FİŞEK MÜELLER MİLLER VASATI MODİFİKASYONLARININ TETANOZ TOKSİNİ ÜRETİMİNE ETKİLERİ

Dr. Salih Toppare* **Vet. Hekim Bakt. Orhan Erbaşoğlu****

Geniş ölçüde prodüksiyon yapan laboratuvarlar da dahil olmak üzere bugün tetanoz toksini üretiminde karşılaşılan başlıca güçlük, aynı suş aynı metod ve aynı titizlikle hazırlanmış besiyerleri kullanılmasına rağmen aynı kıymette toksinin elde edilememesi teşkil etmektedir.

Hatırlanacağı gibi tetanoz toksini üretiminde kullanılan Fişek Müeller Miller metodu aslında tüp'de geliştirilmiş bir araştırma metodudur. Bir istihsal metodu değildir. Filhakika 20 ml. Fişek vasatı ihtiva eden tecrübe tüplerinde **Clost. tetani var Harvard** suşu ile 60 - 90 Lf/ml. değerinde toksin elde etmek herzaman mümkünken aynı besiyeri aynı suş ile yapılan 2 - 4 litrelik kültür kaplarında, toksinin antijenik aktivitesi 15 - 60 Lf/ml. ye düşmektedir (4). Eğer hacım dahada artırılırsa, örneğin 4 litreden 8 litreye çıkarılırsa, tetanoz basilinin üreme şekli ve toksinin bağışıklık verici özelliğinininde olumsuz bir yöne doğru değişmekte olduğu fikri yaygındır. Ayrıca vasatın terkibinde bulunan karbonhidrat ve aminoasitlerin, ısı ile yapılan sterilizasyonunda arzu edilmiyen ve toksin oluşumuna etki yapan değişikliklere uğraması, üretim merkezlerinin diğer bir sorunu olmaktadır. Hacım ve maillard reaksyonları ile ilgili bu çalışmamızda, sterilizazyonun ısı ve filtrasyon tarzında uygulanışlarında sonuca negibi etki yaptığını izledik. Filtrasyonla yapılan sterilizasyonun üretimi dar hacim çerçevelerinden çıkarabileceği konusunda kanımız kuvvet bulunmaktadır.

Giriş

Yapılan tahminlere göre 1951 - 1960 yılları arasında dünyada her yıl 160.000'den fazla insanın tetanozdan öldüğü sanılmaktadır (2). Gerek tetanozlu hastaların bakım ve tedavisindeki güçlükler gerekse tedavi metodlarındaki başarı şansının azlığı hekimi daima preventive tedbirler almaya ve bu yolda düşünmeğe sevketmektedir (3). Bu nedenledirki, tetanoz aşısı üretimi ve tatbikat sahası hergün biraz daha gelişmekte ve bir kıymet kazanmaktadır.

---

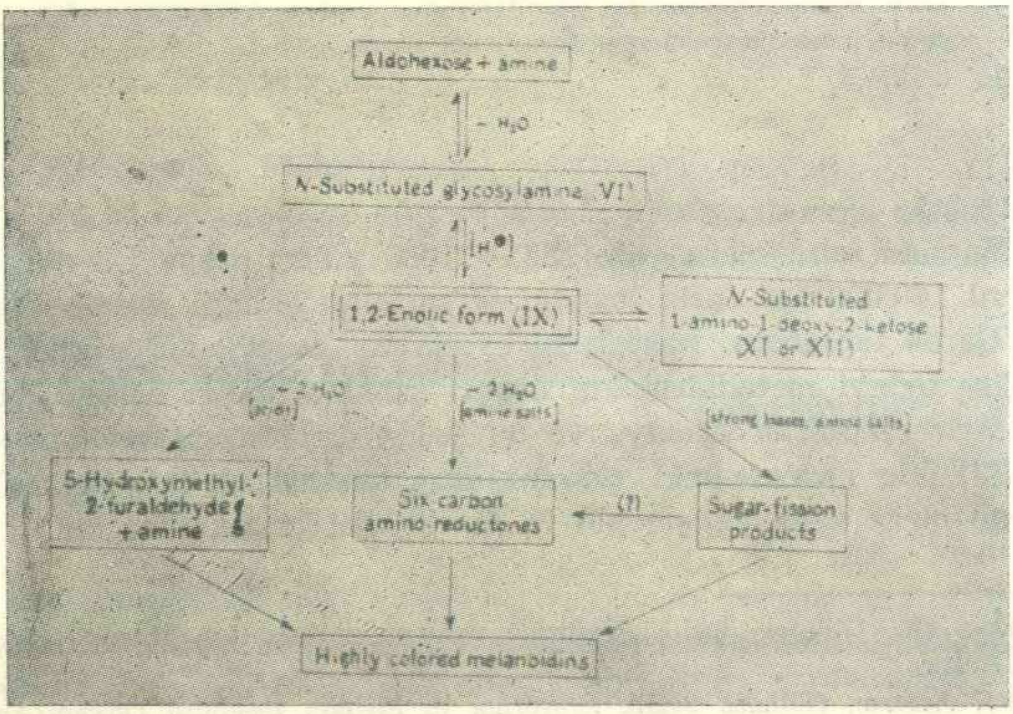
* Doç. Dr., Gülhane Sağlık Araştırma ve Biyoloji Enstitüsü Müdürü., Dışkapı /Ankara

** Baş Asistan., Gülhane Sağlık Araştırma ve Biyoloji Enstitüsü Dışkapı/Ankara

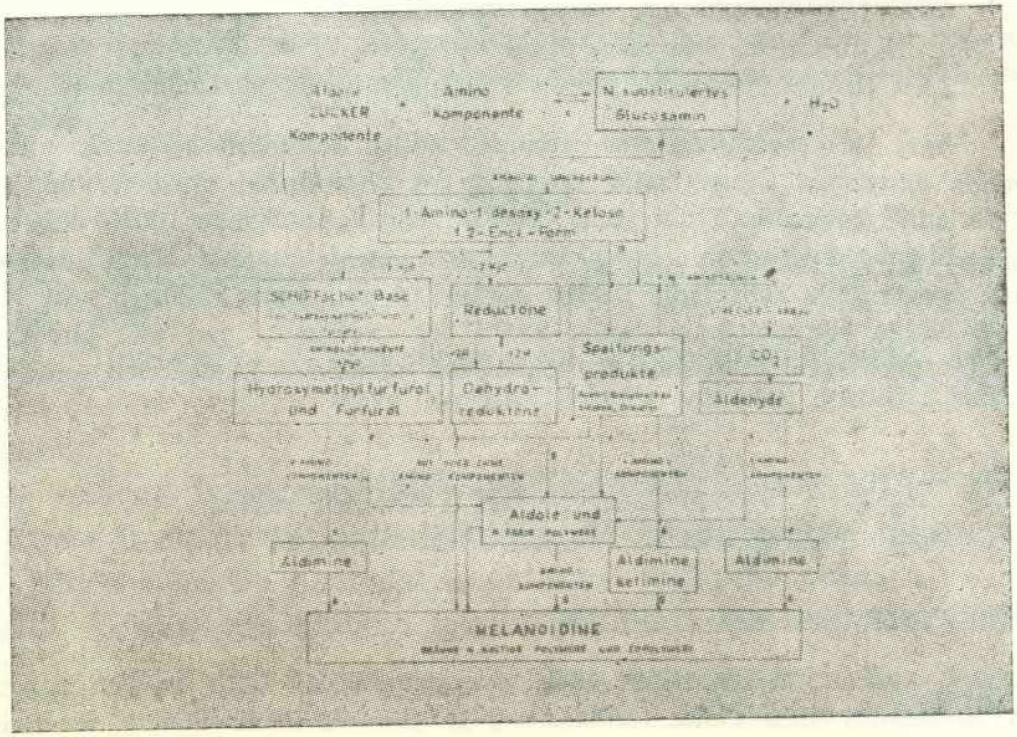
Aminoasitlerle indirgen şekerler arasındaki renk teşekkülü reaksiyonları **Maillard reaksiyonu** olarak bilinir. Akoğlu,nun bildirdiğine göre (1). Bu konu Maillard'dan başlıyarak günümüze kadar bir çok araştırıcı tarafından araştırılmış ve elde edilen bilgiler biraraya getirilmiştir. Sonuç olarak ısının etkisiyle, amino asitler ile indirgen şekerler arasındaki meydana gelen reaksiyonların basit bir reaksiyon dizisi olmadığı, sayısı ve karekteri değişik ürünlerin oluştuğu gösterilmiştir. Örneğin sadece glukoz ile glisin arasındaki reaksiyon sonucu en az 24 bileşik teşhis edilmiş ve en az okadarda teşhis edilemiyen maddeler izlenmiştir. Maillard reaksiyonunun ilk kademeleri dışında oluşan ürünlerin çok az bir kısmı karekterize edilebilmiştir. İlk kademe reaksiyonlarının en önemlisi aminoasit ile Aldozun, D - Glukoz, D - Mannoz, D - Xylose vs. nin I/I oranında kondensasyonu ve amadori dönüşmesi ile, N - substituted aldosylaminden N - substituted I - amino I - deoksi 2 ketoza'ya izomerizazyonudur.

Akoğlu'nun bildirdiğine göre Ellis Şema I'de aldohekzoz ile aminoasitler arasındaki kondensasyon ve amodori dönüşmesini 1,2 enol form'dan oluşan bozunma ve renk teşekkülü reaksiyonlarının esas kademelerini basit bir şekilde göstermiştir. Şema 1 de görülen 1,2 enol form, gerek aminoasit deoksiketozların gerekse diğer bozunma ürünlerinin bir başlangıcı olarak kabul edilmektedir. Akoğlunun bildirdiğine göre Hedge aynı reaksiyon dizisini biraz daha geniş olarak ifade etmiştir. Şema 2 de daha geniş olarak ifade edilen melonoidlerin oluşması 3 reaksiyon kademesi üzerinden gelişmektedir.

ŞEMA : 1



ŞEMA : 2



Materyel ve Metod

Tetanoz suşu : Kullanılan suş Clost. tetani var Harward'dır. Bu suş halen Gülhane Sağlık Araştırma ve biyoloji enstitüsünde kullanılmaktadır.

Besiyeri : Fişek Müeller Miller metodu ile hazırlanmaktadır.

a) STERİLİZAZYONLA İLGİLİ DENEYİN YAPILIŞI :

Fişek Müller Miller metodundan yararlanılarak 15 litrelik vasat hazırlandı. Bu besiyeri dörder litrelik 4 adet erlenmayere üçerbuçuk litre olmak üzere dağıtıldı. Herbiri ayrı ayrı 100°C, 110°C, 115°C, 120°C'de yirmişer dakika sterilize edildi. Sterilizasyondan sonra erlenmayerler temparatür sırasına göre dizildiğinde vasatların perde perde koyulaştığı görülmüştür. Kimyada Maillard reaksiyonu olarak bilinen bu renk dönüşümünün dereceleri, Ankara Şeker Fabrikası Araştırma Enstitüsü Kimyagerlerinden, Yüksek Kimya mühendis Sabriye Akoğlu tarafından yapılmış ve bulunan değerler aşağıda gösterilmiştir.

C	Fahr.	Atmosfer	Ext.	Bx	Renk/100 Bx
80	176	0	0.141	5.0	27.65
100	212	0	0.138	5.4	25.03
110	230	0,5	0.232	5.6	40.53
115	339	1	0.302	5.6	52.77
120	348	2	0.432	5.7	74.15

Lange kolorimetresiyle yapılan bu çalışmada renk ext/100 Bx = $\frac{10^4 \text{ Ext}}{\text{Bx. d. } 3{,}4}$

formülünden yararlanılarak ortaya konmuştur. Burada,

* Ext : Sıkalada okunan değeri,
** Bx : Numunedeki kuru madde miktarının,
d : Birikse tekabül eden özgül ağırlığı,
3,4 : Santimetre olarak kuvvet kalınlığını ifade etmektedir.

Ayrı ayrı temparaturlerde sterilize edilen vasatların herbirine, glukozlu buyyonda hazırlanan Clost. tetani var Harward kültüründen otuzbeşer ml. kondu. 34°C lik etüve kaldırıldı. Ertesi günü vasatlar kontrol edildiğinde 100°C' deki vasatın çok karardığını, diğerlerinde ise bu kararmanın gitgide azaldığı 120°C de sterilize edilmiş vasatın koyu kahverengi kaldığı görüldü. 6 gün sonra kültürler sıcak odadan alınarak birgün buz dolabına kondu. Sonra her erlenmayer ayrı ayrı olmak üzere Seitz filtresinden süzüldü. Ramonun Flokulasyon metodu ile Lf değerleri tesbit edildi.

100°C ..... 20 Lf.
110°C ..... 15 Lf.
115°C ..... 15 Lf.
120°C ..... 10 Tf.

b) FİLTRASYONLA İLGİLİ DENEYİN YAPILIŞI :

Fişek, Müeller, Miller metodundan yararlanılarak 48 Lt.lik besiyeri hazırlandı. Sonra bu besiyeri daha evelce içerisine 8.5 gr. reduced demir konarak birlikte sterilize edilmiş olan cam damacanaların içerisine onaltışar litre olmak üzere Seitz filtresinden süzüldü. 34°C lik etüve kaldırıldı. 3 gün sterilite kontrolunda bekletildi. Besiyerlerinin steril olduğuna kanaat getirdikten sonra, glukozlu buyyonda yapılan ana kültürden takriben 125 ml. si pipet kullanmadan alev altında damacananın kapağı açılarak içine boşaltıldı. Sonra etüve kaldırıldı birinci günü üreme ümitsizdi. Fakat ikinci günü vasat kaıardı. El lambasını yakıp damacananın arkasından tutulduğunda ışığın vasat içerisinden geçici görülmedi. Üçüncü günü satıhta köpükler toplanmaya başladı. Dördüncü günü üremenin en iştahlı olduğu zamandı. Satıhta biriken köpüklerin görünümü aynen bal peteği görünümündeydi. Altıgen prizma şeklinde. Beşinci, altıncı, yedinci, sekizinci günlerde köpükler tedricen inmeğe başladı. Onuncu günü damacalanalar etüvden çıkarıldı. Otolizasyon için kasap tipi buz dolabına kondu. Koyu siyah parlak olan vasatta otolizasyon belirtisi olarak kabul edeceğimiz en küçük bir renk açılması yoktu. Damacanalar simsiyah bir ayna görünümünde idiler. Otolizasyonu fark edebilmek için damacanaları bir an için güneşe koyup arkadan baktığımızda renk açılmasını fark edemedik. Boyama yaptık otolize olmamış tetanoz basili bulamadık. Kültür, Seitz filtresinden süzüldüğünde açık sarı renkte toksin elde edildi. 15 - 20 gramlık fareler üzerinde yaptığımız titrasyonda lethal aktiviteyi 320.000.000 olarak tesbit ettik. Titrasyonda kullanılan farelerin gösterdikleri tetanoz semptomları yahut ölümleri dilusyonlar arasındaki mesafeyi ve sırayı gayet muntazam bir şekilde takip etmiştir. Fareler tipik tetanoz semptomu gösterdikten sonra ölmüşlerdir. Toksinin antijenik aktivitesini Ramonun flokulasyon metodu ile tesbit ettik. 600 ünitelik test serumlarını Refik Saydam Merkez Hıfzıssıha okulundan aldık. 20 lf flokülasyon gösteren tüp 25 dakikanın içerisinde teşekkül etti. Toksinin içerisine % 0.2 oranında formol konduktan sonra 28 gün bekletildi. Sonra 5 kobay üzerinde detoksifikasyon kontrolu yapıldı. 21 gün içerisinde kobaylarda her-

---

* Ekstinksiyon
** Briks

hangi bir tetanoz arazı görülmediği gibi zayıflamada müşahade edilmedi. 21 günlük zararsızlık kontrolunu atlatan kobaylara, aynı gün 100 MLD değerinde toksin enjekte edildi. O gece ve sonraki günler hayvanlarda en küçük bir neşe kaybı ve zayıflama müşahade edilmedi. Tutukluk olmadı. Ayrıca formol konulan toksinlerde bir tortu husule gelmedi.

TARTIŞMA

Yeni uyguladığımız filtrasyon tekniğinin bize sağladığı çeşitli faydalar vardır.

1 — Otoklavda yüksek basınç ve temparatur altında oluşan maillard reaksiyonlarını ortadan kaldırarak vasatın yapısal dengesi korundu.

2 — Clost. tetani var Harward 16 litrelik Fişek, Müller Miller besiyerinde üretildi ve kültürlerinden 20 Lf değerinde toksin elde edildi. Böylece büyük hacimlerde ekilmesi mümkün oldu.

3 — Kobaylarda 21 gün içerisinde immünite meydana getirildi.

4 — Formol konulan toksinlerde tortu meydana gelmedi.

5 — Flokulasyon 25 dakikanın içerisinde teşekkül etti.

6 — Aşının rengi koyu kahverengi değil, açık sarı renklidir.

7 — % 0.2 formolle 28 günde detoksifiye olmaktadır.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımızda yakın ilgilerini gördüğümüz Prof. Dr. Nusret. H. Fişek'e, Doç. Dr. Kaya Kılıçturgaya, Yüksek Kimya mühendis Nazım Toygan'a ve Yüksek Kimya Mühendis Sabriye Akoğluna teşekkür ederiz.

Summary

THE EFFECTS OF MODIFICATION OF FIŞEK MULLER MILLER MEDIUM ON TETANUS TOXIN PRODUCTION

Dr. Salih Toppare* **Vet. Hek. Bakt. Orhan Erbaşoğlu****

We have been using Fişek, Müeller Miller medium and Clost. tetani var harward strain for tetanus toxin production at Sanitary Research and Biology İnstitute.

* Ass. Prof. at Gülhane Sanitary Research and Biology İnstitute.; Dışkapı/Ankara Turkey

** Chief ass. at. Gülhane Sanitary Research and Biology İnstitute; Dışkapı/Ankara Turkey

Our production is about 1000 litres per year. This Amount is not enoguh for us. Until now We have distıibuted the medium in 5 litres KIMOX U. S. A. erlenmayer bottles. Each erlenmayer bottle contains four litres of medium. They are sterlized in flowing steam at 110°C for 20 minutes. The medium is cooled promptly after sterilization and inoculated with 40 ml. of the 24 hours cultures of Clost. tetani var Harward. Cultures are incubated at 34 - 35°C for 6 - 7 days, But, now we have been sterilizing the same medium by passing it through the Seitz filtre instead of autoclave. We have gained the following advantages from this filtration technic.

1 — We prevent the medium from the maillard reaction.

2 — Clost. tetani var Harward strain have been grown in 16 liters Fişek Müller Miller medium.

3 — The colour of tetanus toxin is light yellow and 20 Lf/ml.

4 — İt is Possible to immunize the guinea - pigs in 21 days.

KAYNAKLAR

1 — Akoğlu, S. : Melasta aminoasitler ve indirgen şekerler arasındaki maillard reaksiyonunun ilk kademe ürünleri olan aminoasit deoksifructozlar üzerinde çalışma. 1971

2 — Ildırım İ : Tetanos serumu ve prednisolan karışımı ile intratekal tetanoz tedavisi 1 - 103. 1970

3 — Tezok, Ö. F., Kılıçturgay. K : Tetanoza karşı aktif immunizazyon ve orduda aşı tatbikatından alınan sonuçlar. Deniz Tıp Bülteni. 11.3.1965

4 — Tulga. T : Müeller vasatı ile geniş ölçüde yüksek üniteli tetanoz toksini, tetanoz serumu ve aşısı produksiyonu. Türk Hijyen ve Tecrubi Biyoloji Dergisi. **20:** 11, 229 - 237. 1960