

TAVUK TIFOSU'na KARŞI AŞI ÜRETİLMESİ ÇALIŞMALARI (1)

Yavuz SAYIM (2)

Ayten AKMAN (3)

GİRİŞ :

Tavuk Tifosu, kanatlı hayvanların salmonella gellinarum tarafından meydana getirilen septisemik tabiatte seyreden enfeksiyöz ve salgın bir hastalıdır. Son yıllarda Ülkemiz tavuklarında artan bir hızla yayılma istidadı göstermekte, büyük oranda ölüm ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Hastalık yatay bulaşım yolları (yem, su, kümes ekipmanları, fare ve yabani kuşlar, nakil vasıtaları, viol ve benzeri vasıtalar) yanında dikey yolla da (kuluçkalık yumurta ile) yayıldığından ayrıca önem taşımaktadır.

Hastalıkla mücadele ve kontrol altına alınmasında çeşitli yöntemler yanında aşı tatbikatından da yararlanılması düşünülmüş ve bu maksatla attenüe ve inaktif aşilar üretilerek uygulanmıştır. Fakat inaktif aşilarla yeterli bağışıklık sağlanamamış; attenüe suşlarla üretilen aşilar ise civcivlerde ölümlere sebep olması, erginlerde yumurta verimini düşürmesi ve en önemlisi kanda aglutininler oluşturması gibi sakıncaları görüldüğünden mücadelede kullanılmamıştır. (3-6)

-
- (1) Bu çalışma T.H. 83/2-A nolu proje desteği ile yürütülmüştür.
 - (2) Etilik Vet. Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Tavuk Hastalıkları Lab. şefi.
 - (3) Etilik Vet. Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Tavuk Hastalıkları Lab. uzmanı.

Aşı üretiminde patojen olmayan raf karakterdeki 9R salmonella gallinarum suşu ile hazırlanan aşılarından iyi sonuçlar alındığı ve bu aşıların patojen etkisinin olmaması yanında (S) karakterdeki suşlara karşı aglutininler oluşturmadığı izlenmiştir. (3-6) Halen batı Ülkelerinde 9^R suşu ile hazırlanmış aşıların üretilmekte olduğu bildirilmektedir. (1,3,4,5,6,7)

Ülkemizde de Arda ve Arkadaşları 9R suşu ile hazırladıkları aşıdan olumlu sonuçlar aldıklarını bildirmişlerdir. (1)

MATERYAL ve METOD :

A — Suşlar : 1-Aşı Suşu : Apatojen ve R (rough) karakterde olan 9R Salmonella Gallinarum suşudur. Bu suş (S) karakterdeki Sal. Gallinarum suşlarına karşı kanda aglutininler oluşturmamaktadır. 24.2.1981 tarihinde weybridge/İngiltere'den getirilmiş ve çoğaltılıp liyofilize edilerek laboratuvarımızda muhafaza edilmektedir.

2 — Eprüve Suşu : 1981 yılında Amasya'daki bir çiftlikte seyreden tavuk tifosu vak'asından izole edilmiştir. Patojen ve (S) Smooth karakterdedir.

B — Besi Yerleri :

1 — Besi Buyyonu : Beef extract 0.4 %, pepton 2 %, NaCl 0.5 %.

2 — Kolloidal Sülfürlü Agar : (Beef extract 0.4 %, pepton 2 %, gliserin 2 %, NaCl 0.5 %, Kolloidal sülfür 0.1 %, agar 3 %) Formülüne uygun olarak hazırlanan agar roux buatlarına 150 ml. miktarında tevzi edilip sterilize edilmiştir.

3 — MacConkey Agar.

4 — Zenginleştirilmiş kanlı agar.

C — Aşı Sulandırma Sıvısı : Aşı hazırlanmasında, sulandırma sıvısı ve adsorban madde olarak Alüminyum Hidroksit ($Al(OH)_3$) jeli kullanılmıştır. Jel hazır olarak Şap Enstitüsü'nden temin edildi. Aktivitesi kongo kırmızısı ile (1 ml. $Al(OH)_3$ jeli + 17 ml. 0.077 % lik kongo kırmızısı sol.) kontrol edildikten sonra 25 % oranında alüminyum hidroksit jeli içerecek şekilde normal serum fizyolojik ile seyreltilip PH : 7 ye ayarlandı ($NaHCO_3$ ile) ve şişelere 100 ml. miktarında tevzi edilerek sterilize edildi.

D — Biyolojik Maddeler :

1 — Spesifik Tifo Serumu : Genel metodlara göre S suşu ile tavşanlardan hiperimmün serum hazırlanmıştır.

2 — 9R Antijeni : 9R suşu ile «Kanatlıların Pullorum ve Gallinarum hastalıkları mücadele yönetmeliği» esaslarına göre Plate-test antijeni üretildi.

3 — Pullorum Antijeni : Pendik Vet. Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde üretilen Pullorum plate-test antijeni kullanıldı.

E — Deneme Piliçleri :

Bu çalışma için Ankara Tavukculuk Araştırma Enstitüsü'nden 15.5.1983 tarihinde 250 adet kahverengi (otoseks) dişi civciv alınmış ve büyütülmüştür. Deneme piliçleri, çalışma süresi içinde yem sanayii'nin antibiyotik ve benzeri madde içermeyen yemiyle beslenmiştir. Piliçler altı haftalık yaşa gelince (29.6.1983) hazırlanan aşı ile aşılandılar.

F — Aşının Hazırlanması :

Aşı alüminyum hidrokside adsorbe canlı bakteri aşısıdır. Bir dozunda en az 5×10^7 (50 milyon) adet canlı sal. gallinarum bakterisi bulunmaktadır. Muhafazasını kolaylaştırmak ve dayanma süresini uzatmak için aşı liyofilize edilmiştir. Sulandırma sıvısı (% 25 alüminyum hidroksit jeli ihtiva eden tuzlu su) ayrı bir şişede bulunmaktadır. Kullanılacağı zaman liyofilize aşı muhteviyatı sulandırma sıvısına transfer edilerek adsorbsiyonun temini için en az 10 dakika çalkalanmıştır. Bu süre sonunda aşı, alüminyum hidroksidin sedimente olması için, yarım saat dinlenmeye bırakılmış ve üstteki sıvıdan kanlı agar plaklarına ekimler yapılarak adsorbsiyonun tam olup olmadığı kontrol edilmiştir. Sonuçta 10 dakikalık çalkalama ile % yüze yakın bir adsorbsiyon elde edildiği saptanmıştır.

Aşı Suşunun 24 saatlik buyyon kültüründen roux buatlarındaki agara ekimler yapılarak 72 saat süreyle inkübe edildi. Süre sonunda agar yüzeyleri 25 er ml serum fizyolojik ile yıkanarak elde edilen bakteri süspansiyonları tülbentten süzülerek ayrı erlenlerde toplandı ve temizlik kontrolleri yapıldı. Temiz çıkan erlen muhteviyatları kollekte edildi ve 3000 RPM/30 dakika/ + 4°C de santrifüje edildi. El-

de edilen bakteri depositosu muayyen miktar liyofilizasyon sıvısı ile dilüe edilerek stok bakteri süspansiyonu elde edildi. Bunun 1 ml. deki canlı bakteri miktarı, koloni sayma metodu ile, tesbit edildikten sonra liyofilizasyon sırasında olabilecek bakteri kayıplarında dikkate alınarak aşının bir dozunda bulunması öngörülen bakteri miktarının % 50 fazlası (7.5×10^9 canlı bakteri/1 ml./100 doz aşı) bakteri içerecek şekilde liyofilizasyon sıvısı ile sulandırıldıktan sonra şişelere 1 ml. miktarında (100 doz) tevzi edilip liyofilize edildi.

Liyofilizasyon sonunda bakteri sayımı yapıp uygun bulunan aşı rekoltü üç gruba ayrılarak her bir grup sırasıyla (aşının en uygun muhafaza şekli ve dayanma süresinin tesbiti gayesiyle) oda ısısı, + 4°C ve — 18°C de muhafaza altına alındı.

G — Aşının Uygulanması :

100 dozluk bir şişe aşı muhteviyatı sulandırma sıvısına nakledildi. Adsorbsiyonun temini için 10 dakika çalkalandıktan sonra 6 haftalık deneme piliçlerinin boyun derisi altına 1 ml. miktarında enjekte edildi.

H — Eprüve suşunun patojenitesinin tayini (LD 50)

Patojen suşun 24 saatli kbuyyon kültüründen, 1 ml. de sırasıyla 2,5; 5,0; 7,5 milyar canlı bakteri olacak şekilde, bakteri süspansiyonları hazırlandı. Her konsantrasyondan 5 er adet aşısız piliçe (1 aylık yaşta) adale içi yolla 1 er ml. miktarında enjekte edilerek hayvanlar 3 hafta süre ile gözlem altında tutuldu. Gözlem süresi içindeki ölüm miktarına göre LD 50 tesbit edildi. Çizelge : 1

Birinci eprüvasyonda, LD 50 = 5 milyar bakteri/1 ml. kullanılmış isede 2 ve 3 cü eprüvasyonlarda deneme piliçlerinin yaşlarının ilerlemiş olduğu dikkate alınarak LD 50 nin bir üst derecesi ile (7,5 milyar bakteri/1ml.) enfekte edilmişlerdir.

| Çizelge : 1 | | (LD 50 Tayini) | Ölenler Canlılar | |
|-------------|---------|------------------------------------|------------------|---|
| Grup 1 | 5 piliç | (2.5×10^9 bakteri/1 ml.) | 1 | 4 |
| Grup 2 | 5 » | (5.0×10^9 bakteri/1 ml.) | 3 | 2 |
| Grup 3 | 5 » | (7.5×10^9 bakteri/1 ml.) | 5 | 0 |

LD₅₀ : 5×10^9 bakteri/1 ml.

I — Bakteri Sayımları :

Aşıda bulunan canlı bakteri sayısını tesbit gayesiyle yapıldı. İki şişe liyofilize aşı alındı ve 1'er ml. tuzlu su ile sulandırıldıktan sonra biraraya toplandı. Bundan 10^{-1} 10^{-9} kadar dilusyonlar hazırlandı. 10^{-7} , 10^{-8} ve 10^{-9} dilusyonlarından 2 şer adet kanlı agar plağına sırasıyla 0.1, 0.2, ve 0.5 ml. miktarında yayılıp 18-24 saat inkube edildikten sonra üreyen koloniler sayılarak aşının 1 dozunda bulunan canlı bakteri miktarı tesbit edildi. Çizelge : 5

J — En Uygun Liyofilizasyon Sıvısının Tesbiti :

Aşının liyofilizasyonu sırasında en az bakteri zayıyatını temin eden çözelti araştırılmış ve bu gayeyle 4 ayrı çözelti paralel olarak liyofilizasyonda kullanılarak en az bakteri ölümüne sebep olan sıvı saptanmıştır.

- Çözelti a- Sakkaroz 5 % + Casiton 2.5 + Sodyum glukomat 1 %
» b- Sakkaroz çözeltisi (8.5 %)
» c- Süt Çözeltisi (2.5 % süt tozu çözeltisi)
» d- 2 kısım besi buyyonu + 1 kısım koyun kan serumu

Çalışma sonunda en uygun liyofilizasyon sıvısının (d) çözeltisi olduğu görülmüştür.

K — Serolojik Test'ler (Çabuk kan aglutinasyon test'i)

Eprüvasyonlar öncesinde aşı ve kontrol piliçleri 9R ve pullorum antijenleri ile ayrı ayrı test'e tabi tutuldular. Aşısız kontrol piliçleri her iki antijenle de olumsuz; aşı piliçler 9R antijeni ile olumlu ve pullorum antijeni ile olumsuz reaksiyon verdiler.

BULGULAR ve SONUÇ

Aşılama sonrası gözlenimi :

Aşılanan piliçler aşılamayı takibeden 3 haftalık süre içinde klinik olarak hiçbir hastalık belirtisi göstermediler.

A — Aşının Koruma Gücünün Saptanması (Eprüvasyonlar) :

Aşılamayı takibeden 1,3 ve 6 cı aylarda hayvanlara 3 eprüvasyon uygulanmıştır. Eprüvasyonlarda 40 ar adet aşı ve 10 ar adet

aşısız kontrol piliç kullanılmış ve eprüvasyonu takibeden 3 hafta süreyle hayvanlar gözlem altında tutularak aşının koruma gücü saptanmıştır. Çizelge : 2,3,4.

Çizel : 2 — Birinci Eprüvasyon Sonuçları (aşılamanın 1. ayında)

| | Aşılı piliç adedi | Aşısız piliç adedi |
|-------------------------------|-------------------|--------------------|
| Kullanılan piliç ad. | 40 | 10 |
| Ölen (3 hafta içinde) | 4 | 9 |
| Canlı kalan (3 hafta sonunda) | 36 | 1 |

Aşının Koruma Gücü : Aşılıların yaşayanlarının yüzde miktarı(-)
kontrollerin yaşayanlarının yüzde miktarı
= 90 % - 10 % = 80 %

Çizelge : 3 — İkinci Eprüvasyon Sonuçları (aşılamanın 3. ayında)

| | Aşılı piliç | Aşısız piliç |
|-------------------------------|-------------|--------------|
| Kullanılan piliç adedi | 40 | 8 |
| Ölen (3 hafta içinde) | 4 | 6 |
| Canlı kalan (3 hafta sonunda) | 36 | 2 |

Aşının Koruma Gücü = 90 % — 25 % = 65 %

Çizelge : 4 — Üçüncü Eprüvasyon (aşılamanın 6. ayında)

| | Aşılı piliç | Aşısız piliç |
|-------------------------------|-------------|--------------|
| Kullanılan piliç adedi | 40 | 10 |
| Ölen (3 hafta içinde) | 17 | 8 |
| Canlı kalan (3 hafta sonunda) | 23 | 2 |

Aşının Koruma Gücü : 57.5 % - 20 % = 37.5 %

B — Aşının En Uygun muhafaza ısısı ve dayanma süresinin tesbiti :

Üretilen liyofilize aşı üç gruba ayrılarak her gir grup sırasıyla oda ısısı; + 4°C ve - 18°C de muhafaza edildi. Her gruptan 2 şer ay aralıklarla bakteri sayımları yapıldı. Sekiz ay süreyle bu kontroller tekrarlanarak meydana gelen bakteri kaybı tesbit edildi. Alınan sonuçlar çizelge 5 de görülmektedir.

Çizelge : 5 — Bakteri Sayımı Sonuçları

| Kontrol Süreleri | Bakteri sayıları | | |
|--|------------------|---------|---------|
| | Oda ısısında | + 4°C | — 18°C |
| 1 — Liyofilizasyon sonrası bakteri sayısı (100 doz aşındaki miktar) | 6,213 x | 6,213 x | 6,213 x |
| 2 — Liyofilizasyondan 2 ay sonra | 1,693 x | 5,108 x | 6,374 x |
| 3 — » 4 » » — | — | 4,550 x | 5,004 x |
| 4 — » 6 » » — | — | 6,693 x | 6,768 x |
| 5 — » 8 » » — | — | 6,353 x | 6,643 x |

X = 1 milyar bakteri

Çizelgenin tetkikinde bakteri sayımları arasında bir uyum olmadığı görülmekte isede bunun laboratuvar hatalarından kaynaklandığı kabuledilmiştir. Çünkü son sayımlarda (6 ve 8. ay sayımları) bulunan neticeler birden fazla sayımın ortalaması sonunda bulunmuş ve kesin sonuç olarak kabuledilmiştir.

Bu sonuçlara göre liyofilize aşı + 4°C ve — 18°C lerde 8 ay süreyle titresini korumaktadır. Oda ısısında muhafazada ise kısa zamanda aktivitesini kaybetmektedir.

TARTIŞMA

Bu araştırmada 9R suşu ile hazırlanan alüminyumhidrokside adsorbe tifo aşısının tavuklarda yüksek bir immunité meydana getirmediği görülmüştür. Aşı kahverengi tavukları ancak 3 ay süreyle ve 65 % oranında enfeksiyona karşı korumaktadır.

Aşı, uygulanan hayvanlarda stres ve ölümlere sebep olmamış; yumurta verimini olumsuz yönde etkilememiştir. Aynı zamanda hayvanların kanında (S) karakterdeki suşlara karşı aglutininler de oluşturmamıştır. Bu özellikler olumlu yönde değerlendirilmiştir.

Aşının diffiriz ve buzdolabında 8 ay süreyle aktivitesini koruması yine olumlu olarak değerlendirilmiştir.

Aşının 3 ay gibi kısa bir süreyle hayvanları tifo enfeksiyonuna karşı ancak 65 % oranında koruyabilmesi olumsuz yönde değerlendirilirse de tifo enfeksiyonunun ülkemiz kanatlıları arasında hızla yayılma istidadı gösterdiği dikkate alındığında, fazla bulaşık yörelerde hastalıkla mücadelede diğer yöntemler yanında aşı uygulamalarının da faydalı olacağı kanaatine varılmıştır.

ÖZET

Bu çalışmada, tavuk tifosuna karşı 9R suşu ile alüminyum hidroksid'e adsorbe canlı aşı hazırlandı. Aşının 1 dozunda en az 50 milyon adet canlı bakteri vardı. Aşı liyofilize edilerek muhafaza edildi. Kullanılacağı zaman alüminyum hidrokside adsorbe ettirildi. Adsorban sıvı, % 25 alüminyum hidroksit jeli ve 75 % serum fizyolojik içeriyordu.

Aşılama 6 haftalık kahverengi piliçler kullanıldı ve aşılama takibeden 1,3 ve 6. aylarda hayvanlar eprüve edilerek sırasıyla 80 %, 65 % ve 37.5 % koruma gücü saptandı.

Aşının en uygun muhafaza ısısı ve dayanma süresini tesbit için yapılan çalışmada, liyofilize aşının + 4°C ve — 18°C de saklanması halinde 8 ay süreyle aktivitesini koruduğu saptandı.

SUMMARY

In the study a live vaccine adsorbed to aluminium hydroxide gel was prepared against thyphus gallinarum using the strain of 9R. There was at least 5.10^7 living bacteria in each dose of the vaccine. The vaccine was lyophilized and was adsorbed to Al (OH)₃ 25 % and saline solution 75 %. In the experiments brown coloured race of chickens were used. After vaccinations 1,3 and 6 months later chal-langes have been made and proctive power was found 80 % 65 % and 37.5 % respectively.

The lyophilized vaccine was found effective for at least 8 months at the + 4°C and — 18°C temperature. It has been inactive in a very short time at the room temperature.

LİTERATÜR

- 1 — ARDA, M., AKYOL, İ., KAHRAMAN, M. (1970). Salmonella Gallinarum enfeksiyonuna karşı dömlü tavuk yumurtalarında aktif ve inaktif aşı hazırlanması üzerinde araştırmalar. Vet. Fak. Dergisi Cilt : 17.
- 2 — BAŞKAYA, H., MİNBAŞ, A. (1979). Kumes Hayvanları Hastalıkları, Ank. Ün. Vet. Fak. yayınları No : 354
- 3 — CAN, S. (1971). Kanatlı Tifosu. Bornova Vet. Araşt. Enst. Dergisi sayı : 20-21
- 4 — CRUHİCKAHANK, G. (1981). Vaccination for fow typhoid. World Poultry Industry (may 1981), England.
- 5 — WILSON, J.E. (1956). Fowl typhoid. Vet. Rec. 68, 664-668
- 6 — GORDON R.F. (1977). Fowl Typhoid, Poultry Diseases, New York
- 7 — POMERY, B.S. (1975). Diseases of poultry. The Iowa State University press/USA
- 8 — T.B. Vet. İşleri Genel Müdürlüğü (1967) Kanatlıların Pullorum ve Gallinarum hastalığı yönetmeliğı.

TAVUK SERUMLARINDA LİSTERİA MONOCYTOGENES'E KARŞI ANTİKOR ARANMASI

Ayten AKMAN (*)

GİRİŞ

L. Monocytogenes dünyada çok geniş yayılım gösteren ve bugün en az 35 memeli ve 17 kanatlı türünde görüldüğü bildirilen bir zoonozdur.

L. monocytogenes'in neden olduğu hastalıklar koyun, keçi, sığır, domuz, at, köpek, kedi gibi evcil hayvanlarda, yabani kemiricilerde, kuşlarda ve kümes hayvanlarında sporadik olarak görülmekte ve ve bazen enzootilere yol açmaktadır. İnsanlarda sporadik menenjit, granulomatosis infantiseptica, anjin, meningo encefalitis, konjunktivitis, üst solunum sistemi enfeksiyonları, abortus ve ölü doğumlara neden olan L. monocytogenes üzerinde son yıllarda daha fazla çalışma yapılmaktadır.

Listeria gr (+) 1,2 mikrometre boyunda, 0,3-0,5 mikrometre eninde, sporsuz, aside dayanıksız, hareketli ve çomak şeklinde bir mikroorganizmadır. + 4 ile 38°C arasında üreyebilmektedir. Hareket peritrich olan kirpiklerle sağlanır. Aerob ve fakültatif anaerobdur. Optimal üreme derecesi 30 - 37°C olup pH 7,2-7,6 dır. Besi yerlerinde pH düşüklüğü R koloni oranını artırır. Patogen suşlar S karakterdedir. (2,17,19,21,25,26).

(*) Etlik Vet. Kont. ve Araşt. Enst. Uzman Vet. Hek.

L. monocytogenes ile serolojik çalışmalar 1935 de Seaston tarafından yapılmıştır. Schultz ve arkadaşları ile Julianella ilk defa bu grup organizmalarda 2 belirli serolojik grubun varlığından bahsetmişlerdir. Julianella bu grupları Tip 1 veya kemirici suşu ve Tip 2 veya ruminant suşu olarak belirledi. Daha sonra Paterson *Listeria* sınıfını Flageller (H) ve Somatik (O) antijenlere dayandırarak 4 sero tipe ayırdı. Robbins ve Griffin somatik antijeni I, II, III, IV, V ve kirpik antijenlerini de a, b, c, d olarak ifade etmişlerdir.

Seeliger orjinal Tip grup 4'ü somatik antijenlerine dayandırarak 4 a ve 4 b'ye ayırdı. Daha sonra Donker Woet somatik antijenlerine göre bu gruba 4 c, 4 d, 4 e alt gruplarını ekledi. Bunun yanında aynı araştırmacı bazı 1 ve 3 tip kültürlerinde flageller antijende çok az farklılıklar tesbit ederek bunları Tip 1 ve Tip 3 a olarak düzenledi. (9,10,11,19).

Çeşitli tiplerin bugün kabul edilen antijenik yapıları tablo (1) deki gibi ifade edilmektedir. B kirpik antijeni bütün tiplerde ortaktır. Ayrıca H ve O daki ortak antijenler dolayısıyla tipler arasında kross aglutinasyon görülür. Antijenik yapı ile hastalığın yayılışı ve konakçı arasında bir ilgi bulunamamış fakat az olarak coğrafik yerleşmeye bağlı olduğu saptanmıştır. (11, 19) Killinger ve arkadaşları A.B.D'lerinde bakteriyolojik olarak doğrulanan 700 *Listeria* olgusunda (insan menşeli) % 35'i tip 1 ve % 65'i tip 4 b olarak tesbit etmişlerdir. Kom Pelmacher ve arkadaşları (1956-1960) insan ve hayvan menşeli 475 suşta 1/3 ünün Tip 1 ve 2/3'ünde Tip 3 olduğunu ifade etmişlerdir. King (1959) izole edilen 100 suştan 24'ünün Tip 1 birinin Tip-3, dördüncü Tip 4 a ve 71'inin 4 b olduğunu bildirmiştir. (9,11,14,19).

Yeni doğmuş çocuklarda, mekonyum, safra, viscera ve idrardan, kadınların serviksinden *L. monocytogenes* izole edildiği açıklanmıştır (5,7,8,18,19,20,25,26,27).

Ülkemizde ise hastalık ilk defa 1945 yılında Bandırma Merinos Çiftliğinde koyunlarda tesbit edilmiş ve koyunların beyinlerinden *L. monocytogenes* üretilmiştir (18).

Tavuklarda *Listeria* ilk defa 1932 yılında Ten Broeck tarafından Princeton Üniversitesinin damızlık sürüsündeki piliçlerden izole edilmiştir (21). İngiltere'de Paterson (1937) 4 tavuk sürüsünde meydana gelen ölümlere *Listeria*'nin neden olduğunu saptamıştır. Daha sonra bazıları generalize tabiatlı ve diğerleri masif myokardial nekrozlu fa-

Tablo : 1
Listeria'ların Antijenik Yapısı

| SEROTİP | O FAKTÖRLERİ | H FAKTÖRLERİ | ANTİJEN ABSORBSİYON | SPESİFİK FAKTÖRLER |
|---------|---------------------|--------------|---------------------|--------------------|
| 1a | I,II,(III) | A,B | Tip 3 0 | I |
| 1b | I,II,(III) | A,B,C | Tip 1I veya H | C |
| 2 | I,II,(III) | B,D | Tip 1 H | D |
| 3aa | II,(III),IV | A,B | Tip 1a veya 2 0 | IV |
| 3b | II,(III),IV | A,B,C | Tip 1a H | C |
| 4a | (III),(V),VII,IX | A,B,C | Tip 4c 0 | IX |
| 4b | (III),V,VI | A,B,C | Tip 4a 0 | VI |
| 4c | (III),V,VIII | A,B,C | Tip 4b 0 | VII |
| 4ab | (III),V,VI,VII,IX | A,B,C | Tip 4c 0 | VI,IX |
| 4d | (III),VI,VIII | A,B,C | Tip 4b 0 | VIII |
| 4e | (III),V,VI,VIII,IX | A,B,C | Tip 3 0 | V,VI,VIII,IX |
| 4f | (III),V,XV | A,B,C | | |
| 5 | (III),(V),VI,VIII,X | A,B,C | | |
| 6 | (III),VII,VIII,XI | A,B,C | | |
| 7 | (III),XII,XIII | A,B,C | | |
| L.grayi | (III),XIII,XIV | A,B,C | | |

kat genellikle tek tek veya sporadik olgulardan Amerika'da Cole (1941), Hurt, Levine ve Gingham (1941) Hoffman ve Lenanz (1942) Kanada'da Bigland (1950) Listeria izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Bu çalışmamızda Listeriosisin epidemiyolojisini aydınlatmada kanatlıların diğer evcil hayvanlar ve insanlar için ne derecede bir kaynak oluşturabileceği ele alınmış ve bu yönden serolojik bir araştırma amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Serumlar : Sinsan Tavuk mezbahasında ve Etlik Vet. Kont. ve Araşt. Enst. Tavuk Teşhis Lâb.na getirilen 160 tavuktan kan alınarak serumları çıkarıldı. Serumlar 56°C de 30 dk. inaktive edildi.

Suşlar : L. monocytogenes Tip-I, II, III, 4a ve 4b suşları, A.Ü. Vet. Fak. Bakteriyoloji ve Salgın Hastalıklar Kürsüsü ve A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Kürsüsünden temin edildi.

Besiyerleri : Kanlı agar, triptoz, buyyon, agar, Nutrient buyyon, PKP buyyonu Sorensen PBS solusyonu.

Kontrol Serumları : L. monocytogenes Tip, I,II,III, 4a ve 4b tipleri için spesifik (+) ve (—) kontrol serumlar A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyolojik ve Parazitoloji Kürsüsünden temin edilerek tipleri saptandı.

Antijenlerin Hazırlanması :

Larsen ve Jones (7) tarafından tanımlanan antijen hazırlama tekniği ile L. monocytogenes serotip I,II,III 4a ve 4b suşlarından ayrı ayrı antijen hazırlandı.

1 — Yukarıdaki yazılı suşların önce kanlı agara ekimleri yapıldı 24 saat 37°C bekletildi. Ertesi gün üreyen S. kolonilerinden birer tane seçilerek triptoz buyyona aktarıldı.

24 saat 37°C de inkübe edildiler ve böylece saf kültürler hazırlandı.

2 — Buyyon kültürlerinden kontaminasyon kontrolü (boyanarak) yapıldıktan sonra, her suş için 4 adet Roux şişesine steril pipet ile 5 ml miktarında aktarıldı.

3 — Roux şişelerinde üreyen Listeria'lar ertesi gün steril serum fizyolojik ile toplandı. Boyanarak kontaminasyon kontrolleri yapıldı.

4 — Hazırlanan bakteri süspansiyonu her suş için 2 kısma ayrıldı.

5 — Balonun birisi H, Antijenleri için ve diğeri O antiijenleri için kullanıldı.

6 — H. antiijeni için süspansiyona son konsantrasyonu % 0,5 olacak şekilde formalin ilave edildi. Bir gece buzdolabında + 4°C de bekletildi. Ertesi gün 3 defa santrifüj ile Sorensen PBS solüsyonu kullanılarak yıkandı.

7 — Üçüncü yıkamadan sonra MC farland 3'e tekabül etmek üzere sorenson PBS tamponu ile dilüe edildi.

8 — O-antijeni için, bakterileri ihtiva eden süspansiyon su banyosunda 100°C de 1 saat kaynatıldı.

9 — Sorenson'in PBS solüsyonu kullanılarak santrifüjle 3 defa yıkandı.

10 — O-antijenleri konsantre olacak şekilde yeniden sulandırıldı ve üzerine 9 cc. ye 1 cc % 1 lik tripsin solüsyonundan ilave edildi. 37°C de 15 dakika bekletildi.

11 — O antijenleri 2 kez daha yıkanarak Mc Farland 3'e tekabül etmek üzere Sorenson PBS tamponu ile dilüe edildi.

LİSTERIA ÜREME İNHİBİTİON AGLUTİNATION TEST

1 — Testte mikroorganizmaların 24 saatlik Nutrient buyyon kültürü kullanıldı.

2 — Serum örnekleri 56°C de yarım saat inaktif edildikten sonra aşağıdaki tarzda dilüe edildi.

Birinci tüpe 3.84 ml. PKP buyyonu 0.16 ml. test serumu kondu. Diğer tüplere 2 ml. PKP buyyonu kondu. İlk tüp 2 ml. ikinciye 2 ml. üçüncüye... dilüsyonları yapılarak son tüpten 2 ml. dışarı atıldı. Böyle 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400 ve 1 : 800 dilüsyonları hazırlandı. Bir tüp pozitif bir tüp negatif kontrol ilave edildi.

3 — Her tüpe 24 saatlik mikroorganizma kültüründen bir damla konup tüpler kapatılarak 24 saat 37°C de inkübe edildi.

Sonuçların Okunması

(+) Üst sıvı berrak, dipte kenorları kıvrımlı çökelti.

(+) Üst sıvı berrak değil, fakat dipte çökelti.

(—) Üst sıvı bulanık dipte tortu yok (13)

Tüp Dilüsyon Metodu ile Yapılan Aglutinasyon Deneyi

1 — Şüpheli serumlar 56°C de yarım saat inaktive edildi.

2 — Seri dilüsyon metodu (6) uygulanarak birinci tüpe 0,9 cc tuzlu su diğer tüplere de 0,5 cc. tuzlu su kondu.

3 — Birinci tüpe 0,1 cc. şüpheli serum ilave edildi. İyice karıştırıldı, böylece serum sulandırımı 1/10 olmuştur. Buradan alınan 0.5 cc ikinci tüpe, 2. tüpten alınan 0,5 cc üçüncü tüpe 0,5 cc üçüncü tüpe ve diğer seri tüplere aktarmak suretiyle birer misli sulandırılmıştır. Sulandırma yapılırken, kontrol tüp sulandırma dışı bırakılmıştır.

4 — Her tüpe 0,5 cc antijen ilave edildi ve tüpler iyice çalkalandı. H aglutinasyonu için etüvde 2 saat ve oda ısısında yarım saat bekletildi.

O aglutinasyonu geç teşekkül ettiğinden etüvde 2 saat oda ısısında 24 saat bekletilerek sonuçlar okundu (5,15).

(+) sonuç veren tüplerin H aglutinasyonunda büyük kümeler oluştuğu O-aglutinasyonunda küçük nokta şeklinde kümelerin oluştuğu gözlemlendi.

1/320 dilüsyonda pozitif reaksiyon vermesi, hastalığın teşhisi için kriterdir ve bu dilüsyon pozitif kabul edilir (5,11,19).

BULGULAR :

L.monocytogenes Tip I,II,III, 4a, ve 4b suşları kanlı agar, triptoz buyyonu nutrient buyyon ve agarda 24 saatte ürediler. Kanlı agarda hemoliz, buyyonda homojen bir bulanıklık yaptığı ve tüpün dibinde tortu oluşturduğu görüldü.

Kültürler gram boyama metoduyla boyanıp mikroskopta incelendi ve lâmlâmel arası metoduyla yapılan hareket kontrolunda L. monocytogenes'in beş serotipin de hareketi gözlemlendi.

O antijenlerinin Homolog Serumlarla Olan Titreleeri :

| | | |
|-----------------|-------|-------------|
| L.monocytogenes | Tip 1 | 2560 |
| » | » | » 2 2560 |
| » | » | Tip 3 1280 |
| » | » | Tip 4a 2560 |
| » | » | Tip 4b 2560 |

H antijenlerinin Homolog Serumlarla Olan Titreleeri :

| | | |
|-----------------|-------|-------------|
| L.monocytogenes | Tip 1 | 1280 |
| » | » | Tip 2 2560 |
| » | » | Tip 3 1280 |
| » | » | Tip 4a 1280 |
| » | » | Tip 4b 2560 |

İmmun Serumların Titreleeri

L. monocytogenes Tip I,II,III, 4a ve 4b serotiplerinin titreleeri 1/2560 olarak saptandı.

Serum örnelelerine L. monocytogenes Tip I,II,III, 4a, 4b serotiplerinin O ve H antijenleri ile ayrı ayrı serum aglutinasyon testi uygulandı. Ayrıca bu serumlar Listeria üreme inhibition ve Aglutinon test ile de araştırıldı. Her 2 testte reaksiyon veren 20 serum örneğinin sonuçları Tablo 2 ve 3 te gösterilmiştir.

L. Monocytogenes O antijeniyle yapılan aglutinasyon testlerine 160 serum örneğinden 1 tanesinde pozitif reaksiyon gözleendi. Bu serum 5 tiple de 1/1280 dilüsyonda aglutinasyon verdi.

H. antijenleri ile yapılan aglutinasyon testinde 3 ve 4b tipleri 320, 1,2, 4a tipleri 1/640 dilüsyonda aglutinasyon vermiştir.

160 serum örneğinden 140 tanesinde hiç reaksiyon görülmedi, 19 tanesi çok düşük titre verdi, 1 tanesi ise pozitif bulundu.

Tablo : 2
O-ve-H-Antijenleriyle Reaksiyon veren Şüpheli Serumların Aglutinasyon
Test Sonuçları

| | Serotip I | | Serotip II | | Serotip III | | Serotip 4a | | Serotip 4b | |
|----|-----------|--------|------------|--------|-------------|--------|------------|--------|------------|--------|
| | H | O | H | O | H | O | H | O | H | O |
| 1 | 1/140 | 1/140 | — | 1/20 | 1/10 | 1/20 | 1/20 | 1/10 | 1/20 | 1/20 |
| 2 | — | 1/20 | 1/20 | 1/40 | 1/20 | 1/10 | 1/20 | 1/10 | — | 1/20 |
| 3 | 1/140 | 1/80 | 1/20 | 1/20 | 1/10 | 1/20 | 1/40 | 1/10 | 1/20 | 1/20 |
| 4 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/20 | — | — | — | 1/10 | 1/10 | 1/10 |
| 5 | 1/20 | 1/20 | 1/10 | 1/10 | 1/20 | 1/20 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/10 |
| 6 | 1/140 | 1/80 | 1/10 | 1/40 | 1/10 | 1/20 | 1/20 | — | 1/20 | 1/140 |
| 7 | — | — | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/20 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/10 |
| 8 | 1/20 | 1/140 | — | 1/10 | 1/20 | 1/20 | — | — | 1/10 | 1/10 |
| 9 | 1/20 | 1/140 | 1/20 | 1/40 | 1/10 | 1/40 | 1/20 | 1/20 | 1/20 | 1/20 |
| 10 | 1/640 | 1/1280 | 1/640 | 1/1280 | 1/320 | 1/1280 | 1/640 | 1/1280 | 1/320 | 1/1280 |
| 11 | 1/10 | 1/10 | 1/20 | 1/20 | 1/10 | 1/20 | 1/10 | 1/20 | 1/10 | 1/20 |
| 12 | 1/20 | 1/20 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/20 | 1/10 | 1/20 | 1/20 | 1/20 |
| 13 | 1/10 | 1/20 | 1/10 | 1/20 | — | — | 1/20 | 1/40 | 1/10 | 1/10 |
| 14 | 1/10 | 1/20 | 1/10 | 1/20 | 1/10 | 1/20 | 1/20 | 1/20 | 1/20 | 1/20 |
| 15 | — | — | 1/10 | 1/20 | — | — | 1/10 | 1/20 | 1/20 | 1/40 |
| 16 | 1/10 | 1/10 | 1/20 | 1/20 | 1/20 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/20 | 1/20 |
| 17 | 1/10 | 1/10 | 1/20 | 1/20 | 1/10 | 1/10 | 1/20 | 1/20 | 1/20 | 1/20 |
| 18 | — | 1/10 | — | — | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/20 | — | — |
| 19 | 1/20 | 1/20 | 1/10 | 1/20 | 1/20 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/10 |
| 20 | 1/140 | 1/80 | 1/40 | 1/40 | 1/20 | 1/40 | 1/20 | 1/80 | 1/20 | 1/20 |

Tablo : 3

Üreme İnhibition Aglutination Test Sonuçları

| | Serotip I | Serotip II | Serotip III | Serotip 4a | Serotip 4b |
|----|-----------|------------|-------------|------------|------------|
| 1 | 1/25 | 1/50 | 1/25 | 1/25 | 1/50 |
| 2 | — | 1/50 | 1/50 | 1/25 | 1/50 |
| 3 | 1/50 | 1/50 | 1/50 | 1/50 | 1/50 |
| 4 | 1/25 | 1/50 | 1/50 | 1/50 | 1/50 |
| 5 | 1/50 | 1/100 | 1/100 | 1/50 | 1/100 |
| 6 | 1/100 | 1/100 | 1/50 | 1/100 | 1/200 |
| 7 | 1/50 | — | 1/50 | 1/25 | 1/25 |
| 8 | — | 1/25 | 1/50 | 1/50 | 1/50 |
| 9 | 1/100 | 1/25 | 1/100 | 1/50 | 1/200 |
| 10 | 1/800 | 1/400 | 1/400 | 1/400 | 1/400 |
| 11 | — | — | 1/50 | — | 1/25 |
| 12 | 1/200 | 1/200 | 1/100 | 1/50 | 1/100 |
| 13 | 1/100 | 1/200 | 1/100 | 1/100 | 1/100 |
| 14 | 1/200 | 1/200 | 1/100 | 1/100 | 1/100 |
| 15 | — | — | 1/100 | 1/100 | 1/100 |
| 16 | 1/50 | 1/25 | 1/25 | 1/25 | — |
| 17 | 1/50 | 1/50 | 1/25 | 1/50 | 1/50 |
| 18 | 1/100 | 1/25 | — | — | 1/25 |
| 19 | 1/25 | 1/50 | 1/50 | 1/50 | 1/50 |
| 20 | 1/50 | 1/25 | 1/25 | 1/25 | — |

TARTIŞMA

Listeriosis tanısında bakteri izolasyonunun güçlüğü nedeniyle serolojik yöntemler özellikle aglutinasyon kullanıldığı bildirilmektedir. Fakat hastalığın görülebildiği normal canlıların yarıdan çoğunda 1/200 titreye kadar antikor saptanabildiği ve bu aglutininlerin büyük oranda kros reaksiyon veren bakterilerden ileri geldiği açıklanmıştır. Bu yüzden birçok araştırmacı 1/320 ve daha yüksek titreleri müsbet olarak kabul etmek gerektiğini ileri sürmektedirler. (1,4,5,10,11,19,20)

Bu nedenle araştırmamız Tablo (2)'de görüldüğü gibi 1/320'nin altında titre veren 19 serum negatif kabul edilmiştir. Geri kalan 140 serum hiç reaksiyon vermemiş, yalnız 1 serum 1/1280 titre vermiştir. Bu serum H. antijeniyle daha düşük titrede reaksiyon göstermiştir. Aynı serum Listeria Üreme İnhibition ve Aglutinon test metoduyla da kontrol edilmiş ve pozitif sonuç alınmıştır. (11,15)

Çalışmamızda H antijenlerinin hazırlanmasında kültürleri formalinle öldürdüğümüz dikkate alınarak kros reaksiyonun varlığını tesbit imkânı bulmamıza rağmen bu şüphenin çok az bir ihtimâl olacağı kabul edilmelidir. Ayrıca H. ve O. antijenlerinin her ikisinde de yüksek titre olduğunda aglutinasyonla elde edilen sonuca güvenileceğini bildiren araştırmacıların varlığında bu serumun Listeriosis yönünden müsbet olduğuna bir başka kanıt olarak ileri sürülebilir. (11)

160 kan serumuyla yaptığımız kontrollerde ancak tek bir serumun L. monocytogenese karşı pozitif reaksiyon vermesi, hastalığın sekonder olarak seyretmesine bağlanabilir. (2,3,19)

ÖZET

Sincan Tavuk Mezhabasından ve Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Tavuk Teşhis Lâboratuvarına gelen tavuklardan alınan 160 kan örneklerinin serumları ayrıştırılmış ve serolojik olarak L. monocytogenes Tip I,II,III, 4 a ve 4 b'e karşı antikor yönünden taranmıştır. 160 adet numuneden bir tanesinde L. monocytogenes'e karşı pozitif reaksiyon saptanmıştır.

SUMMARY

Serologic studies on the Avian Listeriosis

160 blood sera taken from Sincan Avian Slaughterhouse and Etlik Veterinary Control and Research Institute, were investigated serologically for the detection of antibody against listeria monocytogenes type I,II,III, 4a and 4b. Only one sample gave positive reaction to listeria monocytogenes.

LİTERATÜR

1. Allen, R. Packer (1975). Isolation and Identification of avian Pathogens; 80-83
2. Başkaya, H., Ertürk, Ö., Beşe, M. ve Arda, M. (1972). Evcil hayvanların Enfeksiyöz hastalıkları. Cilt 1. A.Ü. Vet. Fak. Yayınları. 283. Ders Kitabı. 184 : 219-227 Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
3. Başkaya, H. ve Minbay, A. (1979). Kümes Hayvanları Hastalıkları A.Ü. Vet. Fak. Yayınları. 354. Ders Kitabı 252 : 128-129. A.Ü. Basımevi, Ankara.
4. Carol, S. and Campell, A.P. (1976). Listeria cell wall fraction. Immunol., 31 : 323.
5. Cengiz, A.T. ve Özsan, R.M. (1980). Listeriozisin tanımında, Listeria monocytogenes «O» Aglutininlerinin diğeri. A.Ü. Tıp Fakültesi Mec., XXXIII, 1 : 55-61.
6. Çetin, E.T. (1965). Pratik Mikrobiyoloji. İsmail Akgün Batbaası, İSTANBUL
7. Dalkılıç, A.E. (1979). Ankara Civarında muhtelif kaynaklardan izole edilen Listeria monocytogenes suşları ve Listeriosis üzerine çalışmalar (Basılmamış).
8. Dağuer, M. (1961). Türkiye'de Listeriosis. Etlik. Vet. Bak. Enst. Derg, 1 (4) : 345-346.
9. Finci, E. (1968). Türkiye'de Listeria durumu üzerinde araştırmalar. A.Ü. Vet. Fak. Yayın : 231, Çalışmalar : 133.
10. Gray, M.L. (1958). Listeriosis in fowlls review. Avian Disease, 2 : 296-314,
11. Gray, M.L. and Killinger, A.H. (1966). Listeria monocytogenes and Listeric infections. Bacteriol. Rev., 30, 2 : 318-323 ve 367-369.

12. Hofstad, M.S., Calne, B.V., Helmboldt, C.F., Reid, W.M. and Yoder, H.M. Jr. (1972). Diseases of Poultry. The Iowa State University Press, Ames. 379-381.
13. İstanbulluoğlu, E. (1981). Laboratuvar Notları (Basılmamış).
14. King, E.O. and Seeliger, H.P.R. (1959). Serological types of *L. monocytogenes* occurring in the U.S. J. of Bact. 77 : 122-123.
15. Kiupel, H. (1973). Listeriosis in the fowl with special reference to diagnosis and epidemiology., 43. 5. 1999.
16. Merchant, I.A. and Paker, R.A. (1961). Veterinary bacteriology and virology. 468-476.
17. Öktem, Z. (1955). *Listerella monocytogenes*. Tıbbi Bakteriyoloji. 2. Cilt.
18. Özbece, İ. ve Doğer, M. (1946). Koyunlarda *Listerellalardan* ileri gelen Encephalomyelitis Prulenta. Türk Veteriner Cemiyeti. Derg. 7 : 36-37.
19. Özsan, K. (1968). *Listeria monocytogenes*, Sağlık hizmetinde mikrobiyoloji-Özel Mikrobiyoloji. 874.
20. Özsan, K., Ekmen, H. ve Fazlı, A. (1972). *Gitellus citellus* *Gitellus gellenius*'larda *Listeria monocytogenes* «O» aglutininleri. Mikrobiyoloji Bülteni 1 : 71.
21. Pir, M. (1971). Listeriosis. Bornova Vet. Araş. Enst. Dergisi. Birlik Matbaası, Bornova. 1971.
22. Paterson, J.S. (1959). Infectious Diseases of Animal. Diseases due to Bacteria. Vol. 1. s. 379.
23. Poultry servicemans's Manual. (1975). Merck and co. Inc. Rahway, New Sersey. U.S.A.
24. Siegmund, O.H. Etal (1973). The Merck Veterinary Manual. Merck and. Co. Inc. Rahway. New Sersey., U.S.A. 1047-1048.
25. Serter, F. ve Serter, D. (1971). *Listeria* Enfeksiyonları ve Listeriosis'e bağlı Meningoensefalit vakası. Mikrobiyoloji Bülteni, 146-152.
26. Ulaş, H. (1963). Listeriosis. Bornova Vet. Araştırma Enst. Dergisi, 8 : 55-63. Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir.
27. Yılmaz, S. (1960). Yurdumuzda yavru atan koyunlardan izole edilen *Listeria monocytogenes*. Etlik Veteriner Bakteriyoloji Araştırma Enstitüsü Dergisi, 1, 2 : 136-144.