

T. C.  
Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı  
Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha  
Enstitüsü

T Ü R K  
H İ J İ Y E N v e T E C R Ü B İ  
B İ Y O L O J İ D E R G İ S İ

Cilt : XXIX — Sayı : 3  
(1969)

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

●  
REVUE TURQUE D'HYGIENE ET DE BIOLOGIE EXPERIMENTALE

●  
TÜRKISCHE ZEITSCHRIFT FÜR HYGIENE UND EXPERIMENTELLE BIOLOGIE

TÜRK HİJ. TEC. BİYOL. DERG.

Vol : XXIX — No : 3

**ISSUED BY  
PUBLIÉ PAR  
HERAUSGEGEBEN VOM**

**REFİK SAYDAM MERKEZ HIFZISSİHHA ENSTİTÜSÜ (ANKARA)**

**Senede Üç defa çıkar.**

**The Bulletin is issued three times a year.**

**Revue paraissent trois fois par an.**

**Die Zeitschrift erscheint dreimal Jaerlich.**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>1 — Herbert Kober Kuter'i kaybettik</b> ... ..	185
<b>2 — Dr. Elhan ÖZLÜARDA</b>	
Brief History of Epidemiology and Control of Smallpox in Turkey and recent Developments in Vaccine Production ... ..	187
<b>3 — Y. Kimya Müh. Nilüfer ARI</b>	
Norethisteronacetat, Testosteron Önanthat, Östradiol Valerianat ve Östradiol Benzoat'ın yağlı karışımlarında her birinin ince tabaka kromatografisi ile idantifikas- yonları ... ..	200
Identification of Norethisteronacetate, Testosterone — 17 — N — Oenanthat, Estradiol — 17 — B — N — Valerianate, and Estradiol Benzoate by Thin - Layer Chromatography in Oily Preparations ... ..	205
<b>4 — William HEWITT — Meliha İNAK — Ülkü ÖNAL — Ülkü GÜNER</b>	
Penisilin için ilk Türk Milli Standard Referans Maddesi The first Turkish National Standard Reference Material for Penicillin ... ..	207 223
<b>5 — Ecz. Mithat KİPER</b>	
O-Ethoxybenzamid'in Quinin Sulfat, Acid Ascorbic ve Orphenadrine HCl. kombinasyonunda ince tabaka kroma- tografisi ile izolesi, qualitatif ve quantatif tâyini ... ..	225

**6 — Nezihe ATAY — Dr. Aral GÜRSEL**

Tween Hidroliz ve Tween Opasite reaksiyonlarının Mikobakterilerin idantifikasyon ve klassifikasyonundaki değeri .....	227
Le Role dans L'identification et classification des Mycobacteries des Tests de L'hydrolyse et de L'opacite du Tween 80 .....	235

**7 — Dr. Şerafet ERTUĞRUL**

Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü Biyolojik Maddeler Kontrol Laboratuvarının on yıllık çalışmaları .....	237
--	-----

**8 — Zeki KARAGÖL — Abdülkadir SESVEREN**

Powell Besiyerinde (Modifiye Cohen - Wheeler) Boğmaca Aşısı Üretimi .....	245
---	-----

**9 — Dr. İrfan TUNA — Dr. Elhan ÖZLÜARDA**

Uluslararası Çiçek Simpoziumu'ndan Notlar .....	251
---	-----



1904 — 1969

### Herbert Kober Kuter'i Kaybettik

Herbert Kober Kuter, 1.Ocak.1904 tarihinde Almanya'nın Dan-kirt şehrinde Dünyaya gelmiş, aynı yerde Orta okulu bitirdikten sonra, Zwickau'da ikibuçuk yıl Politeknikum'da eğitim görmüştür.

1924 yılında Türkiye'ye gelen H. K. Kuter, o tarihlerde Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü'nün Bakteriyoloji ve Kimya Tahlil Laboratuvarlarının bulunduğu binanın inşaatını üzerine almış bulunan Redlich Berger adlı Avusturya firmasında tekniker olarak çalışmaya başlamıştır. Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı kontrol Mühendisinin dikkatini çeken H. K. Kuter, Bakanlıkça kendisine yapılan Türkiye'de kalma teklifini kabul etmiş, önceleri Noterden onaylı yıllık sözleşmelerle Bakanlığın teknikeri olarak, Bakanlık binası, memur lojmanları, Hıfzıssıhha Enstitüsü ve Ankara Numune Hastanesinin kalorifer, elektrik tesisleriyle diğer bütün cihazların çalıştırılması, onarımı ve teknik personelin yetiştirilmesiyle görevlendirilmiştir.

Teknik personel sıkıntısı çekilen bu tarihlerde, H. K. Kuter Ankara Numune Hastanesinin ilk kalorifer tesisatını kurmuş, Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü Merkez binasının inşaatında, Bakanlığın resmî kontrolörü olarak görev almıştır.

Enstitünün kurucusu, Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanı rahmetli Dr. Refik Saydam, H. K. Kuter'le yakından ilgilenmiş, hizmetlerinin takdir etmiş, «İyi adam anlamına» gelir diyerek, Kuter soyadını kon-

disi vermiş, 1933 yılında Türkiye Cumhuriyeti vatandaşlığına geçmesini sağlamıştır.

Atelye şefi olarak, aralıksız 44 yıl Enstitü çalışmalarında çok değerli katkılarda bulunmuş ve özellikle son yıllarda Esenboğa Serum Çiftliği kuruluşlarında büyük emekleri geçmiş olan H. K. Kuter, Temmuz ayı içerisinde, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Cerrahisi Servisinde başarıyla sonuçlanan çok ciddi bir ameliyat geçirmiş, 14.Kasım.1969 tarihinde kendi arzusuyla emekliye ayrılmış 15.Aralık.1969 günü de hayata gözlerini yummuştur. 17.Aralık.1969 günü, Enstitüde yapılan bir törenden sonra, Ankara'da toprağa verilen H. K. Kuter'in hatırasını saygıyla anarız.

**Dergi**

# BRIEF HISTORY OF EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SMALLPOX IN TURKEY AND RECENT DEVELOPMENTS IN VACCINE PRODUCTION (\*)

Elhan Öziliarda, M.D.

Refik Saydam Central Institute of Hygiene Ankara, Turkey

## EPIDEMIOLOGY OF SMALLPOX IN TURKEY

Smallpox is not an endemic disease in Turkey. It has been eradicated since 1952, and last outbreak which occurred in 1957 and caused by an imported case from one of the south - eastern neighbouring countries, limited to 128 cases with 7 deaths.

As will be seen from Table 1., the total number of smallpox cases in Turkey from 1938 to 1957, was 24,012 and fatality ratio 11.6 %. For the 10 - years period before 1938, these figures were 3,573 and 32.9 %, respectively. As smallpox persisted in other countries in the region, there had been repeated introductions resulting in localized outbreaks in border areas.

Vaccination against smallpox has become compulsory in Turkey since the 19th century and immunity level of the population has got higher year by year. This may be the possible cause of the decrease in the fatality ratio for the years 1938 - 1957, as compared with 32.9 % for 1928 - 1937 period.

Vaccination programmes have been quite beneficial in taking the endemic disease under control from time to time in the past; but the reasons why smallpox could not be eradicated in this country

---

(\*) Presented at the Symposium on Smallpox, 2 - 3 September 1969, Zagreb, Yugoslavia.

earlier than 1952 in spite of extensive vaccinations possibly were : a) the vaccines not kept under proper conditions, b) shortage of trained vaccinators, and c) the traffic on the vast boundaries with the southern and south - eastern neighbours of Turkey; the cause of the 1957 outbreak was also imported cases from one of the southern neighbours of Turkey and the outbreak limited to 3 towns in this region.

**Table 1. Number of Reported Cases of Smallpox and Case Fatality Ratios in Turkey, 1938 — 1957 (%)**

Years	No. of Cases	No. of deaths	Percent fatal
1938	641	168	26.2
1939	438	81	18.5
1940	958	130	13.6
1941	898	113	12.7
1942	1 871	174	9.3
1943	12 395	1 380	11.1
1944	6 093	678	11.1
1945	309	34	11.0
1946	8	1	12.5
1947	2	—	—
1948	39	7	17.9
1949	73	14	19.2
1950	7	—	—
1951	152	3	2.0
1952-1956	—	—	—
1957	128	7	5.5
<b>TOTAL</b>	<b>24 012</b>	<b>2 790</b>	<b>11.6</b>

(\*) From the statistics of the Ministry of Health and Social Assistance.



## CONTROL OF SMALLPOX IN TURKEY

Turkey is the first country on the western hemisphere which used an immunizing method against a communicable disease, the smallpox. The history of smallpox vaccination in Turkey goes back to the 17th century (Ünver, 1948). Though in some old Turkish books it was stated that the smallpox vaccine produced from cowpox and applied by the Jennerian method, existed in Anatolia as early as 1679, we do not have any written paper about this practice. However, there are enough data for that variolation carried out in Turkey was first described by the great physician Emmanuel Timonius in 1713. Four years after Timonius, Lady Mary Wortley Montague, the wife of the British Ambassador to Turkey, introduced the method of variolation to the western countries.

Three years after the publication of Jenner's work, Dr. Mustafa Behçet was the first who wrote about vaccination (1801). First experiments on calf vaccine were done in 1811. In the 9th century, as mentioned above, vaccination has become compulsory and took place in our health organizations and regulations.

Until 1890 - 91, the vaccination had been carried out with the material imported from foreign countries. When the material was not enough at any time, the vaccinators used to take pus from the local reaction of vaccinated children and apply it to the others for vaccination.

In 1890-91, an Inoculation House was established in Istanbul and the vaccine prepared in calf skin was sent to all parts of the country. Until 1923, the material used as seed virus had been imported from the Pasteur Institute, Paris. Since then, the vaccinia virus has been passed through donkey after every second calf passage used for vaccine production.

In 1934, the Smallpox Vaccine Production Laboratory was transferred to the Refik Saydam Central Institute of Hygiene, Ankara, founded by the Ministry of Health and Social Assistance. This Laboratory prepares 5 to 10 million doses of glycerinated smallpox vaccine a year, according to the need of the country, and distribute them in refrigerated containers to the Health Centres of every province in Turkey (Table 2.). The Laboratory has started the production of freeze dried smallpox vaccine since 1965. The dried vaccine is sent to the warmer regions of Turkey in summer months.

**Table 2. The Glycerinated and Freeze - dried Smallpox Vaccine Doses Produced and Distributed, 1964 — 1969 (by July).**

Year	Glycerinated vaccine (dos.)		Freeze-dried vaccine (dos.)	
	Produced	Distributed	Produced	Distributed
1964	4 543 750	4 602 140	—	—
1965	9 013 450	9 007 300	136 600	3 750
1966	6 492 350	6 580 420	680 750	36 675
1967	13 757 900	12 992 520	393 400	768 425
1968	4 420 250	5 273 320	472 650	138 600
1969 by July	1 964 050	2 364 770	280 200	166 750

Besides as a compulsory immunizing method, smallpox vaccination can be counted as a tradition in Turkey and therefore people are mostly cooperative. Parents of babies usually take their children of 6 month to 1 year old, to a vaccination station, preferably during the spring months, probably the main reason being that they believe that the time when trees blooming is the most suitable one for smallpox vaccination, as this disease is called «çiçek» in Turkish and means «flower». Civilians are vaccinated in Health Centres and dispensaries in cities; villagers and their children are vaccinated by the mobile teams of sanitarians, in their village.

In Turkey, a vaccination certificate is necessary at school entry, for military service, before starting a business and going abroad. Besides, everyone has to be vaccinated when a mass vaccination programme, connected with the smallpox cases in the neighbouring countries is being carried out. The visitors coming from the countries where smallpox is endemic, should have a valid vaccination certificate. All the ports to Turkey have facilities for the isolation and quarantine of suspected cases and vaccination of contacts.

Table 3. may give an idea for the numbers of smallpox vaccinations carried out in Turkey during the last 9 years. According to the figures in the Tables 2. and 3., it seems that about only half of

the vaccine doses distributed have been used in the field and/or the amount of vaccine dose used per single vaccination may have been more than estimated and recommended by the production laboratory, for example against the 39 569 900 distributed doses of vaccine, only 19 223 353 persons were vaccinated in the years 1964 - 1968.

**Table 3. Number of the Smallpox Vaccinations  
in Turkey, 1960 — 1968 (\*).**

<b>Year</b>	<b>Number of vaccinated</b>
1960	4 202 633
1961	3 329 268
1962	11 966 555
1963	2 729 109
1964	2 046 609
1965	3 245 730
1966	2 693 983
1967	8 521 380
1968	2 715 649

(\*) From the statistics of the Ministry of Health and Social Assistance.

## **PRODUCTION OF SMALLPOX VACCINE**

Smallpox vaccine used in Turkey is prepared at the Refik Saydam Central Institute of Hygiene, Ankara, from virus grown in the skins of calves. The female calves are examined and tuberculin - tested by a veterinarian and kept in quarantine for at least two weeks before use. After clipping and washing, animal is secured on its left side on the table special for the purpose; the whole flank and abdomen are shaved, washed thoroughly and then scarified with a sterile instrument. The seed virus is uniformly spread over the scarified area, and after drying up of the seed, vaccinated side

of the animal is covered with a sterile compress; then calves are returned to their special pens where suspending belts prevent them from lying down on the dirt. Their temperature are recorded and compresses are changed with sterile ones daily during four - day incubation period. On the 4th day of vaccination the lymph is harvested after vaccinated area scrupulously cleaned and animal slaughtered. The collected pulp is transferred to a sterile jar previously labelled and weighed. After recording the weight of the pulp on the label the jar is stored at - 15° — - 20° C. until it is required for vaccine production.

Since the beginning of 1961, the technique used in the production of smallpox vaccine has been changed basing on the methods of the Lister Institute, England. The differences are mainly in the preparation and number of animals inoculated weekly, the technique used for homogenizing the pulp, the kind of suspending solution, antibacterial agent used, incubation period for eliminating bacteria, bacteriological controls and titration of vaccine (Table 4.).

**Table 4. Recent Changes and Developments in Smallpox Vaccine Production and Distribution in Turkey.**

Material and method used	Before (*)	Since 1961 (**)
Cleaning of animals before vaccination and harvest	With soap and hot water	With soap, soft soap, ether soap and water during definite periods of time
Animal in incubation period	Tied only from neck	Suspensors used for preventing the animal from lying down on its dirt.
Emulsifying the pulp	By a grinder and then a mill for two hours, container being in ice cubes	In an electric-mixer for ten minutes, container being in ice-water mixture
Suspending solution	Glycerine containing 20 % distilled water	McIlvaine's sodium phosphate-citric acid buffer( pH 7. 2), containing 0.4 - 1 % phenol

(\*) Erzincan, 1952.

(\*\*) Özlüarda, 1962.

contd.

Table 4. contd.

Time of the glycerine addition	Partly during homogenizing, partly after	After homogenizing and bacteriological control
Antibacterial agent	Glycerine	Phenol and glycerine
Incubation period for eliminating bacteria	6 month at low temperature and, if necessary, few days at room temperature	15 - 24 hours at 22° - 24° C.
Bacterial content	Less than 1000/ml.	Less than 500/ml.
Bacteriological control	In each batch	In every single harvest, then repeated in the batch
Titration method and acceptable titre of vaccine	By intradermal rabbit test; 0.1 ml. of 1/1000 dilution of vaccine should produce a distinctive papule within 3 days	By pock counting on the chorioallantois of the chick embryo (*), (**), (***) ; it should contain vaccinia virus not less than 10 <sup>7</sup> PFU/ml. (rabbit skin scarification test is used in the National Control Laboratory)
Distribution	In ordinary boxes and transport	In refrigerated containers (since 1965) and by the quickest means of transport.
Expiration date (for wet vaccine)	6 months in winter and 3 months in summer	2 months

(\*) Özlüarda, 1957.

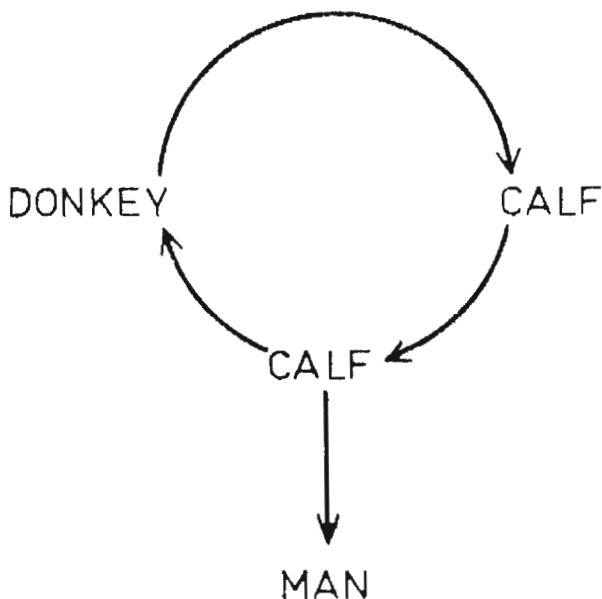
(\*\*) Özlüarda, 1959.

(\*\*\*) Özlüarda, E., 1960.

The strain of vaccinia virus in use at the Refik Saydam Central Institute of Hygiene for smallpox vaccine production was obtained from the Pasteur Institute, France, about 46 years ago. This virus strain has since been maintained by cutaneous passages on calves and, after every second calf passage, on donkey. As mentioned above, the pulp from second calf passage is used for vaccine production. The sequence of virus transfer is shown in Figure 1.

Figure - 1 -

The sequence of passages of the vaccina virus



Since 1965, we have started to prepare freeze-dried smallpox vaccine by the method used in the Lister Institute, England, and recommended by the WHO.

The laboratory and field studies we have carried out so far have helped us in improving our vaccine. In a study with the smallpox vaccine prepared by the old method, it was found out that the take rate was parallel with the titre of vaccine and in order to obtain 100 % major reaction in primary vaccinations we had to prepare a vaccine of higher potency (Özluarda et al., 1960). In another study performed for finding out the relation between the factors effecting the production of smallpox vaccine, we came to the conclusion that to produce a vaccine of good quality and quantity, it was neces-

sary to use a seed of high titre of virus and low bacterial content, and, the pulp obtained from the second passage on vaccine animal was more economical than the first passage pulp, as its weight and virus content was much more (Özluarda, 1964).

As sheep are more easily kept clean than calves and do not suffer from tuberculosis, we investigated the possibility of using sheep in smallpox vaccine production. We planned a study on five different bred of sheep available in Turkey and compared them with regard to their suitability for the purpose. Tests showed that none of the 5 sheep vaccines was as active as calf vaccine (Özluarda, 1967). Later we observed that even the dried vaccines prepared in our laboratory from sheep lymph were less stable than that of prepared from calf lymph.

During the mass smallpox vaccination campaign when more than 11 million persons were vaccinated, we had the opportunity of finding out the ratios of successful vaccinations and postvaccinal complications, and also the opinion of vaccinators about vaccine in use and its packing and distributing system, by the help of questionnaires sent by the Ministry of Health to all of the local health authorities. The filled questionnaires gave us a rough idea about the above mentioned points. The average rate of takes among the persons of more than 25 years of age was 55.5 %, in school children 66 %, in pre-school children and infants 87 %. As postvaccinal complications, the ratios for generalized vaccinia and postvaccinal encephalitis were 14 per 10,000 and 1 per 480,000 vaccinated individuals, respectively (Özluarda et al., 1963). We thought that the term of generalized vaccinia must have been misunderstood mostly by the observers and used for all type of transfer of infection on the skin and also for eczema vaccinatum.

After starting to produce freeze-dried smallpox vaccine and before distributing it to the vaccination stations for routine use, a pilot field study was arranged to compare the dried and glycerinated vaccines in the field, their stability and the relationship of their titres to frequency of vaccine take. It would be also useful to see whether any difficulty would appear in the field with this new type of smallpox vaccine preparation with which the vaccinators in our country were not familiar (Özluarda, 1965). As a result, the average success rate with dried vaccines under study was found to be 97 %, and with

the glycerinated vaccine 95 % in primary vaccinations. On the other hand, dried vaccines stored 9 - 10 weeks at 37°C. and with which a total of 819 persons were vaccinated and controlled, were giving 92 % success rate, while only 26 % of the primary vaccinations with glycerinated vaccine kept at 37°C. for 11 days were successful. The average success rate in revaccinations with dried vaccines was 94 % and with glycerinated vaccine 89 %. No severe complications have been encountered in this study which was carried out on 2,469 (controlled) persons. In one case vesiculation occurred in nostrils of a girl due to the transmission of vaccine by hand, and in 4 other cases satellite pustules came out around the main reaction, due to the rubbing of the vaccination site with a piece of cotton soaked into acetone to clean the skin. With one ampoule of dried vaccine of 0.3 ml. 35 - 40 persons were successfully vaccinated and a single linear scratch of 5 mm. long was enough for primary vaccination. The sanitarians who carried out vaccinations and controls were the skilled staff for the BCG Campaign and they had been subjected to a two-day course on the smallpox vaccination with dried and glycerinated smallpox vaccines before the trial. We think that this training is necessary for all vaccinators in order to obtain more successful results in vaccinations and less complications.

One of the first batches of our dried vaccine was controlled by the Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Netherlands, and favorable results were obtained.

In order to prove the efficacy of the dried and glycerinated vaccines used in the above mentioned study, and at the same time, to determine the success rate of our dried vaccines in revaccination, we challenged the successful primary vaccinations by a potent dried vaccine 1 year after the previous study. As a control for vaccine used, a small group of unvaccinated children were vaccinated primarily; this would be a test of efficacy for the batch used in the field as well. At the end of the study the bulk of the responses to challenge were of the accelerated type, indicating substantial protection, the control group vaccinated with the same dried vaccine giving 100 % positive response showing «major reaction». No complication was encountered in 422 persons vaccinated and controlled. From this study we came to the conclusion that a) the dried and glycerinated smallpox vaccines produced in our laboratory ensured satisfactory protection in successfully vaccinated persons, b) there was no difference



in the degree of protection one year after vaccination between those vaccinated by the glycerinated and dried vaccines, c) our dried vaccine was highly successful in revaccinations as well (Özliarda, 1967). As had done the previous study, this one also confirmed that the proper application of the vaccine minimized the possibility of complication. All of the field trials carried out so far showed that the vaccinia virus strain in our smallpox vaccine is satisfactory without producing severe local reactions and marked systemic disturbances and any other complication, when applied properly.

In 1965, at a Meeting on the activities of the BCG Campaign, the Ministry of Health had decided to have a pilot study performed on the simultaneous administration of the smallpox and BCG vaccines. A small - scale field trial was carried out on 1095 children (apart from the children BCG vaccinated only as a control group) in 0-6 age group in the 5 villages of Nevşehir Province in December 1965 (Özliarda et al., 1966). The success rate in primary and revaccinations was found to be even higher in those who were vaccinated simultaneously by the smallpox and BCG vaccines than in those vaccinated by smallpox vaccine only. It was also found out that the allergy rate after simultaneous vaccination with these two vaccines was higher than that after BCG vaccination only. No complication occurred after simultaneous BCG and smallpox vaccinations at different sites, or administration of each vaccine alone. These satisfactory results encouraged the BCG Campaign of Turkey in starting to perform smallpox vaccinations during their routine activities.

A longterm study on the stability of our freeze-dried vaccines is now being performed, in order to find out the true expiration date in our local conditions. The samples from all of the batches kept at about  $-15^{\circ}$ ,  $4^{\circ}$ ,  $24^{\circ}$  and  $37^{\circ}$  C. are being titrated at weekly or monthly intervals. From the titrations made so far we concluded that, to ensure the stability at  $37^{\circ}$  C. for 4 weeks (i.e. to keep a titre of at least  $10^8$  PFU/ml.), we have to prepare a dried vaccine of quite a high potency (almost  $5 \times 10^8$  PFU/ml.), and that when kept in an ordinary refrigerator, our dried vaccine is almost as stable as in deep freeze, while glycerinated vaccine does not keep more than two months when stored in refrigerator. The results of this study will be evaluated after the laboratory tests have been completed.

## ABSTRACT

Smallpox is not an endemic disease in Turkey. It has been eradicated since 1952, and last outbreak occurred in 1957 caused by an imported case from one of the southern neighbours of Turkey. Vaccination has been compulsory since the 19th century in this country and is being performed in the first year of life, at school entry, before entering military service or an official business and going abroad. Mass vaccination campaigns are carried out when smallpox outbreaks occur in neighbouring countries. The smallpox vaccine is prepared at the Refik Saydam Central Institute of Hygiene from virus grown in the skins of calves, and vaccinia virus is passed through donkey after every second passage on calf. The origin of the vaccinia virus in the vaccine is the Pasteur Institute, France, from where it had been obtained about 46 years ago. The field studies carried out so far showed that smallpox vaccines prepared in this laboratory do not cause much complications if applied properly by trained vaccinators. Some alterations have been made in the production procedures and quality of the vaccine developed since 1961, according to the results obtained from the laboratory tests and field trials, and basing on the methods used in the Lister Institute, England. The smallpox vaccine production laboratory prepares 5 to 10 million doses glycerinated vaccine a year. The freeze-dried smallpox vaccine production started in 1965 and the dried vaccine produced has since been distributed to the health centres in the warmer regions of Turkey.

## REFERENCES

- Erzin, N. 1952, Smallpox and smallpox control in Turkey. Turk. Bull. Hyg. Exp. Biol. 12: 143 - 146.
- Özliarda, D. and E. Özliarda 1960. The relation between the pock counts of two batches of Turkish smallpox vaccine and the percentage of successful vaccination they have produced. Turk. Bull. Hyg. Exp. Biol. 20: 417.
- Özliarda, E. 1957, Studies on vaccinia virus. I. Propagation of vaccinia virus on the chorion - allantoic membrane of chick embryo and its hemagglutination properties. Turk. Bull. Hyg. Exp. Biol. 17: 222 - 223.
- Özliarda, E. 1959, Studies on vaccinia virus. II. The titration of Smallpox vaccine by the pock counting technique. Turk. Bull. Hyg. Exp. Biol. 19: 61.

- Özliarda, E. and D. Özliarda 1960. A comparative study with the smallpox vaccines of Refik Saydam Central Institute of Hygiene and Lister Institute of Preventive Medicine. Turk. Bull. Hyg. Exp. Biol. 20: 409.
- Özliarda, E. 1962, The latest method of smallpox vaccine production in Turkey. Turk. Bull. Hyg. Exp. Biol. 22: 216 - 218.
- Özliarda, E., Z. Durusu and A. Arı 1963, The mass smallpox vaccination campaign carried out in Turkey in 1962 and the results obtained. Turk. Bull. Hyg. Exp. Biol. 23: 195 - 201.
- Özliarda, E. 1964, Relations between the factors effecting on the production of the smallpox vaccine. Turk. Bull. Hyg. Exp. Biol. 24: 41 - 42.
- Özliarda, E. 1965. Dried smallpox vaccine production in Turkey and results obtained from the laboratory and vaccination studies with dried and glycerinated smallpox vaccines. Turk. Bull. Hyg. Exp. Biol. 25: 145 - 151.
- Özliarda, E., N. Sarp and D. Özliarda 1966, Results of the study on the simultaneous administration of BCG and smallpox vaccines. Turk. Bull. Hyg. Exp. Biol. 26: 266 - 269.
- Ozliarda, E. 1967a, A comparative study on the smallpox vaccine yield of the different sheep breeds in Turkey. Turk. Bull. Hyg. Exp. Biol. 27: 207.
- Özliarda, E. 1967b, Efficacy control of dried and glycerinated smallpox vaccines by challenging of successful primary vaccinations after one year with potent vaccine. Turk. Bull. Hyg. Exp. Biol. 27: 11 - 12.
- Özliarda, E. 1968. Brief history of the smallpox vaccine production in Turkey. 28: 235 - 236.
- Unver, S.: An outlook on the history of smallpox vaccination. İstanbul, Turkey. Institute for the History of Medicine, Medical Faculty, University of İstanbul. 1948, 332.

# **NORETHİSTERONACETAT, TESTOSTERON ÖNANTHAT, ÖSTRADIOL VALERİANAT VE ÖSTRADIOL BENZOATIN YAĞLI KARIŞIMLARINDA HER BİRİNİN İNCE TABAKA KROMATOĞRAFISI İLE İDENTİFİKASYONLARI**

Biyokimya Müt., Y. Kimya Müh. Nilüfer ARI  
Refik Saydam Merkez Hıfzassıhha Enstitüsü  
İlaç Kontrol Şubesi

1951 - 1952 yıllarında Kischner ve arkadaşları tarafından analiz metodları arasına sokulan İnce tabaka kromatografisi (Thin-Layer Chromatography, T.L.C.), Avrupada 1953 senesinde Stahl tarafından geliştirilerek tatbikat sahası genişletilmiştir.

Kâğıt kromatografisinin hemen yerini alan T.L.C., geniş uygulaması bulunan Gaz kromatografisi kadar başarı sağlamıştır (1).

Steroidlerin kalitatif (2 - 6) ve kantitatif (7-9) tayininde T.L.C. çok çabuk gelişmiş, özellikle değişik kimyasal grupları taşıyanlarda kesin sonuçlar alınmasını sağlamıştır. Literatürün tetkikinde, steroidlerin T.L.C. ile ayrılmalarından sonra tayinleri, Gaz kromatografisi ve spektrofotometrik metodlarla veya plaklarda renklendirilmiş lekelerin yoğunluklarının mukayesesi ile yapılmaktadır.

U. V. de absorbe olmayan steroidlerin kantitatif tayinlerinde görülen güçlükler, fizikî ve kolorimetrik metodlarla giderildiği gibi bazı müelliflerde, sonradan tatbik edilecek kolorimetrik metodlara tesir etmediği gerekçesi ile, iç bulutunun uygun bir reaktif olduğunu bildirmektedirler. (1)

Biz, bir arada 4 steroidi ihtiva eden bir preparatta T.L.C.'si ile identifikasyonları için yaptığımız çalışmaları yazmayı faydalı bulduk. Bu preparat beher ml'sinde 20 mg. Norethisteron acetat, 180 mg. Tes-

tosteron önanthat, 8 mg. Östradiol valerianat ve 5 mg. Östradiol benzoat ihtiva etmektedir. Miktar tayinleri, firma tarafından tavsiye edilen kolorimetrik metodlarla yapılmış ise de identifikasyonları için verilen metodlar spesifik bulunmamış ve T.L.C.'si ile çabışılmıştır. Laboratuvarımızda, muhtelif solvent sistemleri ile yapılan denemelerden sonra aşağıda bildirilen metod uygulanması ile tatminkâr sonuçlar alınmıştır.

### **METOD VE MATERYAL :**

Aseton, Asetik asit, Kloroform, Etil asetat, Benzen, Sülfat asidi (Kimyaca saf, Merck)

Silicia gel G (Merck)

Desaga T.L.C. cihazı

Mikropipetler (0,005 ve 0,01 lamda)

U.V. lambası (uzun dalga)

Etliv

### **YAPILIŞ :**

Plakların hazırlanması :

25 gr Silica Gel G. 200 - 300 ml' lik cam kapaklı erlenmayerde, 50 ml damıtık su ile, 30 - 40 saniye kuvvetle çalkalanır. Süspansiyon birkaç dakika içerisinde süzücüye boşaltılarak 5 adet, 20 x 20 cm. cam plaklara 0,25 mm kalınlıkta tatbik edilir. 10 dakika müddetle havada kurutulan plaklar, 30 dakika 105° C'de aktive edilirler. Desikatör veya kurutma kutusunda saklanırlar.

Solvent :

Benzen + Etil asetat (9 : 1)

Püskürtme solüsyonu :

96 ml etanol'e soğutulularak 4 ml sülfat asidi karıştırılır.

Standart steroid solüsyonları :

- 1 — Norethisteronasetat (4000 microgr. ml asetonda)
- 2 — Testosteron Önanthat (36000 microgr. ml. asetonda)
- 3 — Östradiol valerianat (1600 microgr./ml, asetonda)
- 4 — Östradiol benzoat (1000 microgr./ml, asetonda)

Numune solüsyonunun hazırlanması :

- a) Ampulden 1 ml. + 4 ml. aseton

Bu şekilde hazırlanan numune solüsyonu ile yapılan çalışmalarda yağlar steroid lekelerinden tamamen ayrılamadığı için, net bir görünüş olmamaktadır. Bunu sağlama bakımından ekstraksiyondan sonra çalışma esas alınmıştır.

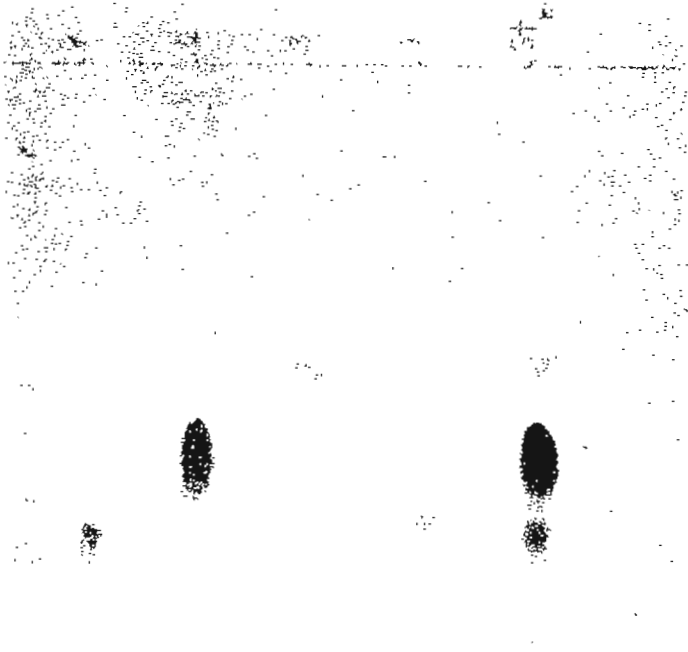
- b) Steroidlerin yağlı solüsyondan ekstraksiyonu :

125 ml'lik ayırma hunisine, 1 ml. ampul muhtevası solüsyon, 10 ml. petrol eter ve 10 ml asetik asit + su (5 : 2) konularak kuvvetle çalkalanır. Ayrılan sulu tabaka, 250 ml'lik ayırma hunisine alınır. Ekstraksiyon 9 defa 10 ml. asetik asit + su ile tekrarlanır. Toplanan sulu tabakaya 100 ml. daha su ilâve edilir ve 6 defa 10 ml. kloroform ile ekstre edilir. Birleştirilen kloroform tabakaları, kloroformla ıslatılmış süzgeç kâğıdından süzülerek kuruluğa kadar uçurulur. Geri kalan kısım 5 ml asetonda eritilerek numune solüsyonu hazırlanır.

Çalışma :

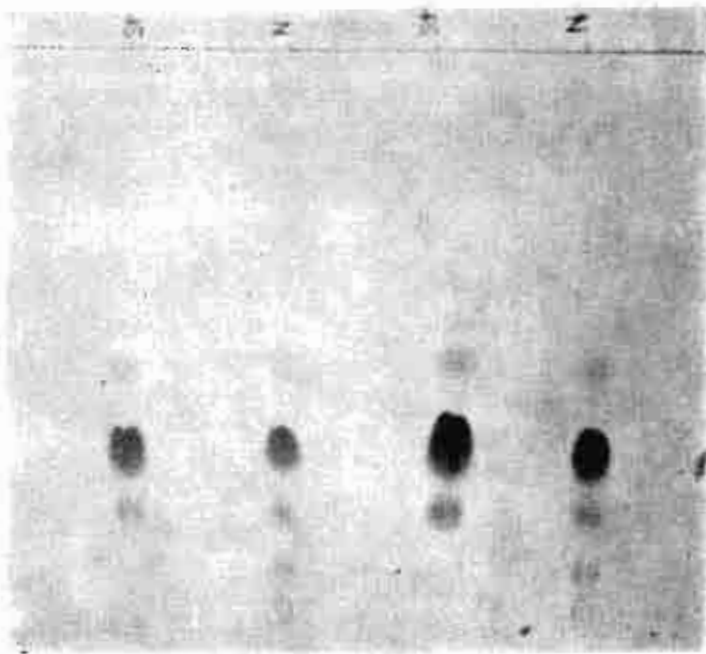
Aktive edilmiş Silika Gel plaklarına, tabandan 2 cm mesafeden 3'er cm. ara ile tatbik noktaları ve yine tabandan 15 cm. mesafeden yürüme çizgisi sınırı işaretlenir. Standart terkip ve numune solüsyonundan 0,005 ve 0,01 ml. mikro pipetle damlatılır. 1-2 saat evvel 1 cm yükseklikte solvent konularak doyurulmuş hale getirilen tanka plak daldırılır. Yürüme çizgisine gelince tanktan çıkartılan plâğa renklendirme solüsyonu püskürtülür ve steroid lekeleri gün ışığında görülünceye kadar 105° C de etüvde tutulur. Plaklar aynı zamanda U. V. lambası altında da incelenir. (Şekil 1) de ayrı ayrı steroid standartları ve standart terkip, (şekil 2) de ise standart terkip ve numune solüsyonlarında 5 ve 10'ar lamdalık steroid lekeleri görülmektedir.

Şekil 1



1 — Norethisteron asetat, 2 — Testosteron önanthat, 3 — Östradiol valerianat 4 — Östradiol benzoat, st<sub>k</sub> Standart karışım.

Şekil 2



Standart terkip ve numune, 0,005 ml. 0,01 ml.

### SONUÇ VE TARTIŞMA :

Steroidlerin her biri için T.L.C. ile 5 ayrı denemede elde edilen RF değerleri, gün ışığında ve U.V. lambasında gösterdiği renkler aşağıdaki tabloda toplanmıştır.

Steroidin ismi	RF	Gün ışığında	U.V. de
Norethisteron asetat	0,21	Leylak	Kırmızı
Testosteron önanthrat	0,35	Mavi yeşil	Yeşil
Östradion valerianat	0,53	Portakal	Sarı
Östradiol benzoat	0,227	Kızıl portakal	Limon küfü



Norethisteron asetat ve Östradiol benzoat'ın RF değerleri birbirine çok yakındır. Bu sebeble fotoğraflarda tek bir leke gibi görülmüş ise de her iki steroid gün ışığı ve U.V. lambası altında farklı renkler verdiklerinden plaklarda kolayca seçilmektedirler.

Ayrıca Östradiol derivelerinin ayrılmasında bu solvent sisteminin uygun olacağı bir gerçektir.

**IDENTIFICATION OF NORETHISTERONACETATE,  
TESTOSTERONE — 17 — N — OENANTHATE,  
ESTRADIOL — 17 — B — N — VALERINATE AND ESTRADIOL  
BENZOATE BY THIN — LAYER CHROMATOGRAPHY IN  
OILY PREPARATIONS**

**N. ARI, Chemical Engineer**

Refik Saydam Central Institute of Hygiene  
Section of Drug Control

As it is well known from literature, the identification and quantitative determination of the steroids on the Thin - Layer Chromatography (T.L.C.) is used in the large scale, within the last couple of years.

In this work, a pharmaceutical preparation containing the following steroids (Norethisteronacetate, Testosteron oenanthate, Estradiol valerianate and Estradiol benzoate) has been separated by T.L.C. on Silica Gel. The separation and the identification of the steroids have been achieved by using Benzen - Ethyl acetate (9-1) as solvent system.

RF Value of each steroid, calculated from the results of five tests and the colour of the spots under U.V. and day light are given in the table.

Compouand	RF	Day light	U.V.
Norethlsteronacetate	0,21	Lilac	Red
Testosteron oenanthate	0,35	Blue green	Green
Estradiol valerianate	0,52	Orange	Yellow
Estradiol benzoate	0,227	Red orange	Green grey

## LITERATUR

- 1 -- Matthews, J.S., Pereda V.A.L., Agullera P.A., 1962, The Quantitative Analysis of steroids by T.L.C., J. Chromatog., 9, 331 - 338
- 2 -- Golab, T., Layne, D.S., 1962, The Separation of 19 - Nor Steroids by T.L.C., on Silica Gel, J. Chromatog., 9, 321 - 330
- 3 -- Hertelendy, F., Common, R.H., 1964, Separation of equol from Oestrogens by T.L.C., J. Chromatog., 13, 570.
- 4 -- Touchstone, J.C., Murawec, T., Brual, Q., 1968, Improved solvent systems for thin - layer chromatography of estrogens, J. Chromatog., 37, 359.
- 5 -- Karzun, B.P., Brody, S., 1963, T.L.C. identity test for steroids in sesame oil preparations, J. Pharm. Sci., 52, 206
- 6 -- Kritchevsky, D., Tepper, S.A., 1968, Detection of steroids in thinlayer chromatography, J. Chromatog., 37, 361
- 7 -- Cavina, G., Moretti, G., 1966, Quantitative separation of steroids in oily solution by means of T.L.C. with continuous elution, J. Chromatog., 22, 41.
- 8 -- Bican - Fister, T., 1966, Quantitative separation and estimation of steroids by T.L.C., J. Chromatog., 22, 465.
- 9 -- Kurt Randerath, 1963, Thin - Layer Chromatography (Verlag Chemie, GmbH.).

## PENİSİLİN İÇİN İLK TÜRK MİLLİ STANDARD REFERANS MADDESİ

William HEWITT (\*)      Meliha İNAK      Ülkü ÖNAL      Ülkü GÜNER  
Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü  
İlaç Kontrol Şubesi - Ankara

Birçok sene önce, Refik Saydam Enstitüsünde, mikrobiyolojik tayin tekniğinin tesisinden beri, karşılaştığımız başlıca zorluklardan biri potensi belli kâfi miktarda standard maddenin noksanlığı olmuştur.

Bizim çalışma standardlarımız umumiyetle imalâtçılar tarafından teberrü edilen az miktarda maddelerden ibarettir. Uygun Enternasyonal Standard'ın mevcut olduğu hallerde basit bir mukayese tatbik edilebilir.

Geniş çapta kullanılan antibiyotikler bahis mevzuu olduğu zaman, tekabül eden Enternasyonal Standard ile standardlaştırılmış tam potensi belli Millî Standard Maddelerinin tesisi düşünülür.

1965 yılının aralık ayında, üç ilâç firması şöyle bir projeyi müzakere etmek üzere davetimizi kabul etmişlerdir. Bir penisilin standardının tesisi ile başlamak anlaşmasına varılmıştır.

Türkiye'de birkaç sene Millî Çalışma Standardı için en az 5000 kabın kâfi geleceği tahmin edilmiştir.

Bu gaye dikkate alınarak aşağıdaki faaliyetler kabul edilmiştir:

1) Maddeleri ambalâjlama ve şartlar hususunda Tıbbî Araştırma Konseyi, Biyolojik Standardlar Bölümü, Londra ve U.S.P. Farmakope Komisyonundan malûmat aranmıştır.

(\*) İlaç Kontrol Şubesi İmlî Müşavhri, Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü Ankara

Biolojik Standardlar için WHO Enternasyonal Lâboratuvarları tarafından kullanılan şartların aşırı sıklığı âşikâr olduğundan, bizim iktidarımız dahilinde bu sistemi kolaylıkla takip etmek mümkün değildir.

Aşağıdaki sistem kabul edilmiştir.

Ambalâj, alüminyum başlık tarafından yerine tutturulmuş butil lastik tapa ile cam şişeden müteşekkildir.

Şişeler ikişer defa yıkanıp, kurutulmadan önce distile su ile iyice çalkalanmıştır. Herbir şişenin boyun çapı gevşek duran tapalara karşı bir tedbir olarak kontrol edilmiştir. Butil lâstik tapalar ikişer defa yıkanmış, distile suyla çalkalanıp kurutulmuş ve kullanılmadan önce en az 24 saat desikatörde muhafaza edilmiştir.

2) Az nem ihtiva eden 1,6 Kg. üstün kaliteli potasyum penisilin, iştirak eden lâboratuvarlardan biri tarafından hediye olarak temin edilmiştir.

İmalâteci tarafından aşağıdaki malûmat verilmiştir :

Nem % 0,14

Potens 1595 u./mg.

Penisilin G Muhtevâsı % 99,6

Isı Dayanıklılığı % 0,3 kayıp

3) Yarı otomatik bir Höfliger ve Karg doldurma makinası kullanılarak düşük nem sahasında şişeler doldurulmuştur.

Doldurma raporları göstermiştir ki ilgili nem devamlı olarak % 11 - 12 ve her şişedeki penisilin ağırlığı 188 - 221 mg. arasındadır.

Toplanı olarak takribi 8000 şişe doldurulmuş ve iki gün içinde işlem tamamlanmıştır.

Doldurma işi tamamlanarak, şişeler kâğıt paketlerde, içinde kâfi miktarda kuru silikajel ihtiva eden 32 metal kutuda ambalâjlanmıştır. Nemin girmesini azaltmak için kapaklar yapışkan şeritle muhafaza edilmiştir. Her kutu paketlenme zamanını ve tarihini gösterecek şekilde etiketlenmiştir.

Böylece paketlenen şişeler Ankara'da Refik Saydam Enstitüsüne gönderilmiştir.

4) Farklı zamanlarda doldurulan şişeler arasında değişiklikler beklenmediği hâlde, tedbir olarak her şişe kendi kutu numarası ile işaretlenmiş ve rastgele kutular içinde yeniden paketlenmiştir.

Bazı şişelerin nem muhtevası yarı kantitatif metodla kontrol edilmiştir.

Bir şişenin bütün muhteviyatı bir bürete takılmış hipodermik iğne ile doğrudan doğruya şişenin içine tatbik edilerek çok zayıf bir Karl Fisher Reaktifi ile (0,4 mg./ml.) titre edilmiştir. Penisilin reaktifin içinde erimiş ve bitim noktası renk değişimi ile müşahede edilmiştir.

1 den 18 e kadar numaralı kutulardaki şişeler için, ilk günün doldurması olarak, titrasyonlarda hemen hemen 0,5 ml. harcanmıştır. Eğer her şişede 200 er mg. penisilin olduğu kabul edilirse, bu titrasyonlar % 0,1 neme tekabül eder. İkinci günün doldurmasında meselâ 19 dan 32 ye kadar numaralı kutulardaki şişeler için titrasyon çok defa 0,8 ml.'ye kadar yüksek olur.

Bununla beraber bütün sonuçlar çok düşük bir nem seviyesine tekabül eder.

5) Bizim müzakerelerimiz programlı çalışmak için bütün lâboratuvarların, tâyinlerinde test organizması olarak *Sarcina Lutea* ile plâk metodunu kullandıklarını açıklar. Bütün lâboratuvarlarda kullanılan vasatlar ve tampon solusyonları birbirine yakındır. Mümkün olduğu takdirde hepimizin *Micrococcus pyogenes* (var. aureus) u, ilâve test organizması olarak, kullanmayı tecrübe etmemize karar verilmiştir.

Nümune ve standard için üç doz seviyesini ihtiva eden desen için bir tercih ifade edilmiştir. Böylece cevap çizgilerinin eğimi kontrol edilebilecektir.

6) Bazı lâboratuvarlar önceden standard eğri ve referans noktası ihtiva eden şekilleri kullanmayı tercih ettikleri gibi, altı noktalı üç doz seviyesini kullanarak bir deneme yapmışlardır. Bu başlangıç testleri için, enternasyonal penisilin standardı kullanılmamıştır. Sonuçlar istatistik hesaplarla analiz edilmiş ve ilgili mütalâalar ile alâkalı lâboratuvarlara tekrar rapor edilmiştir.

7) Beraber yapılan son t ayin için Enternasyonal Standardın dört ampulünü ve teklif edilen Türk Millî Standardının (geliŒig zel alınmıŒ) on ŒiŒesini ihtiva eden paketler bu  c İstanbül l boratuvarına teslim edilmiŒtir.

8) Bütün dört l boratuvardan  n bilgi alınarak aŒađıda pl nlandığı gibi bir istatistik değerlendirme yapılmıŒtır.

(i) Her test ayrı ayrı incelenmiŒtir. Potens, fiducial limits ve weightings hesaplanmıŒtır.

Eğim ve paralellikten sapma için kontroller hesaba katılmıŒtır. Bazı hâllerde, mühim eğri olduğu zaman, sonuçlar zon çapları yerine (y), muntazam çizgi cevapları, meselâ y<sup>2</sup> veren, pratikte tatbik edilen bazı fonksiyonlar kullanılarak yeniden hesaplanmıŒtır.

(ii) Sonuçların tabii grupları (meselâ, Sarcina lutea kullanan bir l boratuvarın bütün sonuçları) x<sup>2</sup> testi vasıtası ile grup içinde heterojenlik için incelenmiŒtir.

(iii) Potensin ortalama değerleri Humphrey'in' metodları kullanılarak birbiri ardından hesaplanmıŒtır.

Müteakip teferruatlı g r Œmede l boratuvarlar geliŒig zel A, B, C ve D olarak g sterilmiŒtir. Bu makalenin sonunda lâboratuvarların isimlerinin görüldüğü sıra ile herhangi bir al kaları yoktur.

Tablo 1 herbir test için potens ve fiducial limit'leri özetler. En büyük standard hat sı   4 kadardır. (P = 0,95 de     8 e tekabül eder) ve birçok standard hat ları çok daha d Œ kt r. Bu çok tahmink r bir baŒarıdır. Tablonun son sütununda «weight» g sterilmiŒtir.

$$\text{«Weight»} = W = \frac{1}{\text{Variance}}$$

daha sonra weighted mean'lerin hesaplanmasında, heterojenlik için x<sup>2</sup> testinde ve en son olarak corrected weighted mean'lerin hesaplanmasında kullanılır.

Œekil 1, sonuçları ayrı ayrı histogram olarak gösterir.

Tablo 2, onların hepsinin m nası kadar, ayrı ayrı test organizmalarını için simple ve weighted mean'lerini gösterir.

Tablo 3. benzer malûmat verir, fakat ayrıca lâboratuvar gruplarına tekrar bölünmüştür.

Simple Mean şöyle hesaplanır :

$$1595 \times \text{Antilog } \bar{M}_s$$

$\bar{M}_s$  , potens oranının, simple mean logaritması olup

$$\bar{M}_s = \frac{\Sigma M}{n} \quad \text{şeklinde verilmiştir.}$$

ve  $M$  = potens oranının logaritmasının ayrı ayrı hesabı

$n$  = tecrübelerin sayısı

Weighted Mean'in hesaplanması ise :

$$1595 \times \text{Antilog } \bar{M}_w$$

$\bar{M}_w$  , potens oranının weighted mean logaritması olup

$$\bar{M}_w = \frac{\Sigma WM}{\Sigma W} \quad \text{şeklinde verilmiştir.}$$

$M$  ve  $W$  nin mânaları yukarıdaki gibidir.

Bir  $\chi^2$  testi muayyen cihazlardan biraraya gruplanmış sonuçların, meselâ lâboratuvar A'da *Sarcina lutea*'nın kullanıldığı bütün neticelerin, homojenliğini kontrol için tatbik edilmiştir.

$\chi^2$  in takribi değeri Humphrey'in formülü<sup>1</sup> kullanılarak elde edilmiştir.

$$\chi^2 = \Sigma W (M - \bar{M}_w)^2$$

Homojen olan neticelerin ihtimali sonradan tablolara<sup>2</sup> müracaat edilerek tâyin olunur.

*Sarcina lutea* için lâboratuvar A'da elde edilen dört netice  $\chi^2 = 3,423$  rakamını verir. Tablonun gösterdiğine göre, serbestlik derecesi üç için,  $\chi^2$  in bu değeri 0,5 ve 0,3 arasındaki ihtimâle teka-bül eder. Böylece heterojen olduğuna dair bir delil yoktur.

Humphrey' mühim heterojenlik olduğu hâllerde bir düzeltme iş-lemi kullanmıştır ve heterojenliğin ayrı ayrı tahmini weight'lerinin

fazla takdirinden ileri geldiğine inanılmıştır. «Weight»'leri bir «heterojenlik faktörü» ne böler.

$$\frac{x^2}{d.f.} = H$$

Heterojenlik, ihtimaliyet olarak ifâde edilen izâfi bir terim olduğu için, bazı hâllerde P'nin değeri «mühim heterojenlik» e delâlet etmediği hâlde, bu heterojenlik faktörünü sonuçların bütün gruplarına tatbik etmenin tesirini incelemek makûl görünür.

Tablo 4,  $x^2$  testlerinin sonuçlarını ve heterojenlik faktörü, H vasıtası ile weight'lerin sonraki tashihlerini özetler. Bu tablodan görülür ki, faktör, weight'lerin fazla takdirini azaltmakla kalmaz, fakat onların noksan takdirini de çoğaltır.

Tablo 5, dört lâboratuvar için simple, weighted ve corrected weighted mean'leri özetler. Kullanılan düzeltilmiş weight'ler dördüncü tablonun yedinci sütununda gösterilenlerdir.

#### Münakaşalar :

Tabii gruplar içinde sonuçların heterojenliği,  $x^2$  testinin verdiği sıra ile, 0,1 ilâ 0,05 ve 0,05 ilâ 0,02 arasında değişen, P için yalnız C ve D lâboratuvarlarında Sarcina lutea ile tâyin yapılan hâllerde, gösterilmiştir. Bu gruplar için weighted mean potensleri 1606,2 u./mg. ve 1629,3 u./mg. dır ve teorik değeri olan 1597,8 u./mg. dan sıra ile % 0,5 ve % 2 nisbetinde yüksektir.

P'nin bu değerleri mühim heterojenliği fazlasıyla ifâde etmediği hâlde, heterojenlik faktörünün kullanılması, netice olarak makûl bir hareket görünür.

Tercih edilen mean value, corrected weighted mean'dir.

1595,3 u. mg.

Hatâ sınırları :

P = 0,95                      1587,2 ilâ 1603,8

   % 99,5 ilâ % 100,5



Sonuç :

İlk Türk Millî Penisilin Referans Standardına 1595 u./mg. potensin tâyin edilmesi teklif olunur.

**Özet :**

Güvenilir, potensi belli kâfi miktarda antibiyotik standardlarına olan ihtiyacı karşılamak gayesiyle geniş çapta kullanılan antibiyotikler için Türk Millî Standardlarının kurulması teklif edilmiştir.

İmalâtçılarla beraber çalışma esnasında, ilk olarak bir penisilin standardının tesisi ile işe başlamak uygun görülmüştür. İmalâtçılardan biri tarafından 1,6 Kg. üstün kaliteli potasyum penisilin tedarik edilmiştir ve diğer bir imalâtçı tarafından şişelerde ambalajlanmıştır. Bunlar asgarî vakit kaybıyla 10°C'in altında muhafaza edilen odalara nakledilmiştir. Teklif edilen standardın numuneleri enternasyonal standardın ampulleri ile birlikte bu dört lâboratuvara dağıtılmıştır.

Bu dört lâboratuvarda toplam olarak 32 tâyin yapılmıştır. Bu tâyinlerin hepsi agar difüzyon metodu ile dir. 17 tâyindeki test organizması *Sarcina lutea* ve 15 tâyindeki test organizması *Micrococcus pyogenes* (var. aureus) dur.

Sonuçlar istatistik hesaplarla değerlendirilmiştir. C ve D lâboratuarlarının her ikisinde test organizması olarak kullanılan *Sarcina lutea* ile elde edilen sonuçlar arasında bazı heterojenlik görülmüştür.

Humphrey tarafından tarif edilen metod kullanılarak bunun için bir düzeltme yapılmıştır.

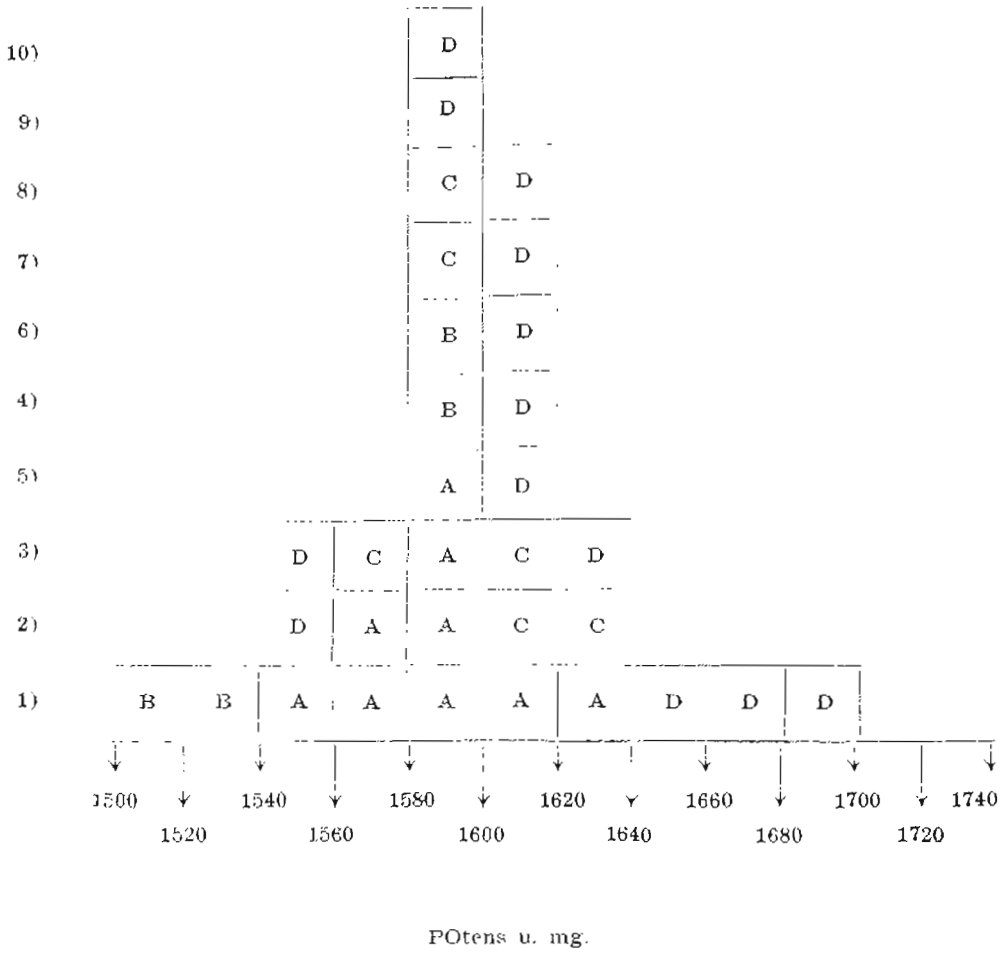
Bütün sonuçlardan aşağıdaki ortalar hesaplanmıştır :

Simple Mean	1596,6 u./mg.
Weighted Mean	1601,0 u./mg.
Corrected Weighted Mean	1595,3 u./mg.

Tercih edilen değer corrected weighted mean'dir. Bunun hatâ sınırları ( $P = 0,95$ ) 1587,2 ilâ 1603,8 arasındadır.

Potensi 1595 u./mg. olarak tâyin edilmiştir.

### Sekil 1



Tablo 1

Test	Organizma	Potens u./mg.	Sınırlar (P = 0,95)	Weight	
A	1	Sarcina	1576	1516 ilâ 1639	14.800
	2		1582	1521 > 1645	14.700
	3	Lutea	1558	1516 > 1602	30.000
	4	ATCC 9341	1614	1569 > 1659	28.000
	5	Micrococcus	1582	1522 > 1646	15.000
	6	pyogenes	1570	1519 < 1623	20.600
	7	(var. aureus)	1595	1548 < 1643	24.600
	8		1620	1578 > 1664	31.900
	9	ATCC 6538 - P	1595	1533 > 1659	14.600
B	1	Sarcina	1580	1463 > 1706	3.800
	2		1583	1463 > 1713	3.600
	3	lutea	1517	1432 > 1606	6.600
	4	ATCC 9341	1536	1447 > 1631	6.100
C	1	Sarcina	1622	1589 > 1657	51.200
	2	lutea	1570	1532 > 1609	34.100
	3	ATCC 9341	1619	1580 > 1658	39.100
	4	Micrococcus	1584	1552 > 1617	55.800
	5	Pyogenes	1598	1553 > 1644	27.900
	6	(var. aureus) ATCC 6538 - P	1604	1580 > 1630	90.900
D	1		1628	1569 > 1690	15.800
	2	Sarcina	1694	1638 > 1752	19.200
	3		1649	1600 > 1699	24.600
	4	lutea	1613	1541 > 1689	10.700
	5	ATCC 9341	1586	1531 > 1643	17.700
	6		1554	1481 > 1630	9.500
	7	Micrococcus	1616	1557 > 1677	16.200
	8		1675	1594 > 1762	8.800
	9	pyogenes	1591	1533 > 1651	16.100
	10		1606	1548 > 1668	15.800
	11	(var. aurus)	1607	1533 > 1684	10.100
	12		1619	1527 > 1716	6.400
	13	ATCC 6538 - P	1548	1456 > 1646	7.400

ATCC: Amerikan tip kültür koleksiyonu.

**Tablo 2**

Test Organizması	Test-lerin Adedi	Simple Mean	Weighted Mean	Fiducial Limits (P = 0,95)	Weight
Sarcina lutea	17	1592,5	1603,1	1590,4 1615,7	329,746
Micrococcus pyogenes (var. aureus)	15	1601,1	1599,0	1587,2 1611,3	362,212
Bütün Testler Her İki Organizma	32	1596,6	1601,1	1592,3 1609,4	691,958

Potensler u. ing. olarak ifade edilmiştir.

Tablo 3

Laboratu- var	Test Organizması	Testle- rin Adedi	Simple Mean	Weigh- ted Mean	Simriar P = 0,95)	Weight
A	Sarcina lutea ATCC 9341	4	1582,4	1582,6	1558,3 1607,8	87.623
	Mic. pyogenes (var. aureus) ATCC 6538 - P	5	1592,6	1596,0	1573,9 1618,9	106.763
B	Sarcina lutea ATCC 9341	4	1553,5	1546,4	1497,7 1596,6	20.171
C	Sarcina lutea ATCC 9341	3	1603,8	1606,2	1585,7 1628,5	124.324
	Mic. pyogenes (var. aureus) ATCC 6538 - P	3	1595,0	1596,6	1579,2 1614,1	174.534
D	Sarcina lutea ATCC 9341	6	1620,0	1629,3	1606,2 1652,4	97.628
	Mic. pyogenes (var. aureus) ATCC 6538 - P	7	1609,7	1609,4	1583,2 1634,9	80.915
Bütün Labora- tuvarlar	Her İki Organizma	32	1596,6	1601,1	1592,3 1609,4	691.958

Tablo 4

Grup	Testle- rin Adedi	Total Weight	X'	P	H	Total Correc- ted Weight
Lab. A S. lutea	4	87.623	3.423	0,5 ilâ 0,3	1,141	76.785
Lab. A M. pyogenes	5	106.763	2.073	0,7 ilâ 0,5	0,668	159.825
Lab. B S. lutea	4	20.171	1.213	0,8 ilâ 0,7	0,404	49.928
Lab. C S. lutea	3	124.324	4.725	0,1 ilâ 0,05	2,368	52.502
Lab. C M. pyogenes	3	174.534	1.054	0,7 ilâ 0,5	0,527	331.184
Lab. D S. lutea	6	97.628	12.836	0,05 ilâ 0,02	2,567	38.032
Lab. D M. pyogenes	7	80.915	5.880	0,5 ilâ 0,3	0,980	82.566
Lab. A	9	194.386	6.702	0,7 ilâ 0,5		
Lab. B	4	20.171	1.213	0,8 ilâ 0,7		
Lab. C	6	298.858	6.328	0,3 ilâ 0,2		
Lab. D	13	178.543	20.045	0,1 ilâ 0,05		
S. lutea	17	329.746	34.733	0,01 ilâ 0,001		
M. Pyogenes	15	362.212	11.963	0,7 ilâ 0,5		
Bütün Testler	32	691.958	46.639	0,033		

Tablo 5

Labo- ruvar	Testle- rin Adedi	Simple Mean	Weigh- ted Mean	Fiducial Limits P = 0.95	Corr. Weighted Mean	Fiducial Limits
A	9	1588,1	1590,2	1574,1 1606,6	1591,8	1576,8 1606,6
B	4	1553,5	1546,4	1497,2 1596,6	1546,4	1514,6 1578,4
C	6	1599,1	1600,6	1587,2 1614,1	1598,2	1586,2 1609,4
D	13	1614,1	1619,7	1603,0 1636,5	1615,4	1594,2 1636,5
Hepsi	32	1596,6	1601,0	1592,3 1609,4	1595,3	1587,2 1604,6

### HESAPLAR ve NOTLAR

1 — Potens hesaplaması ve tek bir tecrübenin istatistik analizi :

Adapte edilen işlem esas olarak İnternasyonal Farmakopedeki işlemdir.

2 — «Weighted Mean Potency» nin hesaplanması :

$$\text{Log Weighted Mean} \quad M = \frac{\sum WM}{\sum W}$$

M	W	WM
— 0.0031	55.772	— 172.8930
+ 0.0009	27.911	+ 25.1199
+ 0.0024	90.851	+ 218.0424
	W = 174,534	ΣWM = 70.2691

$$M' = \frac{70.2691}{174,534} = 0.000403$$

$$\text{Antilog } 0.0004 = 1.001$$

$$\begin{aligned} \text{böylece «Weighted Mean Potency»} &= 1.001 \times 1595 \\ &= 1596.6 \end{aligned}$$

3 — Yukarıdaki potens için emniyet sınırları şu şekilde verilir.

$$\text{Antilog } \bar{M} \pm t \times S_m$$

$$S_m = \sqrt{\frac{1}{\Sigma W}}$$

$$\text{Böylece } S_m = \sqrt{\frac{1}{174534}} = 0.002395 \quad \text{ve}$$

$$\begin{aligned} \bar{M} \pm t \times S_m &= 0.000403 + 1.98 \times 0.002395 \\ &= -0.004339 \text{ dan } + 0.005145'e \\ &= -1.995661 \text{ dan } 0.005145'e \text{ kadardır.} \end{aligned}$$

Bunlara tekabül eden Antilogritmeler

0.9901 ve 1.012 dir. Bunlara tekabül eden emniyet sınırları ise,

1579.2 den 1614.1'e kadardır.

4 — Heterojenlik —  $\chi^2$  testi

Misal : D Lâboratuvarında yapılan Sarcina Lutea tecrübelerinin neticeleri. Bu grup için Log Potens'in weighted mean değeri  $M = + 0.0092$  dir.



	M	(M-M)	(M-M) <sup>2</sup> x 10 <sup>4</sup>	W	x <sup>2</sup> = W (M-M) <sup>2</sup>
D <sub>1</sub>	+ 0.0092	0.0000	0	15,835	0.000,000
D <sub>2</sub>	+ 0.0261	0.0169	28,561	19,220	5.488,424
D <sub>3</sub>	+ 0.0143	0.0051	2,601	24,468	0.641,094
D <sub>4</sub>	+ 0.0048	- 0.0044	1,936	10,749	0.208,101
D <sub>5</sub>	- 0.0025	- 0.0117	13,689	17,625	2.416,382
D <sub>6</sub>	- 0.0115	- 0.0207	42,849	9,524	4.080,939

= 12.835,940

x<sup>2</sup> tablosunda görülürkü 5 serbestlik derecesi (degrees of freedom) için P = 0.05 olduğu zaman,

x<sup>2</sup> = 11.07, P = 0.01 olduğu zaman x<sup>2</sup> = 15.09 dur.

x<sup>2</sup> için bulunan değer 12.836 olduğundan tekabül eden P değeri

0.01 ile 0.05 arasındadır. Bu heterojenlik delilidir.

#### 5 — Heterojenlik Faktörü «H»

$$H = \frac{x^2}{df.} \text{ şeklinde tarif edilir.}$$

Böylece lâboratuar D nin Sercina Lutea neticeleri için

$$H = \frac{12.836}{5} = 2.567 \text{ dir.}$$

Benzer şekilde lâboratuar D den gelen Micrococcus Pyogenes

$$\text{(var. aureus) neticeleri için } H = \frac{5.880}{6} = 0.980 \text{ dir.}$$

#### 6 — Düzeltilmiş «Weight» ler :

$$\text{Düzeltilmiş «Weight» } \frac{\text{«Weight»}}{H} \text{ olarak verilir.}$$

(\*) Kolaylık olsun diye 10' ile çarpıldı

Böylece Lab D nin Sercina Lutea neticeleri için

$$\text{düzeltilmiş «weight»} = \frac{97,628}{2,567} = 38,032$$

Micrococcus pyogenes (var aureus) için düzeltilmiş

$$\text{«weight»} = \frac{80,915}{0,980} = 82,566 \text{ dir.}$$

7 — Düzeltilmiş «Weighted Mean» (Lâboratuvar D) :

Düzeltilmiş Weighted  $\bar{M}$  ler

$$S. Lutea = + 0,009195$$

$$M — pyogenes (var aureus) = + 0,003758$$

Heterojenlik faktörü için düzeltilmiş yeni «weight» ler tatbik ederek

$$\begin{aligned} \bar{M} &= \frac{(0,009,195 \times 38,032) + (0,003,758 \times 82,566)}{38,032 + 82,566} \\ &= \frac{659,987,268}{120,598} = 0,005473 \end{aligned}$$

$$\text{Antilog } 0,005473 = 1,0128 = \text{Potens oranı}$$

$$\text{Potens} = 1,0128 \times 1595 = 1615,4 \text{ u. mg.}$$

Weight = 120,598 (Emniyet sınırlarının hesaplanması için kullanıldı)

Yazının hazırlanmasında yardımcı olan Ecz. Seğil Sade'ye teşekkürlerimizi sunarız.

# THE FIRST TURKISH NATIONAL STANDARD

## REFERENCE MATERIAL FOR PENICILLIN

William HEWITT\*      Meliha İNAK      Ütku ÖNAL      Cıku GÜNER

Reflk Saydam Central Institute of Hygiene  
Section of Drug Control -- Ankara

### Summary :

To meet the need for adequate quantities of antibiotic standards of reliably known potency, it was proposed that Turkish National Standards be established for the more widely used antibiotics.

In collaboration with manufacturers it was agreed to proceed first with the setting up of a Penicillin Standard. A selected batch of 1.6 Kg. of potassium penicillin was provided by one of the manufacturers and was packed into vials by another manufacturer. These were transferred with the minimum delay to a room kept below 10°C. Samples of the proposed standard together with ampoules of the International Standard were distributed to the four laboratories.

A total of 32 assays were carried out in the four laboratories. These assays were all by the agar diffusion method. *Sarcina lutea* was the test organism in 17 assays and *micrococcus pyogenes* (var. *aureus*) was the test organism in 15 assays.

Results have been evaluated statistically. Some heterogeneity is displayed between results obtained using *Sarcina lutea* as test organism in both laboratories C and D. A correction for this using the method described by Humphrey<sup>1</sup> has been made.

The following means were calculated from all results :

Simple Mean	1596.6	u./mg.
Weighted Mean	1601.0	u./mg.
Corrected Weighted Mean	1595.3	u./mg.

The preferred value is the corrected weighted mean. This has limits of error ( $P = 0.95$ ) 1587.2 to 1603.8 u. mg.

A potency of 1595 u./mg. has been assigned.

---

Adviser. Pharmaceutical Analysis, Reflk Saydam Central Institute of Hygiene, Ankara.

## L İ T E R A T Ü R

1. Humphrey, Mussett, Perry, The Second International Standart for Penicillin, W.H.O. B.S./170 18.IX.1952.
2. Fisher, Yates, Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research, 1953.

İştirak eden laboratuvarlar (alfabetik sıra ile):

Eczacıbaşı İlaçları Limited Şirketi, Levent, İstanbul.

Bay Ayhan Suskun, Dr. Celâl Karacebeyli.

Prifizer İlaçları A.Ş., Ortaköy, İstanbul.

Bay Nurettin Turan, Bn. Selma Erkan, Bn. Türkân Uş.

Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü, Ankara.

Bn. Ülkü Önal, Bn. Ülkü Güner.

E.R. Squibb and Sons İlaçları A.Ş., Levent, İstanbul.

Bn. Anna Nikoknoimidi, Bn. İclâl Yılmaz.

**O - ETHOXYBENZAMİD'in QUİNİN SULFAT, ACİDE  
-ASCORBİC ve ORPHENADRİNE HCl.  
KOMBİNASYONUNDA İNCE  
TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE  
İZOLESİ QUALİTATİF ve  
QUANTİTATİF TAYİNİ**

**Ecz. Mithat KİPER**

Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü  
İlaç Kontrol Şubesi Mütchassısı  
Ankara

Pharmasötik Şekli	:	Draje
Preparatın terkibi	:	
O - Ethoxybenzamid	:	200 mgr.
Quinin Sulfat	:	50 mgr.
Acide Ascorbic	:	25 mgr.
Orphenadrine HCl.	:	10 mgr.

Preparat üzerinde yapılan çalışmalar sonunda İnce tabaka kromatografisi metodu ile daha emin daha kati netice elde edilmiş ve ve bu Kombinasyon için bu metod tatbik edilmiştir.

Draje şeklindeki preparattan O - Ethoxybenzamid İnce tabaka kromatografisi ile diğer maddelerden tecrid edildikten sonra Spectrophotometre de uygun dalga uzunluğunda okunur. Madde 290 dalga uzunluğunda maximum ve 262.5 da minimum göstermiştir.

**A --- MATERYEL**

- 1 --- Uvanalys Cihazı
- 2 --- Desega Kavanoz (21 X 21 X 9)
- 3 --- Beckmann D.U. Spectrophotometre
- 4 --- 20 X 20 cm. Plâk (Kieselgel HF<sup>sm</sup> ile hazırlanmış T.  
Kalınlığı = 0,25 mm.)

## B — KİMYEVİ MADDE

- 1 — Aceton p.a. (E. Merck)
- 2 — Metanol p.a. (E. Merck)
- 3 — Ammoniak

C — YÜRÜTÜCÜ SOLVENT : Aceton + Metanol + Ammoniyak (90 + 10 + 1)

## METOD

Bir, drajeye takabül eden toz miktarı Quantitatif olarak (daha iyisi bir draje olarak iyice toz haline getirmek ve yıkıyarak Quantitatif olarak almak) 100 ml. lik bir balon joje'ye alınır, ve kuvvetle 15 dakika çalkalanır ve markasına tamamlanır. Sık bir filtre kâğıdından berrak şekilde süzülür. Daha evvel plâkta işaret edilmiş yerlere hassas olarak iki defa 0.1 rer ml. nümüne solüsyonu ve yine iki ayrı bölmeye 0.1 rer ml. olmak üzere standart terkip solüsyonları dikkatle muntazam ince bir band şeklinde damlatılır. Solvent yürüme çizgisine geldiği zaman plâk çıkarılır. (Yürüme mesafesi 14 cm.) kurutulur. Uvanalys cihazında kısa dalga da tetkik edilir.

Burada 4 leke görülür. (Orphenadrine HCl. çok hafif bir leke halinde görülür, ancak 40 gama olacak şekilde tatbik edilirse leke bariz olarak görünür.) Bunlar yukarıdan aşağı sıra ile, O - Ethoxybenzamid (RF = 0.84-, Orphenadrine HCl. (RF = 60), Quinin Sulfat (mavi flöresans gösterir) (RF = 0,27) ve Acid Ascorbic (RF = 0) dir.

Buradan O - Ethoxybenzamid lekesinin hudutları tesbit edilir. Eşit miktarda iki nümüne ve standard Quantitatif olarak bir spatül ve samur fırça yırdımıyla 50 şer ml. lik balon joje'ye kazanır ve metanolla markasına tamamlanır. Kuvvetle çalkalanır, Whatmann 2 filtre'den berrak şekilde sürülür ve Backmann da 290 dalga da okunur.

## LİTERATÜR

- 1 -- Ganshirt, H., Untersuchung zur quantitativen der Dünnschichtchromatographie, Arch. Pharm. 296. 129 - 134
- 2 -- Stahl, 1937 E. Dünnschicht Chromatographie (Springer verlag)

# TWEEN HİDROLİZ VE TWEEN OPASİTE REAKSİYONLARININ MİKOBAKTERİLERİN İDANTİFİKASYON VE KLASİFİKASYONUNDAKİ DEĞERİ

Bakt. Nezihe ATAY

Dr. Aral GÜRSEL

Retik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü  
Tüberküloz Referans ve Araştırma Şubesi

Yavaş çoğalmaları ve bunları karakterize eden birçok metodların kompleks oluşu, klinik laboratuvarların mikobakteri idantifikasyon ve klasifikasyonu problemini imkânsız kılmaktadır (9). Aynı mikobakterilerin kimyasal maddelere karşı olan tesir ve tepkilerinin tetkiki için, araştırmacılar sulu besi yerlerine değişik konsantrasyonlarda çeşitli kimyasal maddeler ilâvesile, az da olsa, bazı araştırmalar yapmışlardır (1, 10). Hedgecock (8) muayyen mikobakterilerin sentetik besi yerlerinde üremeye (çoğalmaya) başlayabilmeleri için Tween 80 veya Oleik asid'e ihtiyaç gösterdiklerini bildirmektedir. Andrejew ve arkadaşları (1) da muhtelif mikobakterilerin lipazik aktiviteleri üzerinde çalışmalar yaparak, bunları bu aktivitelerine göre iki büyük gruba ayırmışlardır :

- 1 — Zayıf veya sıfır lipazik aktiviteli mikobakteriler,
- 2 — Kuvvetli lipazik aktivite gösteren mikobakteriler.

Gaudier ve arkadaşları (3) ise Tween hidroliz reaksiyonu kuvvetli pozitif olan *Myc. phlei* ve *Myc. kansasii* ile çok az aktiviteye sahip olan veya hiç olmayan suşları birbirlerinden ayırdığını bildirmişlerdir. Bu gün için, mikobakterilerin lipazik aktiviteleri sahasında yapılmış etüdüler hemen hemen yok denecek kadar azdır. Onlar da ancak Tweenler gibi (C<sub>12</sub> — C<sub>18</sub>) uzun zencirli ağır asitler sahasındadır. Gaudier ve arkadaşları (3) na göre Tween 80 ile Oleik asidinin sulu besi yerleri üzerinde birbirine olan tesirleri mikobakterileri ka-

rakterize edebilecek çeşitli reaksiyonların esasını teşkil etmektedir. Davis ve Dubos (2) Myc. phlei kültür filtratlarındaki Tween 80 den yağ asitleri serbest hale geçerek basit bir lipaz husule gelebileceğini ispat etmişlerdir. Yine aynı müellifler Myc phlei kültür filtratlarının tween 80 hidrolizi vasıtası ile oleik asit teşkil ettiğini de bildirmişlerdir.

Çalışmamızın gayesi muhtelif mikobakterilerin Tween 80 i hidroliz ve opasite (bulandırma) kabiliyetlerine dayanarak ve icabında diğer reaksiyonlarla birlikte mikobakterilerin idantifikasyon ve klasifikasyonu için birer yardımcı reaksiyon olabileceklerini göstermektedir.

### **M a t e r i y e l   v e   m e t o d :**

Çalışmalarımızda 28 adet standart suş ile birlikte memleketin çeşitli bölgelerinde bulunan laboratuvarlardan ileri tetkikler için gelen ve durumları aşağıda açıklanmış 75 adet çeşitli mikobakteri suşu, ki cem'an 103 adet suş tetkik edilmiştir. Çeşitli bölge ve laboratuvarlardan ileri tetkik ve idantifikasyon için gelerek çalışmalarımıza dahil ettiğimiz 75 adet suş'un nikotinic asit teşekkül etme ve nitratları redukleme kabiliyetlerine göre 4 ayrı gruba ayırmış bulunuyoruz :

- Gr. I — 19 adet suş-Niacin ve Nitrat reduktaz menfi  
Gr. II. — 40 » » » müsbet nitrat reduktaz müspet  
Gr. III — 3 » » » müspet nitrat reduktaz menfi ve  
Gr. IV — 13 » » » menfi, nitrat reduktaz müsbet,

Standart suşlarımız ise 3 adet H<sup>v</sup> Rv, 2 adet H<sup>v</sup> Ra, 5 adet Myc. bcvis, 3 adet Myc. kansasii, 2 adet Myc. avium, 4 adet Myc. fortuitum, 4 adet Myc. smegmatis, 2 adet Myc. phlei, 2 adet Myc. scrofulaceum ve 1 adet Myc. rhodocrous'tan ibarettir. Bu standartları bize göndermek lütfunda bulunan Lausanne suş koleksiyon laboratuvarı, Paris Pasteur Enstitüsü, Borstel Tüberküloz Araştırma Enstitüsü ile Kopenhagen Tüberküloz Araştırma laboratuvarlarına burada teşekkür etmeyi bir borç biliriz.

### **K u l l a n ı l a n   m e t o d l a r :**

a) — Tween hidrolizi reaksiyonu (9, 10). — Reaksiyonda kullanılan tampon solüsyonlarının hazırlanması : M/15 ve pH 7 Sörensen



tanıpon solüsyonundan 100 cc alınarak, üzerine 0,5 cc Tween 80 ve 2 cc — beher cc sinde 1 mg. nötral red (kırmızısı) bulunan stok solüsyondan ilâve edilir. Hazırlanan karışım 4. er cc olarak deney tüplerine taksim edilir ve 120 derecede 15 dakika sterilize edilir.

**E k i m l e r :** Löwenstein Jensen besi yeri üzerindeki 4 haftalık kültürlerden 3 mm çaplık bir öze dolusu bakteri alınır ve hazırlanan vasat (tampon solüsyonu) içerisinde ezilir. Her suştan 2 tüp ekilerek 37 derecelik etiüde inkübe edilir. Kontrol olarak ekilmemiş bir vasat tüpü kullanılır. Bu sonuncu tüp amber (kehlibar) renginde bir solüsyondur. Etiüve konan tüpler 3 hafta müddetle her gün kontrol edilir ve amber renkten pembe renge dönüşme için geçen zaman kaydedilir. Preparasyonda oleik asidin teşekkülü kırmızı - pembe bir rengin görülmesi ile meydana çıkar. Bu da pozitif bir reaksiyon olarak kabul edilir. Bu hususiyet Tween 80 in mikobakteriler tarafından indirgenmesi deneylerinde esas olarak alınır (10).

b) — **Tween 80 opasite (bulanıklığı) reaksiyonu (9) :** — Bazı mikobakterilerin Tween 80 üzerine olan tesiri, agarda kesin bir opasite (bulanıklık) halkasının meydana gelmesine sebep olur. Bu hadisenin sıklığını tespit için Wayne ve arkadaşları (10) bir seri araştırmalar yapmışlardır. Bu araştırmalara göre Ana Dubos besi yeri (9, 10) hazırlandıktan sonra, esas reaksiyonda kullanılacak olan kısma % 2,5 ve kontrol olarak kullanılacak kısma da % 0,02 nispetinde Tween ilâve edilir. Ayrıca % 2 hesabına agar ilâve edilerek besi yeri 120 derecede 15 dakika müddetle sterilize edilir. Diğer taraftan da Oleik asit kompleksi hazırlanarak (4) steril olarak hazırlanmış bulunan besi yeri üzerine ilâve edilir. Bu şekilde tamamlanan besi yeri steril şartlarda tüplere 5 er cc olarak tevzi edildikten sonra dik olarak sertleşmeye terk olunur.

% 2,5 Tween 80 ihtiva eden besi yerinde opasitenin görülmesinden önce, sathın hemen altında hafif bir matlık görülmektedir.

**E k i m l e r :** Löwenstein Jensen besi yeri üzerinde iyi gelişmiş 4 haftalık mikobakteri kültürlerinden cc sinde 1 mg. basil bulunacak şekilde hazırlanan bakteri süspansyonlarından 0.1 cc lik miktarlar kontrol ve esas reaksiyon tüplerinin sathlarına ekilerek 37 derece C. üretilir. Tüpler yüzeyin altındaki opasite halkasının görünüşünü kontrol için 6. cı hafta sonuna kadar her hafta bir defa olmak üzere muayene edilir. Üreme kontrol tüpleri ile mukayese edilerek müspetlik +, ++, +++ olarak değerlendirilir.

Materiyel kısmında belirtmiş olduğumuz 103 adet suşumuzu her iki reaksiyonla paralel olarak deneyerek, aşağılarda belirtilen bulgular elde edilmiştir.

### B u l g u l a r ı m ı z

Çabgularımızda standart olarak kullanmış olduğumuz 28 adet suşumuzla birlikte 103 adet muhtelif gruplara ait mikobakterilerin Tween 80 hidrolizi ve Tween 80 opasite testleri yapılmış ve sonuçlara göre gerekli ayrılmaların yapılmasına çalışılmıştır.

Tablo 1 de gösterilmiş bulunan bütün bu suşlardan, bir taraftan Tween hidrolizi reaksiyonları yapılarak lipasik aktivitelere göre, diğer taraftan da aynı suşlar üzerinde Tween opasite reaksiyonları ile gerekli sınıflandırılmalara çalışılmıştır.

Materiyel ve metod bölümünde bildirmiş olduğumuz bakteri gruplarının I. ci sini teşkil eden Nikotinik asit ve Nitrat redüktaz reaksiyonları menfi olan 24 adet suşumuzdan (5 adedi standart suş) sınıflandırılması icab eden 19 suşumuzun ancak 1 tanesi hakiki tüberküloz mikobakterileri sınıfına dahil edilebilip, geri kalan 18 adet suşumuz Tween 80 ni çeşitli zaman ve derecelerde hidrolize ettiklerinden hakiki tüberküloz mikobakterilerinden ayrılmakta ve atipik denilen mikobakteriler sınıfına girmektedir. Bu 18 adet suştan 5 adedi Tween opasite reaksiyonlarına göre (opasite halkasını teşkil etmemeleri) Myc. kansasii gibi görünüyorsa da nitratları redüklenmiş olmaları icab ederken bizim suşlarımızda bu redüksiyon husule gelmemiştir. 13 adet suşumuz ise gerek Tween hidroliz ve gerekse Tween opasite reaksiyonlarına göre atipik denilecek mikobakterilerin IV. ü grubu olan çabuk üreyenler (Rapid grower) grubuna girebilirler. Bu da, aynı Myc. kansasii grubuna girenlerde olduğu gibi nitratları redükleyememeleri tam identifikasyonlarının yapılmasına mani olmaktadır. Muhakkak olan birşey varsa o da şudur ki Tween 80 opasite reaksiyonları hakiki tüberküloz mikobakterileri ile Atipik ve Saprofitleri birbirinden kolaylıkla ayırabilmektedir. Zira, hakiki tüberküloz mikobakterilerinde gerek Tween hidroliz ve gerekse Tween opasite reaksiyonları menfi iken, atipik ve saprofitlerde bu reaksiyonların ya her ikisi birden veyahutta hiç olmazsa bir tanesi müspet reaksiyon vermektedir. Bu husus tartışma bahsinde daha detaylı olarak ele alınacaktır. ,

İkinci grubumuzu teşkil eden 45 adet Nikotinik asit ve Nitrat redüktaz reaksiyonları müspet suşumuza gelince, 15 adedi

standart) sınıflandırılması icab eden 40 adet suştan 35 adedi gerek Tween hidroliz, gerekse Tween opasite reaksiyonları mevzuunumuz dışı Nikotinik asit ile Nitrat redüktaz reaksiyonlarına göre hakiki tüberküloz mikobakterisi sınıfına girmekte ve malûm nikotinik asit ve nitrat redüktaz reaksiyonlarına göre de hepsi de birer Myc. tuberculosis typus humanustur.

**Tablo 1 — Tetkik edilen suşlar ve sonuçları**

Tetkik edilen suşlar. Souches étudiées		Adet Nom- bre	Tween 80 hidroliz Hydrolyse du Tween 80			Tween 80 opasite Reaction d'opaci- té du Tween 80		
Suşların bazı biyokimik ka- rakter ve adları. Les noms et certains ca- ractères biochimiques des s. souches			48 saat he- res	5 gün Jours	10 gün Jours	1.ci hafta Sem.	2-4.cü hafta Sem.	5-6.cü hafta Sem.
<b>Standart suşlar</b>								
	H <sub>37</sub> Rv	3	—	—	±	—	—	±
	H <sub>37</sub> Ra	2	—	—	—	—	—	—
	Myc. bovis	5	—	—	—	—	—	—
	Myc. avium	2	—	—	—	—	—	+
	Myc. scrofulaceum	2	—	—	—	—	±	+
	Myc. kansasii	3	+	+	+	—	—	—
	Myc. rhodocrous	1	+	+	+	—	—	+
	Myc. fortuitum	4	±	+	+	+	+	+
	Myc. smegmatis	4	±	+	+	+	+	+
	Myc. phlei	2	±	+	+	+	+	+
<b>Tetik için gelen suşlar</b>								
Gr. I	Niacin —, Nitrat —,	13	+	+	+	+	+	+
	» , » ,	5	+	+	+	—	—	—
	» , » ,	1	—	—	—	—	—	—
Gr. II	Niacin +, Nitrat +,	35	—	—	—	—	—	—
	» , » ,	4	+	+	+	—	—	—
	» , » ,	1	—	+	+	+	+	+
Gr. III	Niacin +, Nitrat —,	1	—	—	—	+	+	+
	» , » ,	2	—	+	+	+	+	+
Gr. IV	Niacin —, Nitrat +,	5	—	—	—	—	—	—
	» , » ,	3	±	+	+	—	—	—
	» , » ,	5	+	+	+	+	+	+

Geri kalan 5 adet suşumuz ise Tween hidrolizi ve opasite reaksiyonlarına göre atipik veya saprofit sınıflarına girmekte ve bunlardan 4 adedi *Myc. kansasii* veya *Myc. rhodocrous* olabilirler isede nikotinik asit teşkil etmemeleri ile bunlardan biraz ayrılmaktadırlar. 1 adedi ise *Myc. fortuitum*, *Myc. smegmatis* veya bunlardan bir tanesi olabilir.

Üçüncü grubumuzu teşkil eden nikotinik asit müspet fakat nitrat redüktaz reaksiyonları menfi olan 5 suşumuzdan 2 si standart olup sınıflandırmak zaruretinde bulunduğumuz 3 adet suşumuz vardır. Bunlardan 1 tanesi Tween opasite reaksiyonlarına göre *Myc. scrofulaceum*, 2 tanesi de *Myc. Battey* (*avium* like) grubuna girmekte olup, bunlardan ancak nikotinik asit reaksiyonlarına göre uzaklaşmaktadır.

En mühimmi ise IV. cü grubunuzu teşkil eden 29 adet nikotinik asit menfi, nitrat redüktaz müspet suşlarımızdır. Bu grup Kono ve Virtanen reaksiyonlarına göre tamamen atipik mikobakteri grubunu teşkil etmekte isede, bu grupta kullanmış olduğumuz 14 adet standart suşa (*Myc. Battey avium*, *Myc. kansasii*, *Myc. rhodocrous*, *Myc. fortuitum*, *Myc. smegmatis* ve *Myc. phlei*) mukabil 13 adet suşumuz incelemeye tabi tutulmuştur. Tween hidroliz ve opasite reaksiyonlarına göre bunların 5 adedi hakiki tüberküloz mikobakterisi grubuna girip, geri kalanlardan 3 adedi bütün reaksiyonlarına göre *Myc. kansasii*, 5 adedi ise tanı idantifikasyonları için başka reaksiyonlara da ihtiyaç gösteren *Myc. fortuitum*, *Myc. smegmatis* veya *Myc. phlei* olabilirler.

Euna göre ileri tetkik ve idantifikasyon için laboratuvarlarımıza gelen ve Tween hidroliz ile Tween opasite reaksiyonlarına göre idantifikasyon ve klasifikasyonlarına çalışılmış bulunan 75 adet mikobakteri suşundan : —

I. ci grubumuzu teşkil eden 19 adet mikobakteri suşundan 1 adedi hakiki tüberküloz mikobakterisi olup, geri kalanların 5 adedi atipik denilen mikobakterilerin 1. ci grubunu teşkil eden fotokromojenlerden *Myc. kansasii*, 13 adedi de atipiklerin IV. cü grubunu teşkil eden çabuk üreyenler (*rapid grower*) olarak,

II. ci grubumuza giren 40 suştan 35 adedi hakiki tüberküloz mikobakterisi olup, geri kalanlardan 4 adedi yine atipiklerin 1. ci grubu olan fotokromojenlerden *Myc. kansasii*, 1 adedi de IV. cü grup atipiklerden *Myc. rhodocrous* olabilir.

III. cü grubu teşkil eden 3 suşumuzdan 1 tanesi II. ci grup atipiklerden (skotokromojen) *Myc. scrofulaceum*, 2 tanesi de III. cü grup atipiklerden *Myc. Battey* (avium like) olabilirler.

IV. cü grubumuzu teşkil eden 13 adet suşumuzdan 5 adedi hakiki tüberküloz mikobakterisi olup, geri kalanlardan 3 adedi atipiklerin 1. ci grubundan *Myc. kansasii*, diğerleri de atipiklerin IV. cü grubunu teşkil eden çabuk üreyenler (rapid grower) olabilirler.

Böylece bölge ve hastane laboratuvarlarında klasifiye edilememiş bulunan 75 adet mikobakteri suşundan 41 adedi hakiki tüberküloz mikobakterisi olarak idantifiye olunabilmekte, geri kalan 34 adedi ise atipik ve saprofitler sınıfına girmektedir. Bunların birçoklarının tam idantifikasyonları için tamamlayıcı biyokimik reaksiyonlara baş vurma zarureti vardır.

### T a r t ı Ő m a :

Enterobakteriyaseler gibi sayıları gittikçe artan mikobakterilerin tam idantifikasyon ve klasifikasyonu ile tedavinin yapılabilmesi de gündən güne güçleşmekte ve klinikle laboratuvarın arasını açacak gibi görünmektedir. Bir zamanlar klinikçiler bir hastaya tüberküloz dur diyebilmek için yalnız AAR (asit ve alkoole rezistan) basillerin tespitini kâfi görürken, daha sonraları da teyid için bulunan basillerin üretilmesile yetinmişlerdir. Çeşitli majör ve minör denilen kemoterapötik ve hususile antibiyotiklerin gelişmesile tam bir tedavi yapmak için bu antitüberkülostatik ilâçlara karşı mukavemet tayinini de laboratuvarlardan istemeye başlamışlardır. Rezistans tayini de, yeni yeni problemlere yol açmıştır. Klinikçiye göre çok kerre şu veya bu ilâca rezistandır denilen bir suş'un o ilâcu kullanılması ile hastanın istifade edemediğini bildirmesi üzerine, laboratuvarların bütün çaba ve işleni tekrarlamalarına rağmen sonuçlar aynı kalmakta, klinik ise laboratuvar bulgularından istifade edememektedir. Bu durum karşısında laboratuvar çalışmalarını derinleştirmeye ve hastalık anili olarak kabul edilen mikobakterinin tam idantifikasyonu lüzumu üzerinde ittifak edilmektedir. Tam bir idantifikasyon ise, bundan evvelki yazılarımızda (5, 6, 7) da bildirmiş olduğumuz gibi çak güç ve bazen de imkânsız olmaktadır (9). Mikobakterilerin idantifikasyon ve klasifikasyon serisi yazılarımızdan bir tanesini teşkil eden ve bu yazımıza konu olan mikobakterilerin lipazik aktiviteleri -

en az tetkik edilmiş mevzulardan bir tanesi olmasına rağmen, bizlere, sonuç bahsinde bildireceğimiz veçhile, tek başına olmamakla beraber, hakiki tüberküloz mikobakterileri ile hakiki olmayanlarını birbirilerinden ayırmaya mükemmelen yaramaktadır.

### Ö z e t :

Bizlerle yardımlaşma yapan laboratuvarlarımızdaki incelemelerle idantifiye edilemiyerek, tam bir idanifikasyon için laboratuvarlarımıza gönderilmiş bulunan toplam olarak 7 5 adet suş üzerinde denen Tween 80 hidrolizi ve Tween 80 opasite reaksiyonları, tek başlarına büyük birer mana ifade etmeyip , Konno'nun nikotinic asit ve Virtannen'in nitrat reduktaz reaksiyonları ile birlikte kullanıldıklarında mikobakteriler evvelâ

1 — Zayıf veya sıfır lipazik aktiviteli mikobakteriler,

2 — Kuvvetli lipazik aktivite gösteren mikobakteriler diye iki büyük gruba ayrılmaktadır. Bu reaksiyonlar dış laboratuvarlarda idantifiye edilememiş bulunan 75 adet suşumuzun aşağıdaki şekilde idantifikasyon ve klasifikasyonuna da imkân vermektedir.

41 adedi Konno ve Virtannen reaksiyonları da dikkate alınarak hakiki tüberküloz mikobakterisi olarak idantifiye olunabilmekte (bak-tekst içerisindeki tabloya), geri kalan 34 adedi ise atipik ve saprofitler sınıflarına girmekte ve şöylece gruplandırılabilir:

12 adedi 1. ci grupfotokromojenlerden Myc. kansasii,

1 » 2. ci grup olan skotokromojenlerden Myc. scrofulaceum

2 » 3. cii gruptan Myc. battey (avium benzeri) ve

19 » 4. cü grup olan çabuk üreyen (rapid grower) lenden olabilirlerse de, tam idantifikasyonları için tamamlayıcı başka biolojik ve bişimik reaksiyonlara muiracaat edilmesi zarureti vardır.

# LE RÔLE DANS L'IDENTIFICATION ET CLASSIFICATION DES MYCOBACTÉRIES DES TESTS DE L'HYDROLYSE ET DE L'OPACITÉ DU TWEEN 80

Bakt. Nezihe ATAY

Dr. Aral GÜRSEL

Institut Central d'Hygiène Refik Saydam

Ayant en vue que le service de recherches antituberculeuses de l'Institut Central d'Hygiène, joue en même temps le rôle de laboratoire de référence nationale pour les mycobactéries dans le pays,

Nous avons eu l'occasion à faire des recherches sur l'identification et la classification des mycobactéries isolées dans divers cotés du pays (4, 5, 6, 7) et à prouver cette fois-ci le rôle de l'Hydrolyse et celui de l'opacité du Tween 80 dans cette classification. Nos essais sont faits sur 28 différentes souches standards et 75 souches des mycobactéries arrivées, comme inclassifiables, des autres laboratoires se trouvant dans diverses cotés du pays.

Avant commencer les travaux, nos souches à étudier ont été groupées d'après leurs réactions de Konno et celui de Virtanen en 4 groupe (voir le tableau du text turque) :

Groupe 1 — 19 souches Niacin 0 et nitrate reductase 0							
»	2 — 40	»	»	+ et	»	»	+
»	3 — 3	»	»	+ et	»	»	0
»	4 — 13	»	»	0 et	»	»	+

et les réactions d'hydrolyse et de l'opacité du Tween 80 exécuté à ces souches nous ont données les résultats qui sont montré dans le tableau du texte turque. Premièrement on voit clairement que les souches des mycobactéries d'après leurs actions sur le Tween peuvent être divisées en deux grandes groupes :

- 1 — Les mycobactériés à une activité lipasique faible ou nul.
- 2 — Les mycobactéries ayant un fort activité lipasique et hydrolysant fortement le Tween 80, fait observé par Andra-jew et ses coll. (1) aussi.

Avec l'aide des réactions de Konno et celui de Virtanen, les résultats de ces dernières réactions d'hydrolyse et celui de l'opacité du Tween 80, nous permettent la calssification de nos 75 souches regroupées comme inclassifiables, comme suit :

41 de ces 75 souches sont des souches de vrais mycobactéries tuberculeuses (voir le tableau) et les 34 autres sont des souches des mycobactéries atypiques et saprophytes pouvant être groupé comme suit :

12 souches -- Groupe I (Rounyon) Myc. kansasii

1 » — » II ( » ) Myc. scrofulaceum

2 » — » III ( » ) Myc. battey (avium like)

19 » — » IV ( » ) des mycobactéries atypiques

ou saprophytes inclassifiables par ces réactions. Pour une identification exacte de ces souches on a besoin à recourir à d'autres réactions biologiques et biochimiques.

#### L I T E R A T Ü R

- 1 -- Andrejew, A., Gernez - Rieux, Ch., Tacquet, A., 1960. Activité lipasique des Bacilles Tuberculeux et des Mycobactéries atypiques, Ann. Inst. Pasteur, 99, 56 - 68.
- 2 -- Davis, B.D., Dubos, R.J., 1948, The Inhibitory effect of Lipase on bacterial growth in media containing fatty acid esters, J. Bact., 55, 11 - 23.
- 3 -- Gaudier, B., Gervois, M., Michel, R., 1967, Etude des mycobactéries provenant d'adenites suppurées après vaccination BGG., Ann. Inst. Pasteur Lille, 18, 10 - 119
- 4 -- Gürsel, A., 1954, Tüberkülozda bakteriyolojik teğhls, Türk Hlj. Tec. Biyol. Derg., 14, 320
- 5 -- Gürsel, A., Gürdağ, G., 1968, Mikobakterilerin İdentifikasyon ve klasifikasyonu üzerinde araştırmalarımız. I. Nitrat ve Nitrit redüksiyonunun İdentifikasyon ve klasifikasyondaki değeri, Tüberküloz ve Toraks, 16, 411
- 6 -- Gürdağ, G., Gürsel, A., 1968, Mikobakterilerin İdentifikasyon ve klasifikasyonu üzerinde araştırmalar. II - Mikobakterilerde anızmatık yolla muhtelif amıdlerin dekompozisyonu ve bunun klasifikasyonundaki yerı, Tüberküloz ve Toraks, 16, 331
- 7 -- Gürsel, A., Gürdağ, G., 1968, Atıplık mikobakterilerin tüberkülostatiklere karşı rezistans dururuları ile antıbiyogramların tip tayınlında değeri, Tüberküloz ve Toraks, 16, 223
- 8 -- Hedgecock, L.W., 1962, A requirement of Oleic Acid for growth of certain unclassified Mycobacteria, Amer. Rev. Resp. Dis., 85, 285.
- 9 -- Wayne, L.G., 1962, Differentiation of Mycobacteria by their effect on Tween 80. Amer. Rev. Resp. Dis., 86, 579 - 581  
Amer. Rev. Resp. Dis., 90, 588 - 597.
- 10 -- Wayne, L.G., Doubek, J.R., Russel, R.L., 1964, Classification and Identification of Mycobacteria, 1. Tests employing Tween 80 as substrate, Am. Rev. Resp. Dis. 90, 588 - 597.



**REFİK SAYDAM**  
**MERKEZ HIFZISSİHHA ENSTİTÜSÜ**  
**BIYOLOJİK MADDELER KONTROL LABORATUVARININ**  
**10 YILLIK ÇALIŞMALARI**

**Dr. Şerafet ERTUĞRUL**

Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü  
Biyolojik Maddeler Kontrol Lâb. Şefi

Biyolojik Maddeler Kontrol Laboratuvarının, son 10 yıllık me-saisine girmeden önce, yapmakla mükellef olduğu işler hakkında bi-raz bilgi vermeyi lüzumlu gördük.

Ankara Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü, muhtelif şube ve laboratuvarlarında hazırlanan aşı ve serumlar, kendi şube-lerinde, gerekli ilk kontrolleri yapıldıktan sonra, nihayî kontrolü yapıl-mak maksadıyla, Biyolojik Maddeler Kontrol Laboratuvarına gön-derilir.

Bahsi geçen preparatlar, burada daha geniş tetkike tâbi tutu-lur ve uygun görülenerine kontrol numarası verilir.

Biyolojik Maddeler Kontrol Laboratuvarının sorumlu olduğu işleri, 3 gurup altında toplamak mümkündür.

1 — Enstitü içinde hazırlanmış serum ve aşuların bir kısmı ile, İlaç Kontrol Şubesi Laboratuvarlarına, ruhsat veya piyasa kontro-lu maksadı ile gelen, injectabl preparatların «sterilite kontrolleri».

2 — Gerek Enstitü içinde, muhtelif istihsa şubeleri tarafından hazırlanan ve gerekse ihtiyaç halinde dış memleketlerden ithal edi-len aşı ve serumların «nihai ve tam kontrolleri».

3 — Jerm sayımları.

İlaç Kontrol Şubesinin muhtelif laboratuvarlarında, gerekli kontrolleri yapılan preparatların, injectabl olanları ile, catgutler steril pamuk ve gaz bezleri son zamanlarda sterilite kontroluna lüzum görülen göz damlaları, gerek bakteri yönünden ve gerekse mantar bakımından, laboratuvarımızca, muhtelif vasatlara ekilmek suretiyle, sterilite kontrolleri yapılır. Kontamine olanlar reddedilir. Uygun bulunanlar, ilgili laboratuvarlara bildirilir.

Keza, Serum Tevzî Laboratuvarı tarafından tevzî edilen edilen serumların, Viroloji Şubesi tarafından hazırlanan kuduz ve Enfluenza virus aşılarının sterilite ve zararsızlık kontrollerinde, Laboratuvarımız tarafından yapılmaktadır.

Laboratuvarımızın işleri arasında, en mühim kısmını ikinci paragrafta gösterilen, biyolojik preparatlar teşkil eder.

Bu preparatları şu şekilde guruplandırmak mümkündür.

a) Viroloji Şubesi tarafından hazırlanan;

- 1 — Çiçek aşıları (kuru veya gliserinli),
- 2 — Kuduz aşısı,
- 3 — Tifüs aşısı,
- 4 — Enfluenza virus aşıları.

b) Serum Şubesi tarafından hazırlanan;

- 1 — Difteri serumu,
- 2 — Tetanoz serumu,
- 3 — Akrep serumu,
- 4 — Gazli gangren serumları,
- 5 — Şarbon serumu, (Bu serum, Enstitümüzde hazırlanamakta, ancak, kontrolleri laboratuvarımızda yapılmaktadır).

c) Aşı Şubesi tarafından hazırlanan:

- 1 — Tetanoz ve Difteri anatoksin aşıları,
- 2 — Tifo aşısı,

- 3 --- Boğmaca aşısı,
- 4 — Kolera aşısı,
- 5 — Veba aşısı, (Son senelerde hazırlanmamaktadır).
- 6 — B.C.G. Laboratuvarı tarafından hazırlanan B.C.G aşısı. (Bu aşının kontrolleri son 3 - 4 ay içinde yapılmaktadır).

### Jerm Sayımları

Bakteri aşuları istihsal Şubesinin, Laboratuvarları tarafından hazırlanan Boğmaca, tifo ve kolera aşuları, hazırlanmalarını müteakip, en geç kolera için 2, saat boğmaca için 2 hafta tifo için 24 saat zarfında (hiçbir muameleye tâbi olmadan) Laboratuvarımıza gönderilir. Burada, Laboratuvarımızda mevcut bulunan «Coleman» Spectrophotometresi ile, standard opasite tüpü ile mukayese edilmek suretiyle, opasite üniteleri tayin edilir. Bundan da her bakteri cinsinin tekabül ettiği jerm miktarı hesaplanarak derhal ilgili Şubeye bildirilir. Laboratuvarımızın bu bulgusu aşunun jermi olarak kabul edilir.

Jerm miktarı, turbiditymetric olarak tayin edildiği gibi, total azot miktarını ölçmekle de yapılabilir. Tabiiyle bu miktarlar, «tifo, kolera ve boğmaca» için ayrı ayrıdır. Bu teferruata burada girilmeyecektir.

Biyolojik preparatların kontrolleri hususunda, gerek Türk kodeksince ve gerekse Enstitüce kabul edilmiş bir metod olmadığı için, intihap etmek hususu, Şubelerin metodlarına ve laboratuvarımızın şartlarına uymak ve son literatürlere sadık kalmak şartı ile, laboratuvarımızca yapılmaktadır.

Bu konuda müracaat ettiğimiz literatürler :

«İngiliz ve Amerikan Farmakopeleri», «W. H. O. Tcehniqne raporları», «National Institut of Health Minimum Requirements USA» ve «Minimum Requirements of Biologic Product Japanese Government» den alınmaktadır.

Bütün bu literatürlerin, biyolojik preparatlar için lüzumlu gördüğü analizler şunlardır:

- 1 — Sterilite kontrolleri,
- 2 — Zararsızlık kontrolleri,

- 3 — Kudret kontrolleri (potency unite tayinleri),
- 4 — Saflık kontrolleri (yabancı jerm),
- 5 — Teşhis deneyleri,
- 6 — Fizik ve kimyevî analizler,
  - a) pH. tayini
  - b) Formalin miktarı,
  - c) Fenol miktarı,
  - d) Aluminium miktarları (adsorbe aşılarda),
- 7 — Morfolojik kontroller.

Bazı virus aşılarının kudret kontrolleri, imkânsızlıklar yüzünden kendi şubelerinde yapılmaktadır.

Biyolojik preparatların kontrollerinde kullanılan metotlardan burada bahsetmiyeceğiz.

Enstitü dahilinde istihsal edilen aşılardan yetişmediği, geniş aşılanma kampanyaları esansında, birçok Avrupa memleketlerinden aşı ithal edilmiştir. Bu aşılarda kontrole tâbi olup, uygun bulunanlarına müsaade verilmiş, biyolojik preparatlar için lüzumlu görülen şartlara uymayanlar reddedilmiştir.

Biyolojik preparatların kontrolleri ve Biyolojik Kontrol Laboratuvarının işleri hakkındaki bu kısa bilgiden sonra, son 10 yıllık mesai ve artış, cedvellerin tetkikinde görülecektir.

Şemada görülen herbir rakam, ana süspansiyonlara aittir. Bu süspansiyonların hacimleri veya kaç doz oldukları hakkında, Laboratuvarımızın bilgisi yoktur. Bu husus, ilgili şubeler tarafından bilinen bir keyfiyettir.

Cedvel — I —

**STERİLİTE VE ZARARSIZLIK KONTROLLARI**

YAPILAN KONTROL	YILLAR (Adet olarak)									
	1959	1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968
Aşı ve serumlar sterilité kontrolü	578	561	568	536	464	452	537	683	706	745
Piyasa ilaçları sterilité kontrolü	325	351	318	305	249	395	396	505	525	389
Aşı ve Serumlar zararsızlık kontrolü	606	598	617	567	505	493	590	728	771	807

CELĐVEL — II —

AŞILARIN NİHAİ KONTROLLARI (Ana Suspendiyonlar)

YAPILAN KONTROL	YILLAR (Adet olarak)									
	1959	1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968
a) ANATOKSİN AŞILARI :										
Difteri anatoksin aşısı kontrolü	14	14	16	13	17	15	15	19	18	15
Tetanoz anatoksin aşısı kontrolü	14	23	33	14	23	25	38	56	50	47
b) BAKTERİ AŞILARI :										
Vebe Ana süsp. kontrolü	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—
Kolera Ana süsp. kontrolü	1	3	—	1	—	—	5	174	104	5
Tifo Ana süsp. kontrolü	1	1	1	1	1	1	2	11	43	62
P.A. Ana süsp. kontrolü	1	1	1	1	1	1	3	1	25	8
P.B. Ana süsp. kontrolü	1	1	1	1	1	1	2	3	35	55
Eoğmaca aşısı ana süsp. kont.	—	—	3	—	—	—	18	6	4	103
Karına ağlar kontrolü (İthal)	—	—	—	—	—	—	—	—	14	2
Stafilokok aşısı kontrolü	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
c) VIRUS AŞILARI :										
Çiçek aşısı kontrolü	4	6	18	14	7	4	15	32	20	24
İnfluenza virus aşısı kontrolü	—	—	—	2	1	3	2	4	2	5
Tifüs aşısı kontrolü	—	1	—	—	1	1	—	—	—	—
Bakteri aşılarında jerm sayını	—	—	—	—	—	—	5	4	108	654

**CEDVEL — III —  
SERUM KONTRALLARI**

YAPILAN KONTROL	YILLAR (Adet olarak)										
	1959	1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968	
Difteri serumu kontrolu	14	10	10	13	10	21	18	6	8	7	
Tetanoz serumu kontrolu	15	16	13	20	18	14	18	20	15	15	
Akrep serumu kontrolu	3	1	3	2	3	2	2	1	2	1	
Gazli Gangren serumlari kont.	4	4	4	12	14	10	14	11	12	6	
Şarbon serumu kontrolu	3	3	5	4	4	5	3	3	3	1	

## ÖZET :

Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü, Biyolojik Maddeler Kontrol Laboratuvarı, gerek enstitü içinde, muhtelif şube ve laboratuvarlar tarafından hazırlanan aşular ve serumların nihai ve tam kontrolü ile, İlâç Kontrol Şubesine gelen injectabl preparatlar, cağıgut, gaz bezi ve pamuklarla göz damlalarının, Serum Tevzi Laboratuvarı tarafından tevzi edilen serumların sterilitesini yapmakla görevlidir. Bu kontrollerin, dolayısı ile aşı miktarlarının, her sene artmakta olduğu, şemaların tetkikinden anlaşılacaktır.

Ayrıca, bakteri aşuları jerm sayımları, en kısa zamanda yapılarak, ilgili şubelere yardımcı olmaya çalışılır.

## LİTERATÜR

- 1 — British Pharmacopoeia.
- 2 — British Pharmaceutical Codex.
- 3 — Minimum Requirements of Biologic Products. Ministry of Health and Welfare, Japanese Government.
- 4 — Minimum Requirements, U.S.A. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Institute of Health.
- 5 — U.S.A. Pharmacopoeia
- 6 — W.H.O. Technical Reports.



# POWELL BESİYERİNDE (MODİFİYE COHEN — WHEELER) BOĞMACA AŞISI ÜRETİMİ

Zeki KARAGÖL

Abdülkadir SESVEREN

Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü  
Aşı Şubesi

1906 Yılında Bordet ve Gengou, boğmaca etkenini izole ettikten (1) bir kaç yıl sonra, boğmacaya karşı bağışıklık temini için birçok memleketlerde aşı üretimi çalışmalarına başlandı.

Bu gün, boğmaca aşuları üretimi için kullanılmakta olan besiyerlerini üç tipde toplamak mümkündür :

- 1 — Bordet - Gengou tipi modifiye katı besiyerleri,
- 2 — Hornibrook, Cohen - Wheeler yönlerinden açıklanmış bulunan sıvı besiyerleri,
- 3 — Charcoal ihtiva eden modifiye katı Cohen - Wheeler besiyeri.

Orijinal Bordet - Gengou ve modifiye Bordet - Gengou besiyerleri insan veya hayvan kanı ihtiva etmektedirler. Aşı haline getirilmiş bakteri süspansiyonlarına, kanlı besiyerlerinden hayvan kanı da beraber geçtiğinden, aşı uygulanan insanlarda hayvan kanına karşı aşırı duyarganlık meydana gelmekte ve böylece aşıya bağlı reaksiyonlar daha sık ve şiddetli olmaktadır. Taze insan kanının besiyerinde kullanılması ise, aşıya serum hepatit virusunun geçmesiyle aşılanan şahıs için muhtemel bir tehlike teşkil etmektedir. Bu bakımdan, hayvan kanı veya taze insan kanı ihtiva eden besiyerlerinde hazırlanmış aşuların, kullanılmasının sakıncalı olduğu anlaşılmış bulunmaktadır.

Boğmaca aşısı üretiminde kullanılan sıvı besiyerlerinde kan bulunmamaktadır. Hornibrook (2), Bordetella pertussis'in, organik azot mabuatı olarak, amino asitler, bazı polisakkaritler ve organik kükürt ihtiva eden sıvı besiyerlerin de kolayca üreyebileceğini göstermiştir. Bu unsurlar, besi yerine casein - hydrolysate, münhal nişasta, cysteine, glutathione, bira mayası dializatı ve bazı inorganik tuzlar katılmasıyla sağlanmaktadır.

Cohen ve Wheeler (3), Hornibrook tarafından bildirilen sıvı besiyerine, bakır ve demir ilâve ederek modifiye etmişler ve böylece bu besiyerinden antijenik değeri daha yüksek boğmaca aşısı elde etmişlerdir.

1947 de Pofflock, Bordetella pertussis suşları üredikleri besiyerinde ortaya çıkan yağ asitlerinin etkisi altında, oto - entoksikasyona uğradıklarını bildirmiştir (4). Cohen - Wheeler besiyeri üzerinde yapılan bu konudaki çalışmalar bu görüşü doğrulamıştır.

Powell ve arkadaşları bu görüşden hareket ederek, Cohen-Wheeler besiyerine absorban olarak carbo activatus (aktif kömür tuzu) ilâve etmişler, ayrıca agar ilâvesiyle de besiyerini katı hale getirmişlerdir. Böylece, Cohen-Wheeler besiyeri, Powell tarafından aktif kömür ve agar ilavesiyle modifiye edilmiştir (5, 6).

Yürdümüzde boğmaca aşısı ilk kez, Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsünde ve 1948 yılında, bir modifiye Bordet-Gengou besiyeri olan Kendrick-Eldering besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır (7, 8).

Boğmaca aşısı üretiminde kullanılmakta olan, çeşitli besiyerleri üzerinde, yukarıda yaptığımız kısa eleştirmeden, bu konuda en uygun besiyerinin, bu gün için, Powell tarafından modifiye edilmiş Cohen - Wheeler besiyeri olacağı kolayca anlaşılacaktır.

Enstitümüzde ilk kez Powell besiyeri kullanılarak boğmaca aşısı üretimine, bu çalışma olarak 1965 - 1966 yıllarında başlanmış, geniş çapta üretime ancak 1968 - 1969 yıllarında geçmek mümkün olabilmektedir.

Biz bu yazımızda, Powell besiyerinde aşı hazırlama tekniğinden söz edebek ve aşının potansi üzerinde yapılan laboratuvar deney sonuçlarına kısaca değineceğiz.

Aşı hazırlanmasında, antijenik değeri yüksek en az dört suş kullanılmak gerekmektedir. Biz de beş Bordetella pertussis suşu kullanmaktayız. Bunlardan üçü yerli, diğer ikisi de Zagreb İmmünoloji Enstitüsünden sağlanmış suşlardır. Bu suşlar, Powell besiyeri ihtiva eden plaklarda üretilmekte, Koloni mikroskobu yardımıyla S kolonileri seçilmekte ve bunlardan elde edilen kültür süspansiyonları kurutulularak saklanmaktadır.

Tohum kültürü :

Liyofilize suşlar doğrudan doğruya, içerisinde Powell besiyeri bulunan Roux şişelerine açılarak 37° C. de 72 saat enkübe edilmekte ve bundan yapılan 48 saatlik aralıklarla ikinci ve üçüncü pasajlardan sonra, kültür, steril fizyolojik tuzlu su ile sulandırılarak hazırlanmaktadır.

Aşı üretim besiyeri :

Boğmaca aşısı hazırlanmasında Powell'in aşağıda yazılı katı besiyeri (modifiede Cohen - Wheeler besiyeri) kullanılmaktadır.

(Bir litre için)

Casamino acids, technical	10 gr.
Sodium chloride	2,5 gr.
Monopotassium phosphate, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 gr.
Magnesium chloride, MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1 gr.
Starch, soluble, powdered	1,5 gr.
Calcium chloride, CaCl <sub>2</sub> , 1 % sol.	1 cc.
Ferrous sulfate, FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 0,5 % sol.	2 cc.
Copper sulfate, CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O, 0,05 % sol.	1 cc.
Cysteine hydrochloride, 1 % sol.	2,5 cc.
Yeast dialyzate	50 cc.

Carbo activatus	4 gr.
Agar agar	25 gr.

Distile su ile bir litreye tamamlanır.

NaOH 10 %	4 cc.
-----------	-------

Dializat için kullanılan «Brewer» bira mayasının 800 gr. dan 2,5 litre dializat elde edilmektedir.

Roux şişelerine 125 cc. üzerinden dağıtılan besiyeri, ilk gün 115 C. de 45 dakika, ikinci gün aynı derecede 30 dakika otoklavda sterilize edilip, 48 saat 37 C. de kontrole terk edilir.

Ekim ve toplama :

Evvelce hazırlanmış ve sterilite kontrolü yapılmış bir Roux şişesindeki kültür, 80 - 100 cc. fizyolojik tuzlu su ile sulandırılarak bundan kapalı sistemde, her şişeye 8 - 10 cc. düşecek şekilde ekim yapılır. Böylece bir tohum kültürü şişesinden, 8 - 12 Roux şişesine ekim yapana kadar mümkün olmaktadır. Ekilen şişeler, 48 saat 37 C. de üremeye terk edilir. Bu süre sonunda her Roux şişesi teker, teker elden geçirilerek üreme durumu, her hangi bir kontaminasyon olup olmadığı incelenir. Saf kültür gösteren şişeler ayrılarak, kapalı sistemde toplanır. Kültürlerdeki kömür parçacıklarının toplanan ana süspansiyona geçmemesi için, toplama şişelerinin ağızlarına monte edilen amerikani bezinden yapılmış torbalardan süzülür. Aynı süzme işlemi ikinci defa tekrarlanır.

Jerm sayımı :

Kültür süspansiyonlarından alınan örneklerde bekletilmeden ve öldürülmeden jerm sayımı yapılır. Genel olarak, yukardaki şartlar içinde hazırlanmış süspansiyonların bir santimetre kübünde 80 - 120 milyar jerm elde etmekteyiz.

Kültür süspansiyonlarının öldürülmesi :

Toplanan ana süspansiyon, su banyosunda 56 C. de yarım saat bekletilerek inaktive edilir. Oda derecesinde soğutulduktan sonra süspansiyonda son merthiolate konsantrasyonunu 1/50000 olabilmesi için 1 % merthiolate (thiomersal) solüsyonundan yeterli miktarlarda katılır. 1 % lik merthiolate solüsyonunun, iyon konsantrasyonu

takriben pH. 6,7 dir. Merthiolate'ın bakteriostatik ve fungistatik etkisini optimal olarak, yapabilmesi için pH. 8,5 dan az olmaması icap eder (9). Bu maksatla hazırlanan 900 cc., 1 % lik merthiolate solüsyonuna 100 cc., 1,4 % lük Borax solüsyonu katılmaktadır. Aşındaki son merthiolate konsantrasyonu 1/10000 dir.

Bundan sonra ana süspansiyonda uygulanacak sterilite ve toksisite testleri Dünya Sağlık Teşkilâtının bu konularla ilgili teknik raporlarındaki hususlara uyularak yapılmaktadır (10, 11).

Bir uzman ve iki laborantdan ibaret bir ekip, günde 60-90 Roux şişesi ekebilmekte ve aynı miktar şişedeki süspansiyonu toplayabilmektedir.

#### Potens :

Aşının potens bakımından kontrolü, Dünya Sağlık Teşkilâtının 274 sayılı teknik raporunda açıklanmış hükümlerine göre yapılmaktadır. En önemli nokta, aşının potensidir. Her operasyonda potens değişiklikleri olabilir. Ancak bu varyasyonların belirli sınırlar içinde kalması ve asgarî değerlerin altına düşmemesi gereklidir. Dünya Sağlık Teşkilâtının 274 sayılı teknik raporundan anlaşılacağı üzere, farelerde uygulanan potens deneyinde, boğmaca aşılarında bir insan dozu için tavsiye edilen hacim içinde, en az dört uluslararası ünitenin bulunması gerekmektedir. Aşının potensindeki önem, bizi istihşal ettiğimiz aşı operasyonlarından zaman, zaman örnekler olarak karşılaştırma yapmak amacıyla, dış ülkelerdeki uluslararası değeri haiz müesseselerde kontrol ettirmeye sevketmektedir. Nitekim 1960 yılında, hazırladığımız boğmaca aşısı operasyonlarından gelişmiş güzel aldığımız bir örneği, Zagreb, İmmünoloji Enstitüsüne gönderdik. Kontroller, bu enstitünün Biyolojik standartlar laboratuvarında yapılmıştır. 35 Operasyon numaralı aşı ana süspansiyonunun bir santimetre kübünde 80 milyar jerm bulunmuş ve 0,02 santimetre kübünde, bir uluslararası inimmünize edici ünite (IU), tespit edilmiştir. Bu da aşının bir santimetre kübünde 12,5 uluslararası ünite olduğunu göstermektedir (12).

Ürettiğimiz Boğmaca aşıları, Difteri ve Tetanoz Anatoksinleriyle kombine edilerek pratiğe çıkarılmaktadır. Kombine aşılarımızda bir insan dozu, bir santimetre kübdür. Bu miktar kombine aşıda Bordetella pertussis, 20 milyar bulunacak şekilde sulandırılmaktadır.

## (SUMMARY)

This report presents the results of work on preparing Pertussis Vaccine in the Powell solid medium, a modification of the Cohen-Wheeler liquid medium.

The suspension obtained is inactivated for 30 minutes at 56° C.

The combined DI—TE—PER vaccine is prepared by addition of the pertussis component to the DI—TE component, so that it contains  $20 \times 10^7$  organisms in 1 ml.

The final product contains thiomersolate 1 : 10000.

## L I T E R A T Ü R

- 1 --- Bordet, J., Gengou, O. 1906, Le Microbe de la Coqueluche, Ann. Inst. Pasteur, 20, 731 - 741.
- 2 --- Hornibrook, J.W.. 1939. Cultivation of phase - I, H. pertussis in a semi-synthetic liquid medium, Public Health Rep. 54, 1847 - 1851.
- 3 --- Cohen, S.M., Wheeler, M.W., 1946, Pertussis vaccine prepared with phase - I cultures grown in Fluid Medium, Amer. J. Pub. Hlth. 36, 371 - 376.
- 4 --- Rowley, D. Mazloum, H.A., 1955, The growth requirements of H. pertussis on solid media, J. of Path. Bact., 70, 439 - 447.
- 5 --- Powell, H.M., Culbertson, C.G., Ensminger, P.W., 1951, Charcoal agar culture medium for preparing H. pertussis vaccine, Bul. Hlth. Rep. 66, 346 - 348.
- 6 --- Ensminger, P.W., Culbertson, C.G., Powell, H.M., 1953, Antigenic (Hemophilus pertussis) vaccines grown on charcoal agar, J. Infcl. Dis., 93, 266 - 268.
- 7 --- Payzın, S., Akyay, N., 1948, Türkiyede İlk Boğmaca Aşısı İstisnall ve bunun talimatından alınan sonuçlar, Türk Hıj. Tec. Biyol. Derg. 8, 103 - 109.
- 8 --- Erzın, N., Balkan, O.H., 1949, Refik Say. Mer. Hıf. Müessesesi faaliyetleri hakkında, 1933 - 1948, Türk Hıj. Tec. Biyol. Derg., 9, 13.
- 9 -- United States Dispensatory, 25th edition 1418.
- 10 - - Wld. Hlth. Org. Techn. Rep. Ser., 1960, 200.
- 11 -- Wld. Hlth. Org. Techn. Rep. Ser., 1964, 274.
- 12 -- Ljerka Hıgy - Mandic, Personal communication.

## ULUSLARARASI ÇİÇEK SİMPOZİYUMU'NDAN NOTLAR

2 - 3 Eylül 1969, Zagreb, Yugoslavya

Dr. İrfan TUNA (\*)

Dr. Elhan ÖZLÜARDA (\*\*)

Refik Saydamı Merkez Hıfzısıhha Enstitüsü

Zagreb İmmünoloji Enstitüsü'nün kuruluşunun 75. yıldönümü münasebeti ile tertiplenen Uluslararası Çiçek Simpozyumu'nda, Dünya Sağlık Teşkilâtı (WHO) Çiçek Eradikasyonu Ünitesi Şefi Dr. D.A. Henderson ve aynı teşkilâttan Dr. I. Arita'nın raporlarından başka, 10 millate mensup araştırmacılar tarafından 16 makale sunuldu.

Dr. Henderson, «Dünya Çiçek Eradikasyon Programının Eylül 1969 daki Durumu» başlıklı konuşmasında, WHO çiçek eradikasyon programının 3. yılını doldurduğu bugüne kadar kaydettiği ilerlemeleri özetledi. Eradikasyon programının uygulanmasından itibaren, ihbar adedinin artmasına rağmen, çiçek vak'aları 1968 de % 40, 1969 da tekrar % 45 oranında azalmıştır. Başlangıçta çiçeğin endemik olduğu ülke sayısı 42 iken şimdi 30 a düşmüştür. Kuru çiçek aşısı üretimi teşvik edilmiş ve muhtelif laboratuvarlara müşavir, alet, özel reagen ve test materyeli temin edilmiştir. Laboratuvarların kontrol edilmek üzere gönderdikleri kuru aşı numunesi adedi her yıl artmaktadır. Aşılama tekniği geliştirilmiş ve daha az aşı ile daha fazla olumlu sonuç almayı sağlayan jet enjektör ve «bifurcated needle - ucu çatallı iğne» uygulamaya arzedilmiştir.

Dr. Arita, «Kuru Çiçek Aşısı Üretimi Durumu» başlıklı raporunda, 1967 yılında kuru aşı üreten laboratuvarlara gönderilen anket sorularına verilen cevaplardan elde edilen sonuçları özetledi. Gönderilen 45 numuneden yalnız 16 sı, ısıya dayanıklılık testinde olumlu sonuç vermişti. WHO nu muhtelif memleketlerde tesis et-

(\*) Enstitü Direktörü.

(\*\*) Enstitü, Çiçek Aşısı Üretim Laboratuvarları Şefi.

tiği Referans Laboratuvarlar, kuru aşı üreten laboratuvarlara, karıştıktıkları problemlerin çözümlenmesinde yardımcı olacaklardır. Kuru aşının ısıya dayanıklılık testi için, «4 hafta 37° C de bekletme» yerine «1 saat kaynatma» metodunun kullanılması, aşının kontrol süresini kısaltmak suretiyle, rutin uygulamaya daha çabuk arz edilme olanağını sağlayacaktır. Bir aşının stabilite testini geçmesi için başlangıç titresinin yüksek olması gerekmektedir.

### **Aşı Suşlarının Özellikleri**

Kopenhag Devlet Serum Enstitüsü'nden Dr. Elsa Krag Andersen, «Çiçek Aşısı Üretimi İçin Virus Suşunun Seçilmesi İle İlgili Problemler» başlıklı raporunda, üç ayrı vaccinia suşu ile yaptığı virulans testleri sonuçlarını açıkladı. Çiçek aşılarının seri dilüsyonları ile burun içi yolla enfekte edilmiş bebe farelerdeki mortalite oranı ve ölüm zamanı vaccinia suşları arasında virulans bakımından bir ayırım yapmaya yarayabilir. Bu ayırım insandaki reaksiyon derecesi ile paralel görünmekle beraber, yetişkindeki morbidite oranı ile farelerdeki mortalite oranı arasında yakın bir korelasyon kurulamamıştır. Aşılı anne farelerin koruyucu antikolarını yavrularına aktararak, bunların maymun - çiçeği ile enfekte edilmelerinden sonra, vaccinia virusla aşılı farelerde, maymun - çiçeği virusu ile aşıllılara nazaran daha alçak derecede bir koruma görülmüştür. Eğer pox gurubu içinde korunmada böyle bir fark insandaki çiçek hastalığı için de geçerli ise, bu durum, yeterli aşılamanın önemini daha fazla belirtecektir. Aşı üretimi için ideal bir suş olarak tek bir vaccinia suşu seçilmeden evvel, alçak virulanslı çiçek aşıları ile aşılamadan sonra insanda humoral ve dokusal bağışıklığın devamı konusunda çalışmalar yapılmalıdır.

Marennikova ve ark. (R.S.S.C.B.) nin hazırladıkları «Çiçek Aşısı Üretiminde Kullanılan Virus Suşlarının Karakterleri» başlıklı raporda muhtelif vaccinia suşları muhtelif genetik özelliklere göre sınıflandırılmıştır: virus popülasyonunun homojenitesi ve laboratuvar hayvanları için patojenite derecesi. Aşının kalitesinde bu özelliklerin önemi, tecrübelerden alınan sonuçlara dayanarak, münakaşa edilmiştir. Suşun patojenitesini ve çocuklardaki primovaksinasyonda reaktogenitesini tayin eden bazı genetik «marker» lar gösterilmiştir. Suş reaktogenitesini gösteren bir «laboratuvar marker'ları» kompleksi arasında : deri içi yolla tavşanda, beyinici yolla tavşan ve beyaz farede patojenite; gama ışınları ile radyasyon verilmiş beyaz sıçanlarda



damariçi yolla patojenite... gibi testler tavsiye edilmiştir. Laboratuvar hayvanlarında yapılan mukayeseli deneylerde ve çocuklarda yapılan primo ve revaksinasyon çalışmalarında, «orta patojenitede» ve «az patojen» olarak sınıflandırılmış olan suşların farklı antijenik aktivitede oldukları tesbit edilmiştir. İki skarifikasyon veya jet enjeksiyon gibi aşılama metodlarının bir dereceye kadar aşı sürecinin şiddetini ve primer antikor cevabı derecesini tayin ettiği, fakat revaksinasyonda humoral cevabın derecesine önemli derecede tesir etmediği gösterilmiştir. Rapor, postvaksinasyon ensefaliti ile aşının hazırlandığı suşun patojenitesi arasındaki ilgi problemini de incelemektedir.

Zagreb İmmünoloji Enstitüsü Direktörü Prof. İkić, Çiçek Aşısı Üretim Laboratuvarları Şefi Dr. Weizs Malecek ve arkadaşlarının «Bern - Zagreb Aşı Suşunun Karakterleri» adlı raporlarında, aşı virusunun özellikleri klinik reaksiyonlara dayanarak «morbidity oranı» ile gösterilmeye çalışılmıştır. Morbidity oranının, bir aşı serisinin titresinin yüksekliği ile ilgili olmadığı gösterilmiştir. Bu oran, aynı virüsle hazırlanmış muhtelif aşı serilerinde farklı olabilmektedir ve dolayısı ile, bir suşun özellikleri, tek bir seri aşıdan alınan sonuçlarla değerlendirilemez. Alınacak sonuca, aşıcıların çalışması, çocukların yaşları ve beslenme durumları, aşılama esnasındaki epidemiyolojik şartlar gibi diğer faktörler de tesir edebilir. Bern - Zagreb suşunun selim klinik reaksiyonlar yaptığı ve ansefalit gibi postvaksinal komplikasyonlarının nadir olduğu görülmektedir. Buna sebep olarak, suşun bu laboratuvarında 30 yıldan fazla bir zamandanberi konakçı değiştirmemiş olması düşünülebilir.

Prof. İkić, Higy - Mandić ve ark. nın «Çiçek ve Difteri - Tetanoz - Boğmaca (DPT) Aşılarının Simultane Uygulanması» adlı çalışmalarında, Difteri - Tetanoz (DT) aşısı ile simultane çiçek aşısı yapılmış bir gurupla, çiçek ve DTP aşılarını 4 - 6 hafta ara ile almış diğer bir gurup şahısta, bu antijenlerin karşılıklı tesirleri ve simultane uygulamanın reaksiyon ve komplikasyon oranını artırıp artırmadığı araştırılmaktadır. Laboratuvar çalışmalarında, simultane aşılama da vaccinia virusun, boğmaca antijeninin immünojenik kudretine tesiri olmadığı, fakat tetanoz ve difteri immünitesine azaltıcı etki yaptığı tesbit edilmiştir. Yazarlar çiçek ve DTP aşılarını simultane verilmesine taraftar görünmemektedirler.

## Hayvan Lenfi Aşısı Üretiminde İlerlemeler

D. Slonim ve ark. nın «Çekoslovakya'da Çiçek Aşısı Üretiminde Son Gelişmeler» adlı kısa raporunda, kaliteli aşı üretimi için gerekçeler özetlenmekte ve WHO Gerekçelerinden farklı lokal kontrol metodları ve geçerlik prensipleri anlatılmaktadır. Meselâ, aşının cc. sinde en çok 100 saprofit bakteri ve en az  $5 \times 10^7$  PFU bulunması şartı kabul edilmekle beraber, aşuları genellikle bakteriyolojik bakımdan steril olup  $1 - 3 \times 10^6$  PFU/ml ihtiva etmektedir. Aşı kontrollerine ayrıca, M. tuberculosis aranması, pH, fenol ve protein miktarı tayini, kuru aşının sulandırma sıvısında pH tesbiti gibi testler de ilâve edilmiştir. Aşı suşu (USOL - V), Lister ve R.S.S.C.B. vaccinia suşları ile kıyaslanmış ve önemli fark bulunmamıştır.

Dr. E. Özlüarda, «Türkiye'de Çiçek Epidemiyolojisi ve Kontrolünün Kısa Tarihi ve Aşı Üretiminde Son Gelişmeler» başlıklı raporunda, Türkiye'de 12 yıldır hiç çiçek vak'ası olmadığını, 1957'deki küçük salgının impote bir vak'adan kaynağını aldığını ve 1952 yılındanberi bu ülkede çiçeğin eradike edilmiş sayılabileceğini belirttikten sonra Türkiye'nin batı dünyasında çiçek aşılamaasının yapıldığı ilk ülke olduğunu kısa bir tarihi bilgi halinde vermiştir. Son 8 yıl içinde çiçek aşısı üretim metodlarında ve sevk şekline önemli gelişmeler kaydedilmiş, 1965 yılından itibaren kuru çiçek aşısı üretimine başlanmıştır. Konuşmacının sonuçlarını özetlediği, 1957 yılındanberi çiçek aşısı ve vaccinia virus üzerinde yaptığı çalışmalar bu dergide evvelce yayınlanmış olduğundan (bu sayıdaki İngilizce metin sonundaki literatüre bakınız) burada tekrarlanmayacaktır.

H. Tint (A.B.D.), «Dana Lenfi Aşılarında Gelişmeler» adlı konuşmasında, genel eradikasyon prensiplerine ve kuru aşıya değindikten sonra, yeni bir buluş olarak tek dozluk kuru aşı hazırlama çalışmalarını özetlemiştir. Aşı bu usulde çatal uçlu iğnenin ucunda kurutulmakta ve iğne bir tüp içinde saklanmaktadır. Kullanılacağı zaman bu tüp, bir uygulama apareyi haline getirilebilmektedir. Aşı standardizasyonu ve kudret kriterleri konusunda konuşmacı, 10 kere sulandırılmış aşı ile aşılamalardan alınan sonuçların, sulandırılmamış aşı ile alınanla aynı olduğunu, % 99 oranında başarılı aşılama sonucu elde etmek için aşı titresinin en az  $10^{7.7}$  PFU/ml olması gerekmele beraber, pok sayımı metodunun titrasyon şekli ile ilgili olduğunu ve koriyo-allantoik zara konan enfekte materyel miktarı arttığı oranda pok adedinin azalacağını ifade etmiştir.

## Doku Kültüründe Üretilen Çiçek Aşısı

Lister Enstitüsü (İngiltere)nden Dr. H.G.S. Murray, «Doku Kültüründe Üretilmiş Kuru Vaccinia Virusun Stabilitesi» başlıklı konuşmasında, WI. 38 hücreleri ve tavuk emriyonu hücrelerinde üretilmiş vaccinia virusun kuru preparasyonlarının, deride üretilmiş vaccinia ile hazırlanan kuru aşılarından daha az stabil olduğunu belirtmiş ve doku kültüründe hazırlanan aşıların stabilitelerinin, virus süspansiyonlarının kurutulmadan evvel kısmi pürifikasyonları ile arttırıldığını bildirmiştir. Doku kültürü aşıları bakteriyolojik bakımdan steril olduğundan jet enjektörle kullanılmaya daha elverişlidir. Liyofilizasyon esnasında vaccinia virusu muhafaza kapasitesi bakımından müteaddit maddeler denenmiş ve en iyisinin pepton olduğu bulunmuştur.

Dr. R. Wokatsch (Batı Almanya), «Primer Embriyonik Dana Kası Dokusunda Hazırlanan Doku Kültürü Aşısı» adlı raporunda, Hamburg'da çiçek aşısını 1959 danberi doku kültürlerinde hazırladıklarını, Münih'te 70.000 kişinin bu aşı ile aşılanmasında olumlu sonuç alındığını bildirmiştir. Bu aşının avantajları, bakteri ve mantardan arı olması, daha az non - spesifik protein ihtiva etmesi ve dana adele hücrelerinin diğer viruslarla nadiren kontamine olmasıdır. Primer doku kültürlerinde hücre transformasyonu ve tümör hasıl etme ihtimali de azalmaktadır. Aynı tohum virus birçok aşı serisi için kullanılabilirdiğinden aşılarıdaki antijenite de değişmemektedir. Ayrıca doku kültürü aşıları dana lenfi aşısından daha ekonomiktir.

Dr. W. Ehrengut (Batı Almanya), «Doku Kültürü Aşıları ile Deneyler» başlıklı raporunda, sığır embriyonik adale hücresi kültürlerinde hazırlanmış aşılarla 10 yıldan fazla bir zamandanberi edindikleri tecrübeleri anlatmıştır. Doku kültürü aşıları iyi tolere edilmektedir, ters reaksiyonlar görülmemektedir. Revaksinasyonlardaki «take» oranı, daha yüksek titrede aşı kullanılırsa, derma - vaksinlerle aynıdır. Pepton - şokuna sebebiyet vermemek için, jet enjektörlerde kullanılacak kuru aşıların pepton ihtiva etmemesi gerekmektedir.

Prof. İkic ve ark. nın «İnsan Diploid Hücrelerinde Üretilen Çiçek Aşısı» adlı raporunda, bu aşılarla yapılan primovaksinasyonlarda % 95 olumlu sonuç aldıkları ve aşıları tutan bu çocukların % 46 sında hiç ateş görülmediği bildirilmiştir. Sonuç olarak, insan

diploid hücreleri çiçek aşısı hazırlamaya elverişli bulunmuştur. Bu çiçek aşısının hazırlanmasında, Bern - Zagreb suşundan daha yüksek titre verdiği için Lister suşu kullanılmaktadır.

### Yumurta Aşıları ve Ölü Aşılar

Dr. J.A. Espmark (İsveç), «Çiçeğe Karşı Yumurta Aşıları: Efi-kasite ve Zerkedilebilme Özellikleri» adlı konuşmasında, halen bil-hassa Teksas, Brezilya ve İsveç'te geniş çapta kullanılmakta olan düşük pasaj seviyesindeki yumurta aşılarının efikasitesinin, aşıyla elde edilen pozitif reaksiyon adedi ve yüzdesi, serolojik cevaplar, çi-çeğe karşı koruma gibi hususlarla ölçüldüğü takdirde, geleneksel da-na lenfi aşısı kadar iyi görünmekte olduğunu ifade etmiştir. Aşı-nın zararsızlık kontrolünde en önemli problemi, kuş leucosis'i ile muhtemel kontaminasyon tehlikesi teşkil etmektedir. Yapılan araştırmaların bu tehlikenin muhtemelen küçük olduğunu göstermesine rağmen leucosis kontrolü rutin kontrol metodlarına dahil edilmekte-dir. Üretimde kullanılacak yumurtaların % 10 - 25 i daha evvel CO-FAL veya immünofloresans tekniği ile leucosis bakımından kontrol edilmelidir.

Dr. H. Tint, «CVI Attenüe Vaccinia Suşunun Klinik Değerlendi-rilmesi, Geçmiş ve Şimdiki Durumu» adlı konuşmasında, Kempe tara-fından geliştirilen attenüe CVI suşu ile yapılmış çalışmalarını özetle-miştir. Bu suş ile hazırlanan aşılar bilhassa, komplikasyona eğilimi olan ekzema ve deri hastalıklı şahısların aşılınması için elverişlidir ve komplikasyon tehlikesi, standard immünizasyona nazaran, önemli de-recede azalmaktadır. Standard ve attenüe olmayan suşlarla aşılama-da normal şahıslarda dahi genellikle husule gelen lokal ve sistemik reaksiyon vukuatı, CVI - 78 aşısı ile yapılan prevaksinasyon yardımı ile azalmıştır. Bu aşı, standard vaccinia suşu ile aşılama veya ka-zaen teması takip eden komplikasyon tehlikesine maruz kaldıkları zaman bu şahısları korumaya yeterli ve standard aşı ile hasıl olana eşit miktarda antikor meydana getirmektedir. CVI vaccinia suşunun, insan ve tavşan derisine aviditesinin azalmasına paralel olan invitro özellikleri, onun attenüasyon derecesi için bir «marker» teşkil et-mektedir.

W. Ehrengut, «Non - enfeksiyöz Çiçek Aşıları» adlı konuşma-sında, bu aşılarda hazırlanmasında önemli olan hususlara değinmiş.

rezidüel virustan arı olmaları ve preparatın antijenitesi üzerinde durmuştur. 2 ticarî preparatın immünojenitesindeki farklar, önce ölü vaccinia virusla immünize edilmiş ve sonra canlı aşı yapılmış tavşanlardaki lokal reaksiyonun evolüsyonu ile gösterilmiştir. Önceden immünize edilmiş kobaylarda hemagglütinasyon - inhibe edici antikorlar tesbit edilmemekle beraber, önceden non - enfeksiyöz aşı ile immünize edilmiş (primovaksinasyon) şahıslarda aşı allerjisinin normal aşılılardan 2 gün daha erken teşekkül ettiği gösterilebilmiştir. Non - enfeksiyöz aşıların etkisinin, immünoisitlerin stimülasyonu şeklinde olduğu, böylece önceden immünize edilen aşılılarda antikorların daha erken görüldüğü ve vireminin kısaldığı anlaşılmaktadır. Kombine aşılama metoduna nazaran daha çok hipererjik reaksiyon olmaktadır. Non - enfeksiyöz aşıların postvaksinal ansefalit'ten korunmada, bu komplikasyonun çok görüldüğü ülkelerde büyük değeri olduğu şüphesizdir.

G.R. Matsevich ve S.S. Marennikova (R.S.S.C.B.) nın «Gama Işınları İle İnaktive Edilmiş Çiçek Aşısının Uygulanması Üzerine Araştırma ve Tecrübeler» adlı raporunda, Co<sup>m</sup> in gama ışınları ile inaktive edilmiş çiçek aşısının hazırlanmasına ait metod ve inaktive preparatın antijenik ve immünojenik özellikleri üzerindeki araştırmaların sonuçları anlatılmaktadır. Antijenik ve immünojenik özellik bakımından bu preparatın, formalinle inaktive edilmiş doku kültürü çiçek aşılarna üstün olduğu görülmüştür. Bu preparat, mutad usulle primovaksinasyonun kontrendike olduğu 50 kadar çocuğa kombine olarak (inaktive aşı inokülasyonundan sonra EM - 63 suşu ile hazırlanmış canlı aşı) aşılanmış ve inaktive aşının aşılananların % 92 sinde antikor hasil ettiği görülmüştür. Sonradan yapılan canlı aşı serokonversiyonu % 100 e çıkarmıştır. Aşılanmadan 4 - 5 hafta sonraki antikor titre ortalaması, mutad metodu aşılamadan sonraki antikor seviyesini geçmiştir.

### **Postvaksinal Reaksiyonlar ve Komplikasyonlar**

W. Ehrengut ve ark. «Postvaksinal Konvülsiyonlar: Yaş Dispozisyonu ve Prognozu» başlıklı raporunda, 0 - 3 yaş arasındaki çocuklara yapılan 246.647 primovaksinasyonu takiben 243 adet nöral komplikasyon görüldüğünü bildirmiştir. Bunların 235 i «postvaksinal konvülsiyon» (febril ve ansefalopatik orijinli) ve 8 i ansefalopati (konvülsiyonsuz) idi. Postvaksinal paroksizm, ilk 6 ayda aşılanan-

larda en az (15.405 te 1), 2. yaşta aşılanelarda en fazla (511 de 1) idi. Devamlı sekel bırakma oranı 1.5 - 2 yaş arasında aşılanelarda en azdı. İlk aşılamanın 4 - 6 aylar arasında yapılması, postvaksinal konvülsiyon oranını düşürmektedir.

J. Johanovsky (Çekoslovakya), «Geç (Sellüler) Tip Aşırı Duyarlılığın Mekanizması Üzerinde Çalışmalar» başlıklı raporunda, aşırı duyarlılığın geç tipinin immünolojide «hücre aracılığı ile olan bağışıklık reaksiyonu» diye isimlendirildiğini ve bununı, mikroplu hastalıklara rezistansta ve onların patogeneğinde, aşılamadaki yan tesirlerde, transplantasyonda ve antitümör bağışıklıkta ve otoimmün hastalıklarda önemli rolü olduğunu anlattı.

Aynı konuşmacı, «İnvitro Olarak Spesifik Antijenle Enkübe Edilen Aşırı - duyar Lenf - düğümü Hücrelerinin Hasıl Ettiği ve Saldığı Faktörlerin Gösterilmesi ve Karakterizasyonu» başlıklı konuşmasında, bu konuda yaptıkları çalışmaları anlatmaktadır. Aşırı - duyar hayvanlardan alınan lenf düğümü hücreleri ile spesifik antijenin invitro olarak karşılaştırılması esnasında salınan biyolojik bakımdan aktif maddeler üzerinde yapılan bu çalışmalarda, en az 2 maddenin normal hayvanların dalak hücrelerinin göçme aktivitesine tesir edebilecek özellikte olduğu tesbit edilmiştir. Bunlardan biri MIF tir. Diğer antijene tabidir ve mikrofajlara bağlandıktan sonra gösterilebilir. Bu raporda, bu faktörlerin bazı özellikleri, diğer bilinen biyolojik bakımdan aktif maddelerle ilgisi ve invivo geç tip aşırı - duyarlık reaksiyonlarındaki muhtemel rolü münakaşa edilmektedir.

---

Not : Bu raporların birer kopyası Enstitü Kitaphı'nda ve Çiçek Aşısı Üretim Lâb. Kitaphı'nda mevcuttur.

# TÜRK HİJİYEN ve TECRÜBİ BİYOLOJİ DERGİSİ

Vol : 29 (1969)

## Y A Z A R İ N D E K S İ

(AUTHOR INDEX)

Açan, H. ....	19, 24
Akşehirli, M., ....	103
Alptekin, A., ....	146, 152, 153, 157
Altinkurt, O., ....	113
Arı, A., ....	172
Arı, N., ....	200, 205
Atay, N., ....	227, 235
Batum, A. K., ....	60
Baykut, A., ....	146, 152, 153, 157
Bozkurt, M., ....	103
Ertuğrul, Ş., ....	237
Güner Ü., ....	207, 223
Gürsel A., ....	30, 41, 227, 235
Hewitt, W., ....	207, 223
İnak, M., ....	207, 223
Karagöl, Z., ....	245
Kiper, M., ....	143, 225
Kılıçoğlu, G., ....	30, 41
Mizan, N., ....	146, 152, 153, 157
Onur, E., ....	121, 127, 130, 140
Önal, Ü., ....	207, 223
Özluarda, D., ....	19, 24
Özluarda, E., ....	187, 251
Sarp, N., ....	19, 24
Sesveren, A., ....	245
Sevük, N., ....	159, 169
Tulga, T. ....	78, 86, 89
Tuna, İ., ....	5, 12, 60, 251
Tuncer, T., ....	43, 57
Uçar, N., ....	89
Yalçındağ, O. N., ....	121, 127, 130, 140
Yücel, E., ....	60

# TÜRK HİJYEN ve TECRÜBİ BİYOLOJİ DERGİSİ

Vol : 29

1969

## KONU İNDEKSİ

Ajmalin'in idantifikasyon reaksiyonları ... ..	121
Aflatoksin (Mycotoxin) bakımından, menileketimizde, fındık fıstık, bademiçi ve cevizlerde bir araştırma ... ..	103
B. C. G. kampanyası çalışmaları, Türkiye ... ..	19
Boğmaca Aşısı üretimi, Powell besiyerinde ... ..	245
Çiçek simpozium'undan notlar, Uluslararası ... ..	251
Glaucium flavum ve Glaucium rubrum'un farmakolojik insektisit ve antibiyotik vasıfları ... ..	113
Kan grupları, (A <sup>s</sup> ) ve (A <sup>s</sup> B) hakkında ... ..	146
Kan grubunda anormal serolojik özellik gösteren iki (A) antijeni ... ..	153
Kolera Aşısı üretimi (1966-1968) ... ..	78
Kolera'nın immünolojisi ... ..	89
Mikobakterilerin, idantifikasyon ve klassifikasyonunda Tween hidroliz ve Tween opasite reaksiyonlarının değeri ... ..	227
Ncrethisteronacetate, testosterone oenanthate, Estradiol valerianate ve Estradiol benzoate'ın yağlı karışımlarında herbirinin ince tabaka kromatografisi ile idantifikasyonları ... ..	200
O-Ethoxybenzamid'in quinin sulfat, acid ascorbic ve Orphenadrine HCl. kombinasyonunda ince tabaka kromatografisi ile izolesi, kalitatif ve kantitatif tâyini ... ..	225
Penisilin için ilk Türk Milli standard maddesi ... ..	207



Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsü, 1968 yılı çalışmalarını ... ..	5
Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsü Aşı üretim Laboratuvarlarının son oniki yıllık çalışmaları (1957-1968) ...	60
Refik Saydam Merkez Hıfzısıhha Enstitüsü Biyolojik Maddeler Kontrol laboratuvarının on yıllık çalışmaları ... ..	237
Smallpox, in Turkey, brief history, epidemiology and control of, and recent developments in vaccine production ... ..	187
Spermogram ve sperma kültürlerinden izole edilen bakteriyel etkenler, infertiliteye tesirleri ve antibiyotik hassasiyet testleri	43
Salicylamide, phenacetin, coffein, Diphene hydramin chlorhydrate kombinasyonunda Lüninal'in izolesi, teşhisi ve kantitatif tâyini ... ..	143
Solane alkaloitleri ve bazı türevlerini Mikrokristallaskopik ayrılmaları ... ..	130
Stafilokok'ların, patojen, portörlük bakımından incelenmesi	159
Tüberküloz'un bakteriyolojik teşhis ve idantifikasyonunda klâsik NaOH dekontaminasyon metodunun Okzalik asit metodu ile mukayeseli sonuçları ... ..	30
Poliomyelit ve diğer virus hastalıkları Avrupa XII. simpozium izlenimleri (4 - 7 Mayıs, 1969) ... ..	172
Ecz. Abdullah Ungan emekliye ayrıldı ... ..	101
Herbert Kober Kuter'i kaybettik ... ..	185

# TÜRK HİJYEN ve TECRÜBİ BİYOLOJİ DERGİSİ

Vol : 29

1969

## SUBJECT INDEX

Aflatoxin, in groundnut, walnut, hazelnut	103
Ajmalin, identification reactions of	127
B.C.G. campaign of Turkey, activities of the	24
Blood groups (A <sub>3</sub> ) and (A <sub>3</sub> B)	152
Blood group, two (A) antigens with abnormal serologic properties	157
Cholera vaccine, production of (1966-1968)	86
Cholera, immunology of	89
Glaucium flavum and glaucium rubrum, properties of	113
Mycobacteries, une etude sur la decontamination des produits pathologiques et des souches des Mycobacteries contaminés et employant deux methods differentes	41
Mycobacteries, le role dans l'identification et classification des Mycobacteries des tests de l'hydrolyse et de l'opacite du Tween 80	235
Norethisteronacetate, testosterone — 17 — N — oenanthate, Estradiol — 17 — B — N — valerianate, and Estradiol benzoate, Identification of, by thin — layer chromatography, in oily preparations	205
Penicillin, The first Turkish National Standard Reference Material for	223
Pertussis vaccine, production of	245
Smallpox, brief history of Epidemiology and control of Smallpox in Turkey and recent developments in vaccine production	187
Spermogram, and the isolated bacterial agents from the Sperm culture, their effects on the infertility and the antibiotic sensitivity tests	57
Staphylococci carriers in Medical School of Ankara	169
Yearly activities of the Refik Saydam Central Institute of Hygiene in 1968	12