

DEĞİŞİK BORDETELLA PERTUSSIS SUŞLARININ BAĞIŞIKLAMA GÜCÜ VE PATOJENİTELERİ

THE POTENCY AND PATHOGENICITY OF VARIOUS BORDETELLA PERTUSSIS STRAINS

Gülner TARHAN*, Erkan ÖZCENGİZ*

Özet: B.pertussis'in değişik suşları olan Saadet, Tohama, 165, Nursel, 60623, Gün ve 19190'nın aglütinojenik özellikleri incelenmiş, her suşun üreme, lenfositosis promoting faktör (LPF) ve filamentöz hemaglütinin (FHA) sentezleri ile bunlardan hazırlanan aşılarla bağışıklanan kobaylarda aglütinin ve anti-FHA yanıtları araştırılmıştır.

En yüksek aglütinin ve anti-FHA düzeyleri, eski ve yerli bir izolat olan Saadet suşu ile bağışıklanan kobay serumlarında görülmüştür. Bu suşun aynı zamanda en etkili üreme ve toksin oluşturma yeteneğinde olduğu da belirlenmiştir. Saadet suşundan sonra ise Tohama suşunun diğer suşlara göre daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Bordetella pertussis*, *Boğmaca aşıları*.

Summary: Various strains (Saadet, Tohama, 165, Nursel, 60623, Gün and 19190) of B.pertussis were analyzed for their agglutinogenic properties. The ability of each strain to grow and synthesize lymphocytosis promoting factor (LPF) and filamentous hemagglutinin (FHA) was next investigated in parallel to the levels of agglutinin and anti-FHA responses in guinea-pigs that have been immunized with the corresponding preparations.

The levels of agglutinin and anti-FHA were highest in the sera of guinea-pigs that have been treated with our local and traditional strain, namely Saadet. This strain also displayed the most efficient growth and toxin formation. Tohama strain was also fairly good as compared to the other strains examined.

Key words: *Bordetella pertussis*, *Pertussis vaccines*.

G İ R İ Ş

Boğmaca, dünyanın hemen her yerinde görülen ve B.pertussis'in etkeni olduğu bulaşıcı bir hastalıktır. Bu hastalık özellikle yeni doğan bebeklerde ve küçük çocuklarda etkili olup, 0-12 aylık bebeklerde öldürücü olabilmektedir (1). Boğmacaya karşı korunmada en etkili yol ise toplumun uygun aşılarla bağışıklanmasıdır.

* Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Boğmaca Aşısı Üretim ve Araştırma Bölümü, Ankara.

Boğmaca için ilk aşı fikri, mikroorganizmanın 1906 yılında izole edilmesinden hemen sonra ortaya atılmış ve ölü *B.pertussis* hücrelerinden elde edilen standart aşilar 1950'lerin başından itibaren yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Aşı uygulaması ile hastalık önemli derecede gerilemiş ve aynı zamanda hastalığın ağır seyri ve ölüm oranı düşmüştür.

Bununla beraber, aşı uygulamasının önemi kadar aşıda kullanılan suşların özellikleri de aşının bağışıklama gücü bakımından önem taşımaktadır. Özellikle aşı suşlarının aglütinojen 1, 2, 3 yanında bazı diğer komponentlere de sahip olması ve *in vivo* olarak asgari düzeyde antikor yanıtı çıkarabilmesi gerekmektedir. Aşı suşunun özellikle patojenezden sorumlu bazı komponentleri sentez yeteneğinde olması ve bu komponentlerin de aşıda bulunması önemlidir.

Bu nedenle, bu çalışmada değişik *B.pertussis* suşlarının aglütinojen 1, 2, 3 içerikleri, patogenezi başlıca rol oynayan lenfositosis-promoting faktör (LPF) ile filamentöz hemaglütinin (FHA) sentez yetenekleri ve bu komponentlere karşı *in vivo* antikor yanıtı çıkarılabilir özellikleri araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

B.pertussis Suşları : Tohama, Saadet, Gün, Nursel, 19190, 60623 ve 165 numaralı suşlar Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Boğmaca Aşısı Üretim ve Araştırma Bölümünden sağlanmıştır.

Tip-Özgül Aglütinin Serumları : *B.pertussis* monopesifik tip serumları (aglütinin 1, aglütinin 2, aglütinin 3), Dr. N.W. Preston Department of Bacteriology and Virology Manchester University Medical School İngiltere'den sağlanmıştır.

Filamentöz Hemaglütinin : Saf FHA, kaynak (2)'de tarif ettiğimiz şekilde elde edilmiştir.

Deney Hayvanları : Bağışıklama çalışmalarında 200-250 gr. ağırlığındaki kobaylar, toksisite testlerinde ise 14-16 gr. ağırlığında Swiss albino fareler kullanılmıştır.

Besiyerleri : Kültürlerde, Modifiye Cohen-Wheeler Besiyeri (3) ve Modifiye Morse-Bray (4) Besiyerleri kullanılmıştır.

Aglütinojen Tayini : *B.pertussis* suşlarının, Modifiye Cohen-Wheeler katı besiyerinde üç günlük kültürleri yapılmış ve suşların her üç tip aglütinin (1, 2 ve 3) serumu ile lam aglütinasyon reaksiyonu gözlenmiştir.

Tam Hücre Boğmaca Aşısı : Kaynak (5)'de tarif edildiği şekilde her suş ile ayrı ayrı hazırlanmıştır. Isı ile inaktive ve 1.5×10^{10} Jerm/ml. *B.pertussis* hücreleri içeren aşılardan daha sonra fare toksisite testleri yapılmıştır (5).

Aktif Bağışıklama : Her aşidan, üçer kobaya derialtı yoluyla 1'er ml enjekte edilmiş ve dört hafta sonra kobayların kalbinden kan alınmıştır. Kanların serumları ayrılarak -20°C 'de saklanmıştır.

Mikroaglütinasyon Testi : *B.pertussis* suşlarının Modifiye Cohen-Wheeler katı besiyerindeki 48 saatlik kültürü normal tuzlu suda süspanse edilip, bakteri miktarı 1.0×10^{10} Jerm/ml olacak

şekilde sulandırılmıştır. Üzerine son konsantrasyonu % 0.2 olacak şekilde formaldehit eklenerek, inaktive edilen kültür süspansiyonu mikroaglutinasyon testinde antijen olarak kullanılmıştır (6, 7).

Serumlar 56 °C'de 30 dakika inaktive edilip, her serum U tipi mikropleytte son hacmi 0.05 ml olacak şekilde PBS (pH: 7.4) ile seri olarak sulandırılmıştır. Daha sonra her çukura 0.05'er ml antijen süspansiyonu konmuş ve pleyt parafilm ile kapatılarak 37 °C'de 2 saat, sonra +4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Aglutinasyon titre değeri olarak kaydedilmiştir.

İndirekt Hemaglutinasyon (IHA) Nötralizasyon Testi : 56 °C'de 30 dakika inaktive edilen serumlar U tipi mikropleytte PBS (pH: 7.4) ile son hacmi 0.025 ml olacak şekilde seri olarak sulandırılmıştır. Daha sonra her çukura 0.025 ml FHA eklenmiş ve pleyt dairesel hareketlerle yavaş şekilde karıştırılmıştır. Pleytin üzeri parafilm ile kapatılarak 37 °C'de 1 saat bekletilip, sonra her çukura 0.05 ml PBS (pH: 7.4) ile yıkanmış % 0.5'lik horoz eritrositi eklenmiştir. Oda ısısında 1 saat bekletilerek, FHA'nın hemaglutinasyon aktivitesinin nötralize olup olmadığı belirlenip, titre değeri olarak kaydedilmiştir.

Üreme ve Protein Tayini : Suşların Modifiye Morse-Bray sıvı besiyeri kültürlerinden her gün alınan örneklerde 630 nmA okuma değeri üreme miktarı, santrifüjasyon sonrası ayrılan süpernatantın 280 nmA okuma değeri ise protein düzeyi olarak kaydedilmiştir.

Sıvı Kültür Süpernatantında Hemaglutinasyon (HA) Tayini : Modifiye Morse-Bray sıvı besiyeri kültürlerinden hergün alınan örneklerde santrifüjasyondan sonra süpernatant alınmış ve U tipi mikropleytte son hacmi 0.05 ml olacak şekilde PBS (pH: 7.4) ile seri sulandırılmaları yapılmıştır. Daha sonra her çukura 0.05 ml PBS ile üç kere yıkanmış taze horoz eritrositlerinin % 0.5'lik süspansiyonundan eklenmiştir. Oda ısısında 1 saat bekletilerek hemaglutinasyon aktivitesi titre olarak kaydedilmiştir.

B U L G U L A R

B.pertussis suşlarının monospesifik tip serumları ile yapılan lam aglutinasyonu sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1

B.pertussis Suşlarının Monospesifik Tip Serumları ile Lam Aglutinasyon Sonuçları

Suşlar	Antiserumlar		
	Aglütinin 1	Aglütinin 2	Aglütinin 3
Saadet	+	+	+
Tohama	+	+	-
Gün	+	+	-
Nursel	+	+	+
165	+	+	+
19190	+	+	-
60623	+	+	+

Tablo 1'de görüldüğü gibi Saadet, Nursel, 165 ve 60623 suşları her üç antiserum ile pozitif reaksiyon vermiştir. Diğer suşlar ise aglütininin 1 ve 2 antiserumları ile pozitif reaksiyon verip, aglütininin 3'le hiçbir reaksiyon vermemiştir.

Antiserumların her üçü ile de pozitif sonuç veren suşlarda aglütinojen 1, 2 ve 3 bulunduğu için faz I, diğerleri ise faz II suşları olarak kabul edilmiştir.

Her suşa ait aşı ile bağışıklanan kobayların serumlarında belirlenen aglütininin titreleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2
Değişik B.pertussis Suşları ile Bağışıklanan Kobaylarda Serum
Aglütininin Titre Değerleri

Antijenler	Antiserumlar (Suşa Özgü)							
	Saadet	Tohama	Gün	Nursel	165	19190	60623	Kontrol
Saadet	1/256	1/64	1/8	1/16	1/128	1/2	1/256	-
Tohama	1/512	1/256	1/2	1/512	1/4	-	-	-
Gün	1/8	1/2	-	-	-	-	-	-
Nursel	1/128	1/64	-	1/8	-	-	-	-
165	1/128	1/64	-	-	-	-	-	-
19190	-	-	-	-	-	-	-	-
60623	1/256	1/64	-	-	-	-	-	-

Tablo 2'de görüldüğü gibi en yüksek antikor düzeyi Saadet suşu ile bağışıklanan kobayların serumlarında görülmüş ve sırası ile Tohama, 165, Nursel ve 60623 suşları ile bağışık kobay serumlarında da önemli derecede antikor yanıtı olduğu belirlenmiştir. Gün ve 19190 suşlarında ise sırası ile çok zayıf veya hiçbir antikor yanıtı saptanamamıştır.

Aynı serumlarda IHA-nötralizasyon testi ile yapılan deneylerde ise anti-FHA düzeyi Tablo 3'de görüldüğü gibi genel olarak aglütinasyon sonuçları ile uyumlu olarak belirlenmiştir.

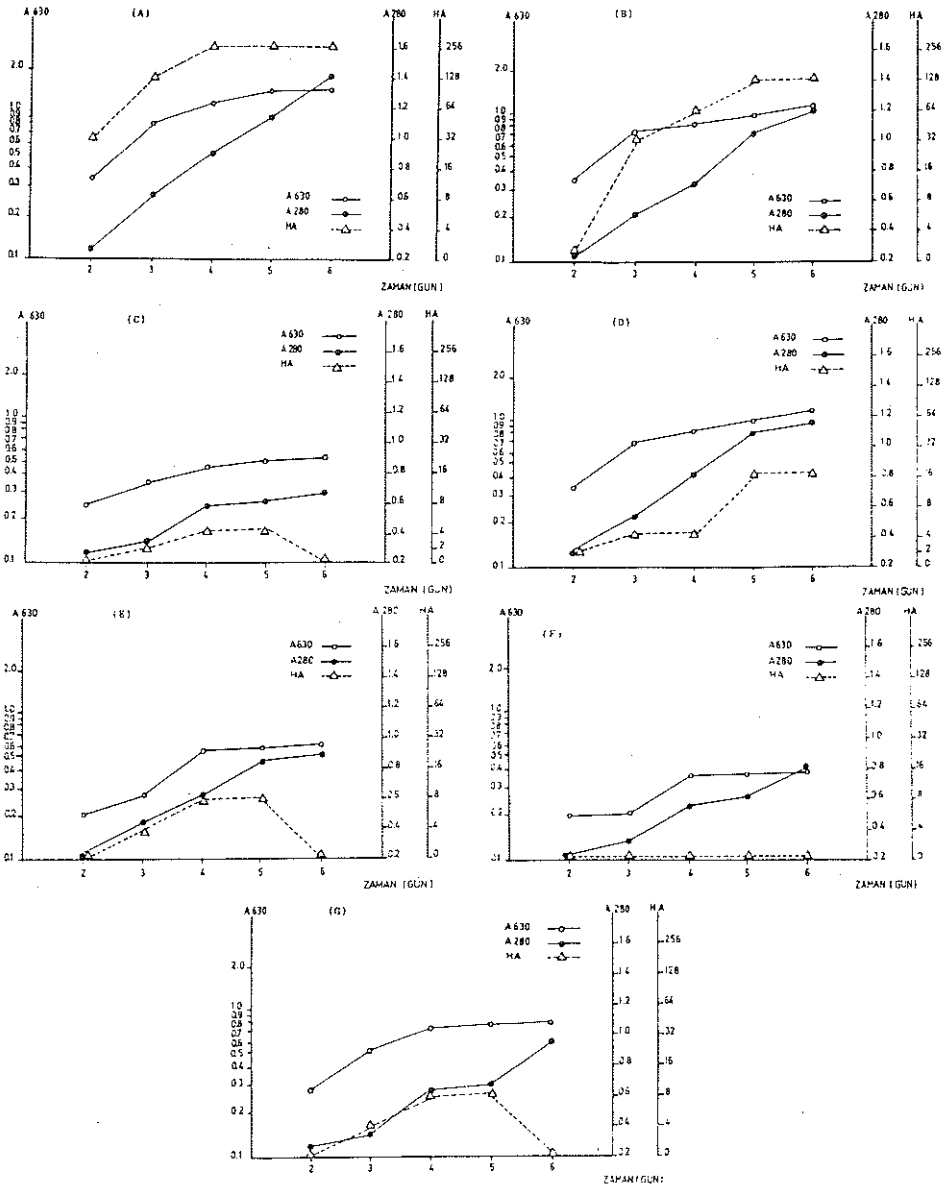
Tablo 3
Değişik B.pertussis Suşları ile Bağışıklanan Kobay Serumlarında
IHA-Nötralizasyon Yöntemiyle Belirlenen Anti-FHA Düzeyleri

Titre	Antiserumlar							
	Saadet	Tohama	Gün	Nursel	165	19190	60623	Kontrol
Titre	1/128	1/128	1/64	1/128	1/64	-	1/4	-

En yüksek anti-FHA düzeyinin Saadet suşu ile bağışıklanan kobaylarda meydana geldiği, 19190 numaralı suş ile bağışıklanan kobaylarda ise hiçbir anti-FHA yanıtı oluşmadığı görülmüştür.

B.pertussis suşlarının Modifiye Morse-Bray sıvı besiyerindeki üreme, süpernatant protein içeriği ve LPF-FHA sentez düzeyleri ise Şekil 1'de görüldüğü gibi belirlenmiştir.

BORDETELLA PERTUSSİS SUŞLARI



Şekil 1

B.pertussis suşları; Saadet (A), Tohama (B), Gün (C), Nursel (D), 165 (E), 19190 (F) ve 60623 (G)'ün Modifiye Morse-Bray besiyerinde üreme, süpernatant protein miktarı ve HA aktiviteleri.

Bu deneylerde, Saadet suşunun yüksek üreme aktivasyonu yanında, süpernatant protein miktarı ve LPF-FHA sentezi göstergesi olan HA aktivitesini yüksek oranda gösterdiği

saptanmıştır. Tohama suşunun ise bu aktiviteler yönünden diğerlerine göre Saadet suşundan sonra en iyi düzeyde olduğu gözlenmiş, diğer suşlar ise oldukça zayıf bulunmuştur.

T A R T İ Ş M A

Çok sayıda suşu olan B.pertussis suşlarının yapısal ve bağışıklık oluşturma düzeyleri birbirinden farklıdır (8, 9). B.pertussis için özgül 6 aglütinojen, her suшта farklı kombinasyonlarda ve farklı miktarlarda bulunup, farklı antijenik özellikler gösterirler (10). Bu nedenle bağışıklamada kullanılacak aşı suşları için bazı genel özellikler belirlenmiştir. Örneğin aşı suşlarının aglütinojen 1 yanında, 2 ve 3'ü de bulundurması genel olarak birinci derecede önem taşıyan bir özellik olarak kabul edilmiştir. Çeşitli çalışmalarda her üç aglütinojeni içermeyen suşlarla yapılan aşılamaalarda kuvvetli bir bağışıklık oluşmadığı ileri sürülmüştür (11, 12). Ancak bu aglütinojenlerin suшта bulunması yanında bunların organizmada yeterli bağışık yanıt çıkararak kendisini immünolojik olarak ifade edebilmesi son derece önemlidir. Bu nedenle yapılan çeşitli çalışmalarda, her aşımın çocuklarda ve farelerde oluşturduğu aglütinin titreleri ile hastalıktan korunma veya farelerdeki korunma gücü arasında iyi bir korelasyon olduğu gözlenmiştir (1, 8, 9, 13, 14). Ayrıca tam hücre boğmaca aşılarında bağışıklık gücünü artırması yönünden bakteriye ait diğer komponentlerin de bulunması gerekmektedir.

Bu çalışmada yedi değişik suşun oluşturduğu aglütinin yanıtı düzeyi yanında, bu suşların toksin sentezleme ve anti-FHA yanıtı oluşturabilme yeteneği ve düzeyi araştırılmıştır. Her üç özellik bakımından da Saadet suşunun diğerlerine göre oldukça üstün bir suş olduğu saptanmıştır. Her üç aglütinojeni de içeren ve eski bir yerli izolat olarak uzun senelerdir aşı üretiminde kullanılan Saadet suşu (15) ile tek doz aşılama kobaylarda yüksek titrede aglütinin ve anti-FHA antikorunu oluşturduğu belirlenmiştir (Tablo 2, 3). Bunun yanında Tohama suşu aglütinojen 3'ü içermemesine karşın aglütinin yanıtı ve anti-FHA yanıtı yönünden kuvvetli bir suş özelliği göstermiştir. Benzer şekilde, Tohama suşunun aglütinin yanıtı çıkarma yönünden 130, 138 ve 460 suşlarına göre de daha iyi olduğu Blumberg ve ark. (9) tarafından gösterilmiştir. Çalışmamızda, Gün ve 19190 suşları ile bağışık kobay serumlarında ise aglütinin varlığı yönünden önemli bir değer gözlenmemiştir.

Mikroaglütinasyon çalışmalarında, aşıların kendi suşu yanında diğer suşlar da antijen olarak kullanılmış ve Saadet suşu ile bağışıklanan kobay serumlarında diğer antijenlerle de yüksek titrede aglütinasyon olduğu gözlenmiştir. Bununla beraber bu sonuçlar genel olarak gözönüne alındığı zaman, testte kullanılan antijenin önemli olduğu ve bazı serumlarda kendi antijeni ile herhangi bir aglütinasyon oluşmamasına karşın diğer suşlarla; örneğin, Saadet suşunun test antijeni olarak kullanılması halinde aglütinin varlığının belirlenebildiği gözlenmiştir. Bu durum, suşun in vivo ifade yeteneği gibi in vitro ifade yeteneğinin de mikroaglütinasyon testi açısından son derece önemli olduğunu göstermektedir. Konu ile ilgili olarak Manclark ve ark.'da (14) aglütinasyon testinde kullanılan diagnostik antijenin önemine değinmişlerse de uluslararası standart bir suş belirlenememiş ve aşı çalışmalarında kullanılan aşı suşunun pratik olarak bu test için

önerilebileceği ileri sürülmüştür. Ancak bizim çalışmamızda, Tablo 2'de görüldüğü gibi Saadet ve Tohama suşlarının, özellikle Saadet suşunun, tüm aşılarda aglütininin titrelerini belirleme çalışmalarında standart suş olarak kullanılabilmesi ileri sürmek olası gözükmemektedir. Tohama suşu için benzer bulgular Blumberg ve ark. (9) tarafından da ileri sürülmüş ve Tohama'nın spesifik bir determinanta karşı oluşan antikorunu tanımlayan bir özelliğinden söz edilmiştir.

Diğer yandan, B.pertussis'in patogeneze sorumlu komponentlerinin de aşıda bulunması, tam hücre aşılarda bağışıklama yeteneği bakımından büyük önem taşımaktadır. Özellikle hücre dışı boğmaca aşılarda da başlıca komponentleri olan LPF ve FHA molekülleri tam hücre boğmaca aşılarda değişik miktarlarda da olsa bulunmaktadır (16). LPF ve FHA genellikle patojen suşlarda birarada bulunmakta olup, ikisi de hemagglütinasyon (HA) aktivitesine sahiptir. Bu nedenle çalışmamızda sıvı kültür süpernatantlarında suşların HA aktivitesi test edilerek bu moleküllerin sentez miktarları araştırılmıştır. Şekil 1'de görüldüğü gibi Saadet suşunun HA aktivitesi yönünden de diğer suşlara göre yüksek değerler gösterdiği belirlenmiş, Tohama suşunun da önemli derecede toksin sentezlediği gözlenmiştir. Diğer suşların ise bu yönden çok zayıf oldukları görülmüştür.

Bununla beraber, Nursel, Gün ve 165 suşlarının sentez yönünden düşük HA aktivitesi göstermesine karşın, bu suşlarla bağışıklanan kobay serumlarında ise Nursel'de yüksek, Gün ve 165'de orta derecede anti-FHA antikorları belirlenmiştir. Bu sonuçlarla, FHA molekülünün filamentöz yapısı nedeniyle iyi bir antijen olduğunu, aşıda çok az miktarlarda bulunsun da kayda değer düzeyde antikor oluşturduğunu söylemek mümkündür. Benzer şekilde, Edwards ve ark.'nın (8) farklı tam hücre boğmaca aşılı ile yenidoğan ve çocuklarda yaptıkları bağışıklama çalışmalarında da FHA antikorları oluşturma yönünden aşılarda belirgin bir farklılık gözlenmediği bildirilmiştir. Ancak LPF antikorları oluşturma açısından aşılarda arasında farklılıklar olduğuna işaret edilmiştir (8). Bu nedenle aşı suşu olarak kullanılacak bakterinin LPF-FHA yönünden de yüksek sentez yeteneğinde, yani patojenitesinin fazla olması gerektiğini vurgulayabiliriz.

Sonuç olarak, B.pertussis suşları arasında bağışıklama gücü açısından önemli farklılıklar olduğu ve aglütinojen 1, 2 ve 3'ü yapısında bulunduran her faz I suşunun in vivo aynı düzeyde bağışık yanıt oluşturmadığı belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, yerli izolat Saadet suşunun tüm özellikler bakımından diğer suşlardan üstün olduğu ve B.pertussis'e özgü bir determinantı serolojik olarak ortaya çıkarabilecek kararlılıkta ve yapıda olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Cherry JD, Brunel PA, Goldon GB, Korzon DT: Report of the task force on pertussis and pertussis immunization. *Pediatrics*, 1988, 82: 939-984.
2. Özcengiz E, Günalp A: Bordetella pertussis ekzotoksinlerinden Lenfositozis-Promoting Faktör (LPF) ve Filamentöz Hemagglütinin (FHA)'nın yeni bir yöntemle saflaştırılması. *Doğa-Tr.J.of Medical Sciences*, 1990, 14: 315-323.
3. Sato Y, Arai H: Leucocytosis-Promoting factor of Bordetella pertussis. I. purification and characterization. *Infection and Immunity*, 1972, 6 (6): 899-904.

4. Özcengiz E, Günalp A: Bordetella pertussis ekzotoksinlerinden Lenfositozis-Promoting Faktör (LPF) ve Filamentöz Hemagglütinin (FHA)'nın değişik sıvı besiyerlerinde sentez miktarı. Doğa-Tr. J of Medical Sciences, 1990, 14: 307-314.
5. Who Technical Reports Series. Requirements for pertussis vaccine, 1990, 800: 127-149.
6. Sato H, Sato Y: Bordetella pertussis infection in mice: Correlation of specific antibodies against two antigens, pertussis toxin, and filamentous hemagglutinin with mouse protectivity in a intracerebral or aerosol challenge system. Infection and Immunity, 1984, 14: 415-421.
7. Zhang JM, Cowell JL, Steven AC, Carter PH, McGrath PP, Manclark CR: Purification and characterization of fimbriae isolated from Bordetella pertussis. Infection and Immunity, 1985, 48: 422-427.
8. Edwards KM, Decker MD, Halsey NA, Koblin BA, Townsend T, Auerbach M, Korzon DT: Differences in antibody response to whole-cell pertussis vaccines. Pediatrics 1991, 88 (5): 1019-1023.
9. Blumberg DA, Pineda E, Cherry JD, Caruso A, Scott JV: The agglutinin response to whole cell and acellular pertussis vaccines is Bordetella pertussis strain dependent. AJDC, 1992, 146: 1118-1150.
10. Eldering G, Hornbeck C, Baker J: Serological study of Bordetella pertussis and related species. J Bacteriol, 1957, 74: 133-136.
11. Preston NW: Effectiveness of pertussis vaccines. British Medical Journal, 1965, 2: 11-13.
12. Abbott JD, Preston NW, Mackary RI: Agglutinin response to pertussis vaccination in the child. British Medical Journal, 1971, 1: 86-88.
13. Ketchum PA: Microbiology (introduction for health professionals), p. 361-363, 1984.
14. Manclark CR, Meade BD, Brustyn DG: Serological response to Bordetella pertussis. p. 388-394. Manual of clinical laboratory immunology, 1986. Third ed, American Society for Microbiology, Washington DC.
15. Gülmezoğlu E: Mayı vasatta boğmaca aşısı hazırlanması ve immünizan kudreti üzerinde araştırmalar Türk Hyg Den Biol Der, 1956, 16: 274-280.
16. Galazko AM: Pertussis. The immunological basis for immunization, WHO, EPI, Genova, 1-20, 1993.