

TAVUKLARIN KOLİBASİLLOZU İÇİN *Escherichia coli* O1, O2, O78 ve O101 SEROTİPLERİNDEN AŞI GELİŞTİRİLMESİ: BROYLER PİLİÇLER*

Osman Erganiş^{1@}

H. Hüseyin Hadimli¹

Hasan Solmaz²

Vaccine Development from Serotypes O1, O2, O78 and O101 of *Escherichia coli* against Avian Colibacillosis in Broilers

Özet: *Escherichia coli* O1, O2, O78 ve O101 serotiplerinden polivalan *E. coli* aşısı (PECA) hazırlandı ve PECA'nın bir serisi inaktif Newcastle aşısı ile kombine (ND+PECA) edildi. Deneysel olarak PECA ve kombine aşılardan broyler civcivlerdeki immunojenik etkinliği incelendi. Broiler civcivler 10. günde 3 gruba ayrıldı ve PECA ve kombine aşı ile en-seden deri altı yolla (0.2 ml) aşılandı. Üçüncü grup aşısız kontrol olarak tutuldu. PECA ve kombine aşıları gruplar 20. günde ikiye bölündü ve yarısına ikinci kez (0.5 ml) aşı uygulandı. Aşılama öncesi ve sonrası her 10 günlük dönemde gruplardan kan örnekleri alındı. *E. coli* O1, O2, O78 ve O101 serotipleri yönünden somatik antijenlere karşı mikro serum aglütinasyon testi (mSAT) ve pilus antijenlerine karşı lam aglütinasyon testi (LAT) ile antikor titreleri belirlendi. Kontrol gruplarına göre; bir ve iki kez aşıları gruplarda ~3.5 kat daha yüksek antikor titreleri bulundu. Aşılamalardan 10'ar gün sonra (20. ve 30. günlerde) epruvasyon denemeleri yapıldı. PECA ve Kombine aşı ile bir kez aşıları gruplarda ölüm oranı %10 iken kontrol grubunda %30 oranında şekillendi. İki kez aşıları gruplarda %5 ölüm olurken, kontrol grubunda %20 ölüm tespit edildi. Sonuç olarak, PECA'nın broyler piliçlerde koruyucu amaçlı kullanılabilirliği, bununla birlikte PECA'nın inaktif Newcastle aşısı ile kombine edilmesinde faydalı olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli* O1 O2 O78, O101, aşı, broyler

Summary: In this study, a polyvalence vaccine (PECA) prepared from *Escherichia coli* serotypes O1, O2, O78 and O101 were investigated to determine how effective to *E. coli* infections in broiler chicks. Chicks were subcutaneously vaccinated by PECA in 10th and 20th days in 0.2 ml and 0.5 ml doses, respectively. The other group was held as controlled. Before and after vaccination, blood sampling was carried out at 10 days intervals and antibodies in the serum samples were detected for each serotype by micro serum agglutination test and existence of pilus antibodies by plate agglutination test. Ten day after vaccine application, chicks were challenged. By these trials, 10% of the chicks vaccinated once with PECA and 30% of the pullets from control group died. Mortalities in groups vaccinated twice and control died 5% and 20%, respectively. In conclusion, polyvalence *E. coli* vaccine could be recommended in protection of broiler chicks to *E. coli* infections. However, it was also considered a combination of PECA with inactivated Newcastle vaccine may be useful.

Keywords: *Escherichia coli* O1 O2 O78, O101 vaccine, broiler

Giriş

Escherichia coli hem primer hemde sekonder etken olarak broyler yetiştiriciliğinde en fazla karşılaşılan enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Baysal ve ark 1990, Demiröz ve ark 1988). Broilerlerde özellikle ilk üç haftada *E. coli*ler septisemi, hava keseleri yan-gısı, perikarditis, perihepatitis ve sinovitis gibi hastalıkları oluşturmaktadır. Etken, Newcastle (ND), Enfeksiyöz Bronşit, Pneumovirus ve Mycoplasma enfeksiyonlarından da izole edilebilmekte ve hastalık tablosunu ağırlaştırmaktadır (Erganiş 1988, Arda ve ark 1990, Barnes ve Gross 1997). Hastalıklar sonucu ölüm, hastalığın yayılması, tedavi masrafları ve et ürün-lerinin kalitesine bağlı olarak büyük ekonomik zararlar

oluşturmaktadır (Demiröz ve ark 1988, Sojka 1995). Ayrıca, günümüzde et ürünlerinde antibiyotik kirliliğinin artması sebebiyle hastalıkla mücadelede biyolojik ko-ruma ve mücadele yolları geliştirilmelidir (Acet ve ark 1987, Erganiş ve Zöğ 1990).

Kanatlı hayvanları *E. coli* enfeksiyonlarına karşı korumak için birçok aşı çalışmaları yapılmıştır (Deb ve Harry 1976, Frommer ve ark 1989, Gyimah ve ark 1984, Rosenberger ve ark 1985a ve 1985b, Melamed ve ark 1991, Erganiş ve ark 2002). Bununla birlikte, broylerlerin hayatlarının kısa olması ve *E. coli* enfeksiyonlarının antibiyotiklerle tedavi edilebilmelerinden dolayı bağışıklama üzerinde yeterince du-rulmamaktadır (Baysal ve ark 1988, Heller ve ark

1990, Erganiş ve Zöğ 1990). Hastalıkla mücadelede birçok araştırmacı aşılama üzerinde durmuş, ancak serotiplerinin çokluğu ve koruma gücünün virus aşılı kadar olmaması yüzünden, her ne kadar ticari olarak da birkaç yabancı firma tarafından aşı geliştirilmiş olmasına rağmen, yaygın kullanım alanı bulamamıştır (Cloud ve ark 1985, Erganiş ve ark 2002). Türkiye'de kanatlı *E. coli* enfeksiyonları için aşı üretimi yoktur (Erganiş ve Zöğ 1990). Ancak *E. coli* enfeksiyonlarının yaygınlığı, ekonomik kayıpların fazla olması, antibiyotiklere dirençli suşların artması ve bazı vakalarında dirençli suşlardan ötürü tedavide çaresiz kalmaktadır (Cloud ve ark 1985, Erganiş ve ark 1992).

Bu çalışmada, broyler piliçleri *E. coli* enfeksiyonlarından korumak amacıyla, ülkemizde yaygın olduğu belirlenen (Baysal ve ark 1990, Erganiş 1991, Erganiş ve ark 1992, Aksın ve ark 1994) *E. coli* O1, O2, O78 ve O101 serotiplerinden polivalan inaktif bir aşı geliştirilmesi, inaktif Newcastle aşısı ile kombine edilmesi ve broylerde immunolojik etkinliklerinin belirlenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Hayvan Materyali: Çalışmaya 200 ticari broyler civciv (Avian Farms) ile başlandı. Civcivler için uygun besleme, aşılama (Newcastle, Gumboro) ve bakım koşulları sağlandı.

E. coli Serotipleri: Kolibasillozlu tavuklardan izole edilen Tip 1 piluslu *E. coli* O1, O2, O78 ve O101 suşları kullanıldı.

Antijenlerin Hazırlanması

Tip 1 Pilus Antijeni Üretimi: *E. coli* O1, O2, O78 ve O101 serotiplerinden ayrı ayrı Minca agarda 37°C'de 8-10 saat inkübe edilerek üretilmiş taze kültürler fosfat buffer solusyonu (PBS) ile alınarak 3 kere yıkandı. Son konsantrasyonu %1 olacak şekilde etilenimin katılarak inaktive edildi ve yoğunluğu Mac Farland No.4'e göre ayarlandı (Erganiş ve ark 1992, Aksın 1994). Bu antijen hem tavşanlarda antiserum üretiminde hem de serum örneklerinde Tip-1 pilus antikorlarının lam aglutinasyonu ile test edilmesinde kullanıldı.

Somatik "O" Antijenlerinin Üretimi: *E. coli* O1, O2, O78 ve O101 serotiplerinden ayrı ayrı Blood Agar Base'e ekilerek 37°C'de 1 gece inkübasyonla üretilmiş kültürler PBS ile 3 kere yıkayıp 121°C'de 15 dak tularak inaktive edildiler. Her serotip için konsantrasyon Mac Farland no.4'e ayarlandı (Baysal ve ark 1990, Erganiş ve ark 1992, Aksın 1994). Sterilite kontrolünden sonra tavşanlarda antiserum uyarım enjeksiyonlarında kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı

Mikro serum aglutinasyon testi (mSAT) için her serotipten 6 x 10⁹ bakteri / ml olacak şekilde ayarlanmış ve otoklav edilmiş bakteri süspansiyonundan mikro serum aglutinasyon antijeni (mSAA) hazırlandı (Erganiş ve İstanbulluoğlu 2002). Sterilite kontrolünden sonra mSAT'lerinde kullanılıncaya kadar +4°C'de sak-

landı.

Tavşanlarda Antiserumların Hazırlanması

Çalışma boyunca kullanılacak serolojik testlerdeki antijen standardizasyonu ve tavuk kan serumlarının titrasyonları için *E. coli* O1, O2, O78 ve O101 suşlarının somatik "O" antijenlerine ve Tip 1 pilus antijenlerine karşı tavşanlar hiperimmünize edilerek antiserumlar üretilti (Erganiş ve İstanbulluoğlu 2002).

a-Tip 1 Pilus Antiserumu Üretimi ve Ölçümü: Bu amaçla *E. coli* O1, O2 ve O78 suşlarından ayrı ayrı hazırlanan Tip 1 Pilus Antijeni sterilite kontrolünden sonra tavşanlara 0.2 ml'den başlayarak haftada 2 kere olmak üzere 4 hafta süreyle ve artan dozlarda intravenöz yolla enjekte edilerek hiperimmün serum elde edildi. Bu serumlar 1/5 oranında PBS ile sulandırıldıktan sonra her biri kendinin eldesinde kullanılan serotipteki *E.coli* suşunun Minca agarda 20°C'de üretilmiş kültürü ile ("K" ve "O" antijenleri yönünden) adsorbe edilerek pilus antiserumları hazırlandı (Baysal ve ark 1990, Erganiş ve ark 1992). Antiserumlar küçük porsiyonlar halinde -20°C'de saklandı ve serolojik testlerde pozitif kontrol olarak kullanıldı.

b-Somatik "O" Antiserumlarının Üretimi ve Ölçümü: *E. coli* O1, O2, O78 ve O101 serotiplerinden ayrı ayrı hazırlanan ve sterilite kontrolü yapılan somatik "O" antijenleri her serotip için 3'er adet tavşana verilerek antiserum hazırlandı. Bu amaçla tavşanlara 0.2 ml den başlayarak haftada 2 kere olmak üzere 4 hafta süreyle ve artan dozlarda intravenöz yolla enjekte edilerek hiperimmünizasyon sağlandı. Son enjeksiyondan 10 gün sonra tavşanlardan kan alınarak serumları çıkarıldı (Baysal ve ark 1990, Erganiş ve ark 1992). Somatik "O" antiserumları, küçük porsiyonlar halinde -20°C'de saklandı ve serolojik testlerde pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Mikropleypte serumun katlı dilusyonlarına (1/5, 1/10, 1/20,...) eşit miktarlarda (50'şer ml) mSAA ilave edildi. Bir gece 37°C'de inkübe edildikten sonra aglutinasyon titreleri ölçüldü (Erganiş ve İstanbulluoğlu 2002). Tavşanların her birinin antiserum titreleri belirlendi.

Patojenite Denemeleri: *E. coli* O1, O2, O78 ve O101 serotiplerinden ayrı ayrı Triptic Soy Buyyon (TSB)'da 37°C'de 24 saat inkübe edilerek üretilmiş taze kültürlerden 7 günlük 3'er civcive intraperitoneal yolla enjekte edildi. Bir hafta süreyle gözlenerek patojeniteleri belirlendi. Daha sonra her serotip ayrı ayrı olmak üzere 10'ar civcivde 2 farklı zamanda denenecek epruvasyonda kullanılacak konsantrasyonları belirlendi (Rosenberger ve ark 1985a).

Aşıların Hazırlanması

E. coli O1, O2, O78 ve O101 serotipleri Blood Agar Base'de ayrı ayrı ekilerek, 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Üreyen kültürler PBS ile toplandı ve 3 kez yıkandı. Her serotipten eşit miktarda alınarak ve son

konsantrasyonu 6x10⁹ bakteri/ml olarak ayarlandı. Son konsantrasyonu % 0.3 olacak şekilde formol ilave edilerek inaktive edildi. Bir kısım aşı materyali +1 kısım mineral yağlı adjuvant* ile homojenize edilerek Polivalan *E. coli* Aşısı (PECA) hazırlandı (Vanselov 1987, Erganiş ve ark 2002).

Kombine (Newcastle + *E. coli*) Aşısı: Bir kısım yağlı adjuvantlı inaktif Newcastle aşısı ile bir kısım polivalan *E. coli* aşısı (PECA) antijeni çift enjektörle homojenize edilerek hazırlandı (Erganiş ve ark 2002).

Aşının Sterilite ve Zararsızlık Testleri: PECA, inaktivasyon ve kontaminasyon yönünden kanlı agar ve MacConkey agarlara ekilerek kontrol edildi. Ayrıca, 5'er civciv ve 5'er beyaz fareye 1'er ml deri altı yolla enjekte edilerek bir hafta süreyle zararsızlık yönünden gözlemlendi (Erganiş ve ark 2002).

Broyler Piliçlerin Aşılama: Civcivler 10 günlük iken 50'şerli 3 gruba (PECA aşısı, kombine aşısı ve kontrol grubu) ayrıldı. Aşısı gruplarındaki civcivler enseden deri altı yolla (0,2 ml) aşılandı. Aşılı piliçler, 20. günde ikiye bölündü ve yarısına 2. kez PECA ve Kombine aşıları ile aynı yolla (0.5 ml) aşılandı.

Aşılamaların Serolojik İzlenmesi

Mikro Serum Aglutinasyon Testi (mSAT): Aşılama öncesi ve sonrası her 10 günlük dönemlerde 6-8 adet aşılı ve aşısız piliçlerden kan alınarak serumları çıkarıldı. Her serumun 1/5 sulandırması tüplerde (0,2 ml serum +0.8 ml FTS ile) yapıldı. Mikropleyitin ilk çukuru dışındakilere 50'şer ml serum fizyolojik kondü. İlk çu-

kura serumun 1/5 lik sulandırmasından 100 ml konduktan sonra 50 ml'si alınarak 2. çukura aktarıldı. Bu işlem son çukura kadar tekrarlandı. Böylece her serumun 1/640' a kadar sulandırması yapıldı. Her serum örneğinin üzerine 50'şer ml mSAA ilave edildikten sonra 37°C'de bir gece inkube edildi. mSAT titreleri (1/10=0, 1/20=1, 1/40=2, 1/80=3,...olarak) normal rakamlara çevrildi. Geometrik ortalamaları (GO) alınarak, mikro serum aglutinasyon testi (mSAT) ile antikor titreleri belirlendi (Rosenberger ve ark 1985a).

Lam Aglutinasyon Testi (LAT): Bu testle serum örneklerindeki Tıp-1 pilus antikorları ölçüldü. Aglutinasyon skoru, - (0), + (1), ++ (2), ve +++ (3) olarak değerlendirildi (Erganiş ve ark 1992).

Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi: Newcastle antikorları mikro hemaglutinasyon-inhibisyon testi (mHI) ile ölçüldü (Erganiş ve İstanbulluoğlu 2002). Broyler civcivlerin maternal antikor titreleri 2. günde ölçüldü.

Epruvasyon Denemeleri: Aşılı ve aşısız piliçler aşılamadan 10 gün sonra *E. coli* O1, O2, O78 ve O101 serotipleri ayrı ayrı intraperitoneal yolla enjekte edilerek epruvasyon denemeleri yapıldı (Rosenberger ve ark 1985b).

İstatistik Analizler:

Verilerin istatistik analizi, Duncan's testi ile yapıldı

Bulgular

Aşısı- Epruvasyon Suşlarının Patojenik Özellikleri

E. coli O1, O2, O78 ve O101 serotiplerinin 7 günlük civcivlerdeki patojenite testlerinde; *E. coli* O1 ve O2

Tablo 1. *E. coli* O1, O2, O78 ve O101 serotiplerinin 7 günlük civcivlerdeki patojeniteleri

Patojenite	<i>E. coli</i> Serotipleri			
	O1	O2	O78	O101
Bakteriyel Konsantrasyon	(5x10 ⁹ bakt/ml)*	(1x10 ¹¹ bakt/ml)	(3x10 ⁸ bakt/ml)	(3x10 ⁸ bakt/ml)
Ölü/test edilen	4/9	3/10	7/10	6/10

*Bakteriler IP enjekte edildi.

Tablo 2. Bir kez aşılı piliçlerin aşılamadan 10 gün sonraki epruvasyon sonuçları

(Civcivler 10 günlük iken aşılandı, 20. günde epruve edildi)

Grup	O1	O2	O78	O101	Toplam
	(1x10 ⁹ bakteri/ml)*	(2x10 ¹¹ bakteri/ml)	(3x10 ⁷ bakteri/ml)	(7.5x10 ⁷ bakteri/ml)	
Kontrol	1/5	1/5	2/5	2/5	6/20**
Polivalan	0/5	1/5	1/5	0/5	2/20
Kombine	0/5	0/5	1/5	1/5	2/20

*Epruvasyon için intraperitoneal yolla enjekte edilen bakteri sayısı

**Ölen/test edilen

Tablo 3. İki kez aşılı piliçlerin aşılamadan 10 gün sonraki epruvasyon sonuçları

(Civcivler 10 ve 20 günlük iken aşılandı, 30. günde epruve edildi)

Grup	O1	O2	O78	O101	Toplam
	(1x10 ⁹ bakteri/ml)*	(2x10 ¹¹ bakteri/ml)	(3x10 ⁷ bakteri/ml)	(7.5x10 ⁷ bakteri/ml)	
Kontrol	1/5	0/5	2/5	1/5	4/20**
Polivalan	0/5	0/5	1/5	0/5	1/20
Kombine	0/5	0/5	1/5	0/5	1/20

* Epruvasyon için intraperitoneal yolla enjekte edilen bakteri sayısı

**Ölen/Test edilen

Tablo 4. Polivalan *E. coli* Aşılı Broyleler Grubundaki Antikor Titreleleri *

Gün	O1		O2		O78		O101	
	Bir Kez	İki Kez	Bir Kez	İki Kez	Bir Kez	İki Kez	Bir Kez	İki Kez
2	0		0		0		0	
10	0		0		0		0	
20	2.75±0.16 ^b		3.5±0.18 ^a		3.00±0.26 ^b		3.00±0.26 ^b	
30	1.83±0.40	3.57±0.20 ^a	2.00±0.25	2.00±0.37 ^b	2.00±0.00	3.43±0.20 ^a	1.83±0.47	2.30±0.28 ^b
40	1.66±0.21	2.63±0.18	1.17±0.30	2.00±0.22	1.66±0.21	1.87±0.32	1.00±0.36	1.12±0.22
50	1.00±0.40	1.85±0.26	0.25±0.25	0.85±0.26	1.00±0.00	1.42±0.20	0.25±0.25	0.57±0.20

* Serum sulandırılmaları 1/20=1, 1/40=2, 1/80=3,... olarak çıkan sonuçlar normal rakamlara çevrildi ve geometrik ortalamaları alınarak değerlendirildi.

** Kontrol grubundaki broylelerin antikor titreleleri çok düşük olduğundan tabloda verilmedi.

a, b: Antikorlar yönünden gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05)

Tablo 5. Kombine (ND+PECA) Aşılı Broyleler Grubundaki Antikor Titreleleri *

Gün	<i>E. coli</i> O1		<i>E. coli</i> O2		<i>E. coli</i> O78		<i>E. coli</i> O101	
	Bir Kez	İki Kez	Bir Kez	İki Kez	Bir Kez	İki Kez	Bir Kez	İki Kez
2	0		0		0		0	
10	0		0		0		0	
20	2.50±0.26		3.25±0.25		3.00±0.42		3.00±0.35	
30	2.00±0.20	3.25±0.29	2.25±0.36	3.25±0.31	2.50±0.29	3.42±0.32	1.83±0.30	2.00±0.39
40	1.88±0.26	2.75±0.33	1.17±0.36	2.00±0.21	1.66±0.25	2.25±0.34	1.12±0.26	1.25±0.30
50	1.00±0.36	1.85±0.26	0.50±0.41	0.85±0.16	1.00±0.34	1.87±0.33	0.25±0.25	0.70±0.22

* Serum sulandırılmaları 1/20=1, 1/40=2, 1/80=3,... olarak çıkan sonuçlar normal rakamlara çevrildi ve Geometrik Ortalamaları alınarak değerlendirildi.

** Kontrol grubundaki broylelerin antikor titreleleri çok düşük olduğundan tabloda verilmedi.

a, b: Antikorlar yönünden gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (P<0.05)

Tablo 6. Aşılı Broylelerde Pilus Antikorlarının Varlığı*

Gün	O1				O2				O78			
	Polivalan		Kombine		Polivalan		Kombine		Polivalan		Kombine*	
	Bir Kez	İki Kez	Bir Kez	İki Kez	Bir Kez	İki Kez	Bir Kez	İki Kez	Bir Kez	İki Kez	Bir Kez	İki Kez
2	0		0		0		0		0		0	
10	0		0		0		0		0		0	
20	2/5(2)**		-		5/5(6)		-		5/5(5)		-	
30	4/5(6)	4/5(7)	4/5(5)	4/5(5)	2/5(3)	3/5(4)	4/5(5)	5/5(5)	5/5(6)	4/5(9)	5/5(7)	5/5(12)***
40	0/5(0)	2/5(2)	1/5(1)	2/5(2)	1/5(1)	2/5(3)	1/5(1)	2/5(2)	5/5(10)	5/5(11)	4/5(9)	4/5(8)
50	0/5(0)	1/5(1)	1/5(1)	2/5(2)	3/5(3)	2/5(2)	3/5(3)	2/5(2)	2/5(2)	2/5(3)	3/5(3)	2/5(3)

*Kontrol grubunda çoğu örnek 0/5 idi. *E. coli* O101 serotipi için pilus antikorlarına bakılmadı.

**Pozitif/test edilen serum sayısı

***5 serumda aglütinasyon skorları toplamı (aglütinasyon skorları +, ++ ve +++ olarak değerlendirildi) pilus antikorları yönünden yapılan lam aglütinasyon testinde 5 serumun 5'inde +++ aglütinasyon vermişse (15) skoru ile değerlendirildi.

serotiplerine göre O78 ve O101 serotiplerinin daha patojen olduğu belirlendi (Tablo 1).

Epruvasyon Denemeleri

PECA ve Kombine aşılar ile 10 günlük iken aşılardan civcivlerin epruvasyon denemelerinde; aşılı 20'şer piliçten 2'seri (% 10) ölürken, aşısız 20 piliçten 6'sında (%30) ölüm şekillendi (Tablo 2). Yirminci günde 2. kez aşılardan 20'şer piliçten 1'eri (%5) ölürken, aşısız 20 piliçten 4'ü (%20) öldü (Tablo 3). Diğer bir ifade ile; 10. günde yapılan epruvasyonda bir kez aşılı broylelerin %90'ı, aşısız broylelerin ise %70'i korunabildi (Tablo 2). Yirminci günde yapılan epruvasyonda ise iki kez aşılı broylelerin %95'i ve aşısız kontrollerin %80'i korunabildi.

Aşılı Broylelerde Antikorların Seyri

PECA aşısı ile 10. (0,2 ml) ve 20. (0.5 ml) günde aşılardan piliçlerde oluşan antikor titreleleri Tablo 4'de verilmiştir. Bir kez aşılı piliçlerde *E. coli* O2 ve iki kez aşılı piliçlerde *E. coli* O1 ve O101 serotiplerine karşı en yüksek titrede antikorların sentezlendiği görülmektedir. PECA aşısı ile bir kez aşılı piliçlerde *E. coli* O1 serotipi ile O2, O78 ve O101 serotiplerine karşı oluşan antikor titreleleri arasında istatistiksel farklılık tespit edildi (P<0.05). PECA aşısı ile iki kez aşılı piliçlerde *E. coli* O1 ve O78 serotipleri ile O2 ve O101 serotiplerine karşı oluşan antikor titreleleri arasında istatistiksel farklılık belirlendi (P<0.05). Kontrol grubunda ancak son örneklemede (50. gün) bazı piliçlerde düşük titrelerde (0-

0,14) antikor tespit edilmesi, çevredeki ve floradaki *E. coli*lerin uyarılarından kaynaklandığı kanaatine varıldı.

Kombine aşısı ile 10. (0.2 ml) ve 20. (0.5 ml) günde aşılama piliçlerde oluşan antikor titreleri Tablo 5'de verilmiştir. Bir kez aşı piliçlerde *E. coli* O2 ve iki kez aşı piliçlerde *E. coli* 78 serotiplerine karşı en yüksek titrede antikorların sentezlendiği görülmektedir. Kombine aşısı ile bir kez aşı piliçlerde oluşan antikor titreleri yönünden *E. coli* O2, O78 ve O101 serotipleri arasında istatistiksel farklılık ($P>0.05$) önemsiz bulunurken, O1 serotipi ile diğer serotipler arasında istatistiksel farklılığın olduğu gözlemlendi ($P<0.05$). PECA aşısı ile iki kez aşı piliçlerde *E. coli* O1 ve O78 serotipleri ile O2 ve O101 serotiplerine karşı oluşan antikor titreleri arasında istatistiksel farklılık belirlendi ($P<0.05$).

PECA ve Kombine aşılar ile aşılama broylerde, aşılama sonrası örneklemelerde önemli ölçüde pilus antikorlarına rastlanıldı. Özellikle *E. coli* O78 serotipinin aglütinasyon skorları dikkate alındığında daha yüksek seviyelerde pilus antikorlarının olduğu belirlendi (Tablo 6).

Tablo 7. Broyler Gruplarındaki Newcastle Antikor Titreleleri

Gün	Kontrol	PECA	Kombine
2	7.4±0.80	7.4±0.80	7.4±0.80
10	5.8±0.41	5.8±0.41	5.8±0.41
20	7.4±0.26	8.2±0.25	8.0±0.26
30	8.8±0.25	8.6±0.30	9.5±0.32
40	8.8±0.25	9.2±0.49	12.6±0.18
50	7.7±0.28	8.0±0.37	8.8±0.29

*Kontrol ve PECA grubu inaktif ND ile aşılandı.

(Tüm civcivler 9 günlük iken HB1 ile aşılandılar)

Çalışma boyunca broylerde Newcastle antikorlarının koruyucu seviyede belirlenmesi PECA ile kombine edilen inaktif Newcastle aşısı, ND aşısının etkinliğini etkilemediği tespit edildi (Tablo 7).

Tartışma ve Sonuç

Ülkemizde tavukçuluk sektörünün en önemli bakteriyel hastalığı kolibasilloz'dur (Demiröz ve ark 1988, Baysal ve ark 1990). *E. coli*, kanatlıların kümes ortamında ve barsak floralarında kommensal olarak bulunmaktadır. Tek başlarına veya kronik solunum yolu kompleks ve viral enfeksiyonlarla birlikte sekonder olarak verim (%15-20) kayıplarına ve ölümlere (%20) sebep olmaktadır (Erganiş 1988, Sojka 1995, Barnes ve Gross 1997). Ayrıca, enfeksiyonla mücadelede yoğun kullanılan antibiyotik önemli ekonomik kayıplar oluşturmaktadır (Demiröz ve ark 1988, Erganiş 1991), aynı zamanda antibiyotikli et ve yumurtanın tüketime sunulması halk sağlığı açısından bir sorun teşkil etmektedir (Acet ve ark 1987).

Enfeksiyonlara karşı hayvanların dirençliliğini genetik ve çevresel faktörler etkilemektedir. Bunlara ilave olarak, civcivlerdeki maternal antikorların varlığı da önemli olmaktadır. Ayrıca, ND ve *E. coli* en-

feksiyonlarına karşı oluşan humoral bağışıklığın erkeklere göre dişilerde daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Leitner ve ark 1994).

E. coli'nin farklı serotiplerinden hazırlanan aşılar, sadece homolog suşlara karşı hayvanlarda koruma sağladığı belirtilmektedir (Deb ve Harry 1976, Gyimah ve ark 1984, Melamed ve ark 1991). Bununla birlikte, gerek somatik antijenlere gerekse de pilus antijenlerine karşı oluşan antikorlar yönünden O78 serotipinin daha iyi antijenite gösterdiği ifade edilmektedir (Melamed ve ark 1991). Gyimah ve Panigraphy (1985), monovalan *E. coli* aşısının serotip spesifik bir koruma yapması sebebiyle *E. coli* enfeksiyonlarına karşı etkili bir koruma için farklı *E. coli* serotiplerini içeren aşılamanın olması gerektiğini belirtmektedir.

Rosenberger ve ark (1985b) 5 farklı genetik yapıda ve bir günlük yaşta toplam 50 broyler civcive, aşı suşu olarak *E. coli* O78 serotipinin yaklaşık 1×10^7 bakteri/ml'sini damar içi yolla vererek patojenite denemesi yapmışlar ve 26'sının öldüğünü bildirmişlerdir. Bu çalışmada, 3×10^8 bakteri/ml yoğunluğunda IP yolla verilen *E. coli* O78 (7/10'sinde ölüm) ve O101 (6/10'sinde ölüm) serotiplerinin daha patojen oldukları belirlendi (Tablo 1).

Civcivlerin özellikle 15 günden itibaren *E. coli* enfeksiyonlarına karşı doğal bir direnç geliştirmeye başladıkları belirtilmektedir (Heller ve ark 1990). Bu nedenle, civcivlerin kolibasilloza duyarlı oldukları ilk 2 haftada korunmalarında maternal antikorların önemi fazladır. Heller ve ark (1992), Freund'un komple adjuvantlı *E. coli* aşısı ile aşılama broyler damızlıklarda 160. güne kadar yüksek titreli antikor oluşumu sağlandığını bildirmişlerdir.

Rosenberger ve ark (1985b), *E. coli* O2, O78 ve O35 suşlarından hazırladıkları trivalan bakterin aşı ile 20 haftalık broyler damızlıkları 2 kez (20. ve 25. haftalarda) aşılamışlardır. Araştırmacılar (Rosenberger ve ark 1985b), maternal antikorların civcivleri 15. güne kadar koruduğunu, aşısız damızlıkların 1 günlük civcivlerin %80'inde ölüm şekillendiğini, bir kez aşı damızlıkların civcivlerinde ise %37.5 oranında ölüm görüldüğünü bildirmişlerdir. Erganiş ve ark (2002), *E. coli* O1, O2 ve O78 serotiplerinden hazırladıkları trivalan aşı ile 16. haftada aşılama yumurtacı damızlıklarda yaklaşık 20 hafta süre ile yüksek titrelere antikor tespit edildiğini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar (Erganiş ve ark 2002), 24. haftadan itibaren farklı dönemlerde kuluçka edilerek elde edilen aşı damızlık tavukların civcivlerinde de yüksek titrede maternal antikorlar belirlenmişlerdir. Ayrıca, epürasyon yapılan aşı tavukların civcivlerinde %89.5'inde koruma sağlanırken aşısız tavukların civcivlerinde %49.7'sinde koruma şekillendiği belirtilmiştir. Melamed ve ark (1991) *E. coli* O2 serotipi ile 10. günde aşıladıkları broylerlerin aşılama sonrası 5., 8. ve 15.

günlerdeki epruvasyon sonuçlarına göre en iyi kormanın 15. günde olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar (Meladed ve ark 1991), bir başka deyişle, epruvasyon sonrası aşıli broylerlerin %77-85'inde hiçbir lezyon ve/veya ölüm görülmezken, kontrol grubundaki civcivlerin %60-80'inde lezyon ve/veya ölüm görüldüğünü belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar (Meladed ve ark 1991), O2:K1 ile O78:K80 serotiplerinden hazırlanan *E. coli* aşılmasının çapraz koruma denemelerinde O2 suşu O78 serotipine karşı da koruma sağlamasını; *E. coli* O2 serotipinin O78'den daha fazla antijenik özellikleri taşıyan determinantlara sahip olması ile açıklamaktadırlar. Erganiş ve ark (2002), 15 günlük yumurtacı civcivlerin epruvasyonunda; *E. coli* O1, O2 ve O78 serotiplerinden hazırladıkları trivalan aşı ile aşılanan civcivlerde %22.2 ölüm görülürken aşısız civcivlerde %53.3 oranında ölüm şekillendiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, epruvasyon sonrası bir kez aşıli broylerlerin %10'unda ve aşısız broylerlerin %30'ünde ölüm belirlendi. Bununla birlikte, epruvasyon sonrasında iki kez aşıli broylerde %5 ve aşısız broylerde %20 ölüm tespit edilmesi, ikinci kez aşılanmanın olumlu etkisi bağlandı. Antikor titreleri yönünden bakıldığında, PECA ile bir kez aşıli piliçlerde *E. coli* O2 ve iki kez aşıli piliçlerde *E. coli* O1 ve O78 serotiplerine karşı en yüksek titrede antikorların sentezlendiği görülmektedir ($P < 0.005$). Bununla birlikte, PECA ve Kombine aşılardan aşılanan broylerde özellikle *E. coli* O78 serotipine karşı yüksek skorlarda pilus antikorlarının oluştuğu belirlendi. Ayrıca, PECA ile kombine edilen inaktif Newcastle aşısının etkinliğinin etkilenmediği ve kombine edilmesinin faydalı olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak; doğal *E. coli* enfeksiyonlarında bu kadar yoğun bakteri ile karşılaşma şansının az olacağı düşünüldüğünde, civciv ölümlerinin önlenmesi ve verim kayıplarının azaltılması açısından, polivalan *E. coli* aşısının broyler civcivlerde-piliçlerde koruyucu olduğu kanaatine varılmıştır. Böylelikle antibiyotik kullanımı azalacağından, barsak florasının daha dengeli oluşacağı, yemden yararlanma artacağı için et kalitesi yüksek ve daha sağlıklı tavuklar yetiştirilebilecektir.

Teşekkür

TÜBİTAK VHAG (1126)'a ve Altıncı A. Ş.'ine çalışmanın gerçekleştirilmesinde desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Acet, H. A., Ateş, M. ve Erganiş, O. (1987) Hayvansal dokularda antibiyotik kalıntılarının agar difüzyon tekniği ile tayini. S. Ü. Vet. Fak. Derg., 3, 197-205.
 Aksın, M. (1994) İshali buzağılar ve septisemili tavuklardan izole edilen *Escherichia coli*'lerin adhezinleri (K99, K88, F41, 987P ve tip 1 fimbria) ve enterotoksinleri (Stx ve VT) üzerinde çalışmalar (Doktora Tezi). S. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
 Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö. ve İzgür, M. (1990) Kanatlı Hayvan Hastalıkları, Ankara.
 Barnes, H. J., Gross, W. B. (1997) Colibacillosis. In: Diseases of Poultry, 10th Ed. Edited by Calnek B. W., pp 131-141, Iowa State University Press Ames, Iowa, USA.

Baysal, T., Erganiş, O. ve Güler, L. (1990) Konya bölgesindeki kanatlılardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının bazı biyokimyasal ve serolojik özellikleri ile antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi. Veterinarium, 2, 1, 8-14.
 Cloud, S. S., Rosenberger, J. K., Fries, P. A., Wilson, R. A. and Odor, E. M. (1985) In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. I. Serotypes, metabolic activity and antibiotic sensitivity. Avian Dis., 29, 1084-1093.
 Deb, J. R. and Harry, E. G. (1976) Laboratory trials with inactivated vaccines against *Escherichia coli* (O78:K80) infection in flocks. Res. Vet. Sci., 20, 131-138.
 Demiröz, K., Ergun, A. ve Akman, A. (1988) Son on yılda Türkiye'de saptanan tavuk hastalıkları. I. Uluslararası Tavukçuluk ve Tavuk Hastalıkları Sempozyumu Tebliği, pp 94-98, 3-5 Ekim, Manisa.
 Erganiş, O. (1988) Tavuk hastalıkları ders notları, S. Ü. Veteriner Fakültesi, Konya.
 Erganiş, O. (1991) Hindilerin fekal florasından izole edilen *Escherichia coli* suşlarının bazı patojenite özellikleri üzerinde incelemeler. Veterinarium, 2, 3-4, 2-12.
 Erganiş, O., Gülen, G., Kaya, O., Uçan, U. S. ve Kuyucuoğlu, Y. (1992) Kolibasilozlu tavuklardan izole edilen *Escherichia coli*'lerde tip 1 pilus tiplendirmesi. Veterinarium, 3, 2, 7-12.
 Erganiş, O., Hadimli, H.H. ve Solmaz, H. (2002) Tavukların kolibasilozu için *Escherichia coli* O1, O2 ve O78 serotiplerinden aşı geliştirilmesi: Yumurtacı Tavuklar. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 26, 1213-1221.
 Erganiş, O. ve İstanbuloğlu, E. (2002) İmmünoloji. S.Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları, Konya.
 Erganiş, O. ve Zöğ M. Z. (1990) Bir kombine aşı önerisi: İnaktif Newcastle+*Escherichia coli*. II. Uluslararası Tavukçuluk ve Tavuk Hastalıkları Sempozyumu, 20-21 Eylül, Manisa.
 Frommer, A., Book, R. R., Heller, E. D., Freidlin, P. J., Drabkin, N. and Samberg, A. (1989) Experimental vaccination of young chicks with a non-pathogenic strains of *Escherichia coli*. IXth Int. Congr., World Vet. Poultry Association, 13-17 August, Brighton-Great Britain.
 Gyimah, J. E., Panigraphy, B. (1985) Immunogenicity of *Escherichia coli* (serotype O1) pill vaccine in chickens. Avian Dis. 29 (4): 1078-1083.
 Gyimah, J. E., Panigraphy, B., Hall, C. F. and Williams D. J. (1984) Immunogenicity of an oil emulsified *Escherichia coli* bacterin against heterologous challenge. Avian Dis., 29, 540-545.
 Heller, E. D., Leitner, G., Drabkin, N., Melamed, D. (1990) Passive immunisation of chicks against *Escherichia coli*. Avian Pathol., 19, 345-354.
 Heller, E. D., Leitner, G., Freidman, A., Uni, Z., Gutman, M., Cahaner, A. (1992) Immunological parameters in meat-chickens lines divergently selected by antibody response to *Escherichia coli* vaccination. Vet. Immun. Immunopathol., 34, 159-172.
 Leitner, G., Gutman, M., Heller, E. D., Yonash, N. and Cahaner, A. (1994) Parenteral effect on the humoral immune response to *Escherichia coli* and Newcastle Disease virus in young broiler chicks. Poultry Sci., 73: 1534-1541.
 Melamed, D., Leitner, G. and Heller, E. D. (1991) A vaccine against avian colibacillosis based on ultrasonic inactivation of *Escherichia coli*. Avian Dis., 35, 17-22.
 Rosenberger, J. K., Fries, P. A., Cloud, S. S. (1985a) In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. III. Immunisation. Avian Dis. 29, 1108-1117.
 Rosenberger, J. K., Fries, P. A., Cloud, S. S. and Wilson, R. A. (1985b) In vitro and in vivo characterisation of avian *Escherichia coli*. II. Factors associated with pathogenicity. Avian Dis., 29, 1094-1107.
 Sojka, W. J. (1995) *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal Bucks, England.
 Vanselow, B. A. (1987) The application of adjuvants to veterinary medicine. Veterinary Bulletin, 57, 881-896.