and Fleming, P.C.: *Mycoplasma pneumoniae* as a determinant of the Guillain, Barre syndrome, *Lancet.*, 2: 710-712, 1969.
6. Prix, R., Turkova, M., Vondrackova, A., Bostikova, D.: A case of stevens-Johnson syndrome with antibody for *Mycoplasma pneumoniae*, *Sobrn. Ved. Proc. Lek. Karlov. Univ.*, 11:387-392, 1968.
7. Denny, F.W., Wallace C.A.: *Mycoplasma pneumonia* disease: Clinical spectrum, pathophysiology, epidemiology and controll, *J. Infect. Dis.* 123: 75-92, 1971.
8. 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.
9. Taylor, G., Taylor-Robinson, D.: The part played by cell- mediated immunity in *Mycoplasma* respiratory infections, *Dev. Biol. Satnd.*, 28: 195-210, 1975.
10. Conant, R.M., Somerson, N.L, Senterfit, L.B.: Immunodiffusion reaksions between human sera and *Mycoplasma pneumoniae*, *Proc. Soc. Exp. Biol and Med.*, 129: 401-441, 1968.
11. Greenberg H., Helms C.M., Grizzard, M.B.: Immunoprohyloxis 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.
12. Dvorak, R.: A comparative analysis of the ultrastructure, biology and pathogenicity of mycoplasmas, *Path., Europ.*, 9: 85-103, 1974.
13. Sugiyama, T., Smith, P.F., Langworhy, T.A. and Myberry, W.R.: Immunological analysis of glycolipids and lipopolysaccharides derived from various *Mycoplasmas*, *Infection and Immunity*, 10, 6: 1273-1279, 1974.
14. Fernald, G.W., Clyde, W.A: Protective effect of vaccines in experimental *Mycoplasma pneumoniae* disease, *Infect. immun.* 1: 559-565, 1970.
15. Fernald, G.W.: Role of host response in *Mycoplasma pneumoniae* disease., *J. Infect. Dis.*, 127: 555-558, 1973.

16. Taylor G., Taylor-Robinson: Effects of active and passive immunization on *Mycoplasma pulmonis*-induced pneumonia in mice, *Immunology* 30, 5: 611-618, 1976.
17. Growford, Y.E.: A laboratory guide to the mycoplasmas of human origin. (Second edition). Namru-4, Great Lakes, Illinois, 1971.
18. Grayston, J.T., Alexander, E.R., Kenny, G.E., Clarke, E.R.: *Mycoplasma pneumoniae* infections: Clinical and epidemiological studies. *JAMA*. 191: 369-374, 1965.
19. Lennett, E.H., Spaulding, E.H., Truant, J.P., *Manual of Clinical Microbiology* (Second Edition). American Society for microbiology. Washington. D.C. 1974, 911.
20. Hayflick, L.: Tissue Cultures on mycoplasmas. *Tex. Rep. Biol. Med.* 23: (Supl. I), 295-303, 1965.
21. Kraybill, W.H., Crawford, Y.E.: Selective medium and color test for *Mycoplasma pneumoniae*. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 128: 365-369, 1964.
22. 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.*, 64: 91-104, 1946.
23. Mizutani, H.: The antigens participating in the macrophage migration inhibition to *Mycoplasma pneumoniae*, *American Review of Respiratory Disease* 111: 566-569, 1975.
24. Peterson, O.L., Ham, T.H. and Finland, M.: Cold agglutinins (autoagglutinins) in primary atypical pneumonia. *Science*, 97: 167-168, 1943.
25. Lennett, E.H., Melnick, J.L., Chanock, R.M.: *Clinical Virology: Intraduction to Methods: Manual of clinical microbiology*, Editors. Blair, J.E., Lennette, E.H., Truant, J.P., American Society for Microbiology, Bethesda, Md. 1970, 493-497.
26. Mizutani, H., Mizutani, H., Kitayama, T., Hayakawa, A.: Delayed hypersensitivity in *Mycoplasma pneumoniae* infections, *Lancet*, 23: 186-187, 1971
27. Arai, S., Hinuma, Y., Matsumoto, K. And Nakamura, T.: Delayed type hypersensitivity in hamster infected with *Mycoplasma pneumoniae* as revealed by Macrophage migration inhibition test, *Jap. Mikrobiol.* 15: 509-514, 1971.
28. Biberfeld, G.: Macrophage migration inhibition in response to experimental *Mycoplasma pneumoniae* in the hamster, *J. Immunol.* 110: 1146-1152, 1973.
29. Edward, D.G. Fitzgerald, W.A.: The isolations of organisms of the pleuropneumonia group from dogs, *J. Gen. Microbiol.* 5: 566-568, 1951.