

## KOYUNLARDA VİBRİO - FETÜS'TEN İLERİ GELEN

### SIKITLARA KARŞI BİR AŞI GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI (\*)

**Dr. SALİH YILMAZ**

Etlik Vet. Kont. ve Araştırma Enst.  
Virüsü - Abortuslar ve Yet. Hast.  
Lâboratuvarları Şefi  
Etlik, Ankara - Turkey

**YILMAZ ÜSTÜNAKIN**

Etlik Vet. Kont. ve Araştırma Enst.  
Tüberküloz ve Paratüberküloz  
Lâboratuvarı Uzmanı  
Etlik, Ankara - Turkey

## GİRİŞ

Yurdumuzda koyun yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen çeşitli faktörler arasında enfeksiyöz karakterdeki yavru atmaların ilk sırayı aldığı ve koyun yetiştiriciliği yapanların en çok şikâyetlerini ve problemlerini teşkil ettiği bilinen bir gerçektir. Koyunlarda hemen her yıl değişik bölgelerde periyodik olarak görülen sıkıtların bir çok nedeni olmakla beraber; bunlardan enfeksiyöz yapıda olanların içinde «Vibrio - fetüs'ten ileri gelenlerin büyük bir çoğunluğu kapsadığı lâboratuvarımıza gönderilen marazi maddelerin muayene-

(\*) Bu araştırma, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumunca VHAG - 193 No.lu Projesi olarak, Kurumca desteklenmiştir.

sinden alınan sonuçlarla kanıtlanmıştır. Koyunlarda vibriosis'ten ötürü meydana gelen sıkıtlar, enfeksiyonu daha önceki yıllarda geçirip geçirmediğine göre yüzde olarak farklılık göstermektedir. Enfeksiyonun ilk çıktığı sürülerde sıkıt oranı % 70'e kadar vardığı literatürlerde bildirilmekte olup bu araştırma ile tarafımızdan da bazı sürülerde de saptanmıştır.

Yıldan yıla değişmekle beraber ortalama bir rakamla her sene yurdumuzda toplam olarak 10 milyon koyunun tohumlandığını kabul edelim. Bunlardan % 20 - 30'unun çeşitli etkenlerden dolayı sıkıt yaptığı en iyimserlikle tahmin edilecek bir rakamdır. Diğer bir deyimle yılda en azından 2 - 3 milyon kuzunun dolayısıyla koyunun kaybolduğu kolayca anlaşılır.

Yapılan bu araştırma ile koyunlar arasında vuku bulan sıkıtların % 44'ünün vibriosis'ten ileri geldiği kanıtlanmıştır. Bu husus; yurdumuzda koyunlarda meydana gelen yavru atmaların yarısına yakın bir bölümünün vibriosis'e bağlı olduğunu göstermektedir.

Hastalığın yurt ekonomisine yaptığı zarar ise en küçük bir rakamla 2 - 2.5 milyar Türk lirasına eş değerdedir.

Koyunlardaki Vibrio - fetüs enfeksiyonu; ekonomimize yaptığı çok büyük maddî kayıp yanında, hayvansal protein eksikliğine sebebiyet vermekte, çok daha önemlisi yurt koyunculunun istenilen süre içinde plânlanan hedefe ulaştırılmasını engellemektedir.

Veteriner kuruluşları olarak görevlerimizden ilki ve en önemlisi şüphesizki salgın hayvan hastalıklarıyla mücadele etmek ve eradikasyonlarını sağlamak ve bu enfeksiyonların hayvan yetiştiriciliğine yaptığı tahribatı minimuma indirmektir. Yurt koyun yetiştiriciliğini olumsuz olarak etkileyen ve çeşitli nedenlere bağlı sıkıtlar arasında «Vibrio - fetüs enfeksiyonunun çoğunluğu teşkil ettiği daha önce belirtilmiştir. Çok önemli olan bu husus dikkate alınarak, söz konusu hastalığa karşı dünyanın bir çok değişik ülkelerinde koruyucu aşılama denemeleri yapılmış ve çok iyi sonuç alınmıştır. Bu durum gözönüne alınarak; Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumunca desteklenen bu çalışmamızla yurt koyuncululuğunu direkt olarak olumsuz yönde etkileyen ve çok büyük parasal kayıplara yol açan « V İ B R İ O - F E T Ü S » enfeksiyonuna karşı bir aşı geliştirme çabasına giriştik.

## L İ T E R A T Ü R

Firchammer ve arkadaşları (3) patojen vibrio - fetüs kültürleriyle gebe koyunlar üzerinde yaptıkları bir çalışma sonunda; koyunların gebeliklerinin 1. ayında vibriosis'e karşı duyarlı olmadıklarını buna karşın 2., 3. ve 4. aylarında duyarlı olduklarını saptadıklarını bildirmektedirler. Jensen ve arkadaşları (7) bir önceki yıl vibriosis'ten ötürü yavru atan koyunların ikinci yıl yapılan test enfeksiyonuna karşı bağışık olduklarını tesbit etmişlerdir. Mitscherlich ve Liess (19) yaptıkları geniş bir çalışma ile vibriosis'ten ötürü sıkıt yapan ana koyunların kan serumlarını mukayeseli olarak agglütinasyon ve komplement - fixasyon testleriyle muayene ettiklerini, komplement - fixasyon testinin agglütinasyona nazaran daha iyi çalıştığının saptanmış olduğunu ve koyunların vibriosis'inin teşhisinde bu test'in güvenle kullanılabileceğini salık vermektedirler. Miller ve arkadaşları (14) koyunların vibriosis'inin; ileri gebelik devresinde vibrio - fetüs etkeninden ötürü sıkıtle karakterize olan bir enfeksiyon hastalığı olduğunu, salgının ilk çıktığı sürülerde gebe hayvanların % 70'e varan oranda yavru atabileceklerini ve yavru atan analarda % 5 kadar ölüm olabileceğini, deneysel olarak gebeliklerinin 5. ayı başında peros yolla enfekte ettikleri 13 koyundan 6'sında (% 46.1) bakteriyemi ve 49 hayvandan 32 sinin de vibrio - fetüsle enfekte olduklarını saptamışlardır. Miller ve Jensen (15, 16) yaptıkları iki çalışma ile canlı vibrio - fetüs aşısının formolle inaktive edilmiş nazaran koyunlarda daha iyi bir bağışıklık doğurduğunu kanıtlamışlardır.

Ogg, J. E. (20); vibrio - fetüs serotip 01 suşunun kanlı thiol veya albimi agarda 72 - 92 saatlik bir inkubasyondan sonra kokoid forma dönüştüklerini, buyyonda ve semisolid vasatlarda ise bu değişikliğin daha yavaş seyrettiğini, tipik spiral formdaki jermelerin tavşanlarda kokkoid olanlara nazaran daha yüksek titrede agglütininin hasıl ettiklerini, spiral hücrelerle kokkoidler arasında kross aglutinasyonun mevcut olduğunu bildirmektedir. Miller ve Jensen (15, 16) yaptıkları iki çalışmada adjuvansız canlı ve formolle inaktif aşılarla aşıladıkları 210 koyundan canlı ile aşılananlarda sıkıt vukubulmadığını, buna karşın inaktivle aşılananlarda % 28 oranında yavru atma görüldüğünü saptamışlardır. Miller, Jensen ve Ogg. (17); koç katımından önce vibrio - fetüs serotip: 0I ve 0V suşlarıyla hazırladıkları iki ayrı aşı ile iki grupta toplanan koyunları aşıladıklarını sonra bu hayvanları gebeliklerinin ileri devresinde eprüve et-

tiklerinde bunlarda kros bağışıklığın teşekkül etmediğini müşahade etmişlerdir. Aynı araştırmacılar ikinci bir deneyde her iki tipi ihtiva eden kombine bir aşı ile aşılanılarda serotip: OI ve OV'e karşı bağışıklığın teessüs ettiğini saptamışlardır. Miller ve arkadaşları (17); formülle inaktive edilmiş vibrio jerm süspansiyonundan a) Mineral yağla, b) Al (OH)<sub>3</sub> li c) yalnız inaktive vibrio jermelerini ihtiva eden 3 değişik aşı hazırladıklarını; tüm aşılarla kontrol hayvanlarını gebeliklerinin 5. ayı başında patojen vibrio kültürü ile peros olarak eprüve ettiklerini deney sonunda mineral yağlı aşı ile aşılanan 63 koyundan 1'inde, alüminyum hidroksitli aşı ile aşılanan 69 hayvandan 3 ünde ve yalnız inaktif vibrio jermeleriyle aşılananların % 14.2 sinde, kontrol hayvanlarının ise % 88 inde sıkıtların meydana geldiğini saptadıklarını bildirmişlerdir.

Miller, Jensen ve Ogg (17); yaptıkları başka bir deneyde vibrio-fetüs serotip: OI ve OV arasında kross (heterolog) bir immunitenin teessüs etmediğini kanıtlamışlardır.

Meinershagen, Waldhahn ve mesai arkadaşları (11); vibrio-fetüs kültürleri yedirilen alaca kargalardan 213 gün sonra ajanı tekrar izole ettiklerini ve bu ajanlarla peros olarak enfekte edilen 20 gebe koyundan 14'ünde sıkıtların meydana geldiğini isbatlamışlardır. Storz ve çalışma arkadaşları (21); Montana Nomenklatürüne göre koyunların vibriosisi Vib. fetüs OI ve OV tarafından bir bakteriyemi safhası ile meydana geldiğinin saptanmasından sonra aktif bir koruyucu aşılamaya ile sağlanacak bağışıklık bu salgının sebep olduğu ekonomik kaybın önlenmesinde çok büyük fayda sağlayacağını bildirmişler ve bu maksatla ticarete bulunan OI ve OV serotip suşlarından hazırlanmış inaktif bir aşı ile koyunları koç katımından 1 gün önce ve üç hafta sonra olmak üzere iki aşılamaya tâbi tuttuklarını, aşıları hayvanların 5, 17, 29 ve 41. aylarda patojen vibrio-fetüs OI suşu eprüve edildiklerini ve aşılanılarda % 50 nin üzerinde bir bağışıklığın teessüs ettiğinin saptanmış olduğunu buna karşı kontrol hayvanlarının % 94.2 sinde sıkıtların meydana gelmiş olduğunu bildirmişlerdir. Yine Storz ve mesai arkadaşları (21); her biri 2000 koyundan ibaret iki sürüdeki hayvanları ticari inaktif vibrio aşısı ile aşıladıklarını, «A» sürüsüne satın alınıp sonradan katılan tüm hayvanları da her yıl aşıladıklarını «B» sürüsüne sonradan satın alınıp katılanları ise aşılamadıklarını, deney sonunda 5 sene içerisinde «A» sürüsü hayvanlarında hiç bir sıkıtı olayının meydana gelmemesine rağmen «B»

sürüsünde aşılanmayanlar arasında bu sürü içinde iki Vibrio epizootisinin çıktığını ve abort vak'alarının % 36'ya ulaştığını müşahade etmişlerdir. İyigören ve Ünlü (6); % 0.3 formülle inaktif vibrio jermelerinden hazırladıkları bir suspansiyonla 14 baş koyunu aşıladıklarını ve bunlarda % 71.4 oranında bir bağışıklık elde ettiklerini bildirmişlerdir. Lincoln ve Trout (8); inaktif vibrio jermelerinden mineral yağlı ve alüminyum hidroksitli adjuvanlı iki aşı hazırladıklarını ve bunları mukayeseli olarak tek bir doz halinde koyunlarda denediklerini, deneme sonunda alüminyum hidroksitli vibrio aşısının, mineral yağlı olana nazaran daha erken ve fazla miktarda antikör meydana getirdiğini saptamışlardır,

Miller, V.A. (18) araştırmacı koyunlarda meydana gelen vibriosis'ten mütevellit sıkıt vak'alarının ekserisinin vibrio fetüs Serotip OI olduğunu, alüminyum hidroksitli adjuvanlı aşının koyunlarda hiç bir komplikasyona sebebiyet vermediğini saptamıştır.

Meinershagen ve mesai arkadaşları (12); vibriosis epizootisi geçirmiş olan koyunları gebeliklerinin 4.'ncü ayı içinde homolog patajen vibrio fetüs suşu ile ikinci yıl peros olarak eprüve ettiklerini, bunlardan bir önceki sene vibriosis'ten ötürü yavru atanlarla, epizooti anında normal kuzulayanların sıkıt yapmadıkları, buna karşın vibriosis epizootisinde aynı sürüde bulunan fakat gebe olmayan iki yaşlı koyunlardan % 36 sının ve vibriosis'e hiç bir şekilde maruz kalmamış olan diğer gurup iki yaşlılarda ise % 65 oranında yavru atmaların vuku bulduğunu bildirmişlerdir.

Markovic ve mesai arkadaşları (10); 1968 yılında Yugoslavya'da 168 koyun sürüsünde 5130 baş hayvandan 289'unda sıkıt görüldüğünü, vibrio suşundan hazırlanan bir aşı ile aşılanan koyunlarda müteakip yıllarda yavru atma vak'alarına rastlanmadığını bildirmektedirler. Lowrie ve Pearce (9); vibriosis fetüs organizmalarıyla enfekte ettikleri gebe koyunlarda jermelerin yalnız uterusda toplandıklarını ve en çok plazenta ve Chorionun bulaştığını deneysel olarak kanıtladıklarını bildirmektedirler,

Meinershagen ve çalışma arkadaşları (13); formolle inaktif (% 0.2) vibrio - fetüs intestinales serotip OI suş sedimentinden lanolin ve mineral yağlı adjuvantlı bir aşı hazırladıklarını bu aşı ile ş/c yolla 2 yaşlı 260 koyunu aşıladıklarını, aşılarla kontrolleri gebeliklerinin 3. ayında homolog patojen vibrio fetüs serotip OI kültürü ile peros olarak eprüve ettiklerini, deney sonunda kontroller-

de % 50 aşılılarda ise % 4,5 - 10 arasında değine oranda sığıtların görüldüğünü bildirmişlerdir. Gilmour ve Thompson (4); bu araştırmacılar formolle inaktive edilmiş (% 0,2) vibrio jerm suspansiyonuna ilâve ettikleri Bayol F ve Falba mineral yağla elde ettikleri adjuvantlı aşı ile bir gurup koyunu aşıladıklarını ve bu hayvanları eprüve ettiklerinde aşılılarda hiç bir sığıt olayının görülmemesine rağmen kontrollerin % 44.4'ünde abortusların teşekkül etmiş olduğunu bildirmişlerdir. Berkenhagen ve Letz (1); bir koyun sürüsünde meydana gelen 150 ölü doğum vak'asında vib. fetüs OI izole ettiklerini, aynı bölgede sığırlar arasında da genital sığır vibriosis'inin saptanmış olduğunu beyan etmektedirler. Clark ve Monsbourgh (2); yaptıkları bir araştırma ile koyunlarda meydana gelen sığıtların 11'inde vib. fetüs intestinales serotip OI, 1'inde serotip OII ve 54 vak'ada serotip OV saptamışlardır. Gilmour, Thompson ve Fraser (5); vibriosis'in çıktığı bir sürüde 2 deneme yaptıklarını: a) 1. deneyde koyunları kuzulamaya 40 gün kala, b) 2. sinde ise 70 gün kala peros olarak patojen vib. fetüs serotip OV suşu ile enfekte ettiklerini, her iki gurup deneme hayvanları arasında ayrıca kontrol hayvanı bırakmış olduklarını; bildirerek, 1. deneyde patojen vibrio suspansiyonunun verildiği an sürüden sondaj mahiyetinde mikrop verilmiş olanların içinden 20 koyuna deri altı yolla inaktiv Bayol F ve Falba vibrio aşısının yapıldığını, 2. deneyde ise koyunlar arasında ilk abortüsün vukubulduğu gün bu sürüde bulunan diğer tüm hayvanların aynı aşı ile aşılandıklarını bildirmişlerdir. Araştırmanın sonunda her iki deneyde de aşılılarda kontrollere nazaran kuvvetli bir bağışıklığın teessüs ettiğini ve ancak homolog suşlarla koyunlarda bir immunitenin sağlanabileceğini salık vermektedirler.

#### MATERYAL VE METOD

##### 1) Bakteriyolojik ekimler için gerekli marazi maddeler ;

Yerli vibrio - fetüs suşlarının izolasyonu için yurdumuzun koyun yetiştiriciliği ile yoğun olduğu bölgelerde salgın şekilde sığıtların çıktığı Adana, Afyon, Ankara, Çankırı, Denizli, Eskişehir, Kayseri, Kırşehir, Konya, Nevşehir, Malatya, Samsun, Sivas, Yozgat illerindeki sürülerden temin edilen 206 adet atık kuzu ve bunlara ait fotal organlar bakteriyolojik ekimlerde marazi madde olarak,

2 — Enfeksiyöz karakterde yavru atanların mevcut olduğu Adana, Afyon, Ankara, Antalya, Artvin, Balıkesir, Bursa, Çankırı, Denizli, Diyarbakır, Elâzığ, Eskişehir, İzmir, İzmit, Kastamonu, Kars,

Kayseri, Kırklareli, Kırşehir, Konya, Nevşehir, Manisa, Malatya, Mersin, Sinop, Sivas, Van illerindeki koyun sürülerinde sıkıt yapmış ana hayvanlardan alınan 1063 adet kan serumu serolojik muayenelerde marazi madde olarak,

3 — Atık marazi maddelerden bakteriyolojik ekimler sonunda ayırımı yapılan 31 adet yerli vibrio suşu, serotip tayini çalışmalarında antijen istihşâlinde materyal olarak,

4 — Yerli vibrio -fetüs suşlarının patojenite test denemelerinde 2 yaşlı 10 adet gebe Akkaraman koyunu,

5 — Çalışmalarımızla tarafımızdan geliştirilmiş bulunan alüminyum hidroksitli canlı ve formolle inaktiv iki vibrio aşısının bağışıklık doğurma güçlerinin saptanması için ilk defa doğum yapacak olan iki yaşlı 26 baş Akkaraman koyunu materyal olarak kullanılmışlardır.

6 — Kültür vasatları.

a — Nutrient - agar (Ph: 7.4)

*Terkibi; 1 litre vasat için*

Beef - ekstrakt	5.0 gr.
Sodyum klorür	5.0 gr.
Pepton	10.0 gr.
Agar	20.0 gr.
Distile su	1000.0 ml.

*Not : Vasata ayrıca (1 lt.)*

a) At serumundaki % 20 lik Glikoz eriyiğinden 60 ml.

b) Ethyl viole eriyiğinden (1/1000) 1.25 ml. katılır ve kültür kaplarına tevzi edilir.

b — % 10 koyun kanlı Fluid Thioglycolatlı besi yeri (Difconun) bu vasata % 2 oranında agar ilâve edilir. Sterilizasyondan sonra % 10 koyun kanı ve % 0.2 lik Brillant - grün eriyiğinden 1 litreye 11.5 cc. katılır.

c) Vibrio suşlarının idamesi için karaciğerli buyyon,

7) Serolojik muayenelerde Komplemen - fixasyon testi kullanılmıştır (19).

## 8 — Bakteriyolojik Yoklamalar

a — Atık kuzulara ait f3tal organlar (karaciğer, dalak, mide 3zsuyu ve beyin) usul3ne g3re steril şartlarda k3lt3r vasatlarına ekimleri yapılır ve % 10 CO<sub>2</sub> atmosferi altında +37°C lik et3vde desikat3rlerde 4.g3n s3re ile kuluçkaya bırakılırlar.

b — Kulukça s3resi tamamlanan k3lt3rler tetkik edilerek varsa vibrio kolonileri ayrılır, gerekli mikroskopik muayenenin tamamlanmasından sonra ayrılan vibrio suşları idame besi yeri olan karaciğerli buyyona geçirilirler. Sonra l3boratuvar suşu olarak isimlendirilirler.

c) Karaciğerli buyyonda saf halde 3reyen vibrio suşlardan serotiplerinin belirlenmesi için gerekli antijenler hazırlanır. (19)

d) Elde edilen vibrio antijenleri; serotipleri belli tip spesifik antivibrio serumlarıyla komplement - fixasyon testine (19) t3bi tutularak izole edilen vibrio suşlarının tipleri saptanır.

## 9 — Patojenite test denemeleri

a) Bu maksatla izole edilen ve serotipleri belirlenen vibrio suşlarının k3lt3rleri yapıldı.

b) K3lt3rlerin temizlik kontrollerinden sonra serum fizyolojikle suspansiyonları hazırlandı ve bulanıklıkları Mc Farland V'e g3re ayarlandı.

c) Yukarıdaki tarzda elde edilen vibrio - jerm suspansiyonundan gebeliklerinin 4. ayını tamamlamış olan iki yaşı 10 baş Akkaraman koyununa peros olarak (beherine) 25.0 ml. içirilmiştir.

## 10 — Serolojik muayeneler

a) Yavru atmış ana koyunlardan temin edilen kan serumları vibriosis bakımından komplement - fixasyon metodu ile serolojik muayeneye t3bi tutulmuştur. (19)

b) Komplement - fixasyon test'i için gerekli olan antijenler ayırım yapılan yerli vibrio - fet3s suşlarından l3boratuvarımızda diyalize (19) metodu ile hazırlanmış ve aynı metodla kullanma titreleri saptanmıştır.

c) Tip spesifik anti vibrio serumları; serotipleri belirli vibrio antijenleriyle tavşanlardan istihs3l edilmiştir.



## 11 — Vibrio Aşılarının Hazırlanışı

Lâboratuvarımızda yerli vibrio suşlarından iki çeşit aşı hazırlanmıştır.

- Alüminyumhidroksitli canlı vibrio aşısı,
- Alüminyumhidroksitli formolle inaktiv (% 0,4) vibrio aşısı.

Her iki aşıda mevcut literatür bilgilerinin ışığında aşağıdaki tarzda hazırlanmışlardır.

Vibrio - fetüs serotip O1 yerli suşlarından % 10 koyun kanı ihtiya eden Fluid Thioglycollate besi yerine ekim yapılarak 4 gün süre ile % 10 CO<sub>2</sub> atmosferi altında + 37°C de kültürleri elde edildi.

Kültürlerin temizlik kontrollerinden sonra serum fizyolojikle suspensiyonları hazırlandı ve elde edilen vibro - jerm suspensiyonunun bulanıklığı standard Mc Farland I'e göre ayarlandı. Ve bu şekilde elde edilen tüm vibrio suspensiyonu iki eşit hacme steril şartlarda ayrıldı.

Vibrio - jerm suspensiyonlarından birisine son konsantrasyon (% 0.4) olacak şekilde ticarete bulunan % 37 lik Formaldehid katılmış ve suspensiyon iyice çalkalandıktan sonra +37°C lik etüvde 48 saat tutulmuştur. Bu sürenin bitiminde vibro - jermelerinin inaktive olup olmadıklarını kontrol gayesiyle mikroskopik ve kültürel muayene yapılmıştır. İnaktivasyonun gerçekleşmesinden sonra bu suspensiyona eşit hacimde % 12 lik Alüminyumhidroksit jeli katıldı ve oda derecesinde 1 saat çalkalandı.

Formol katılmamış olan diğer vibrio - jerm suspensiyonuna ise aynı şekilde eşit hacimde Alüminyumhidroksit jeli katılmış ve aynı şartlarda oda derecesinde çalkalanmıştır.

Yukarıdaki tarzda hazırlanan aşılar kullanılıncaya kadar buz dolabında saklanmıştır.

## 12 — Vibrio - Aşılarının deneme hayvanlarına tatbiki

a) Gerek canlı ve gerekse formolle inaktiv vibrio aşılarının tatbiki için ilk defa doğum yapaçak olan iki yaşlı 13 er baş akkaraman koyunu kullanılmıştır.

b) Deneye alınan her iki guruptaki koyunlar koç katımından 4 hafta önce koltukta deri altı yolla aşılanmışlardır. (doz: 2.0 ml.)

c) Aynı yaş gurubunda bulunan aynı ırktan 11 baş koyunda hiç bir işleme tâbi tutulmadan kontrol hayvanı olarak bakıma alınmıştır.

8 — Her iki aşı ile aşılananlarla kontrol hayvanlarının eprüvasyonları (test enfeksiyonu):

a) Tüm aşılarla kontrol koyunları gebeliklerinin 5. ayı başında patojen vibrio fetüs serotip: 01 suşundan kültür suspensiyonu Mc Farland V'e göre ayarlanarak, beher koyuna bundan 25.0 ml. peros yolla içirilmek suretiyle eprüve edilmişlerdir.

b) Koyunlardaki bağışıklık süresinin saptanması gayesiyle tek bir defa vibriosis'e karşı aşılama tâbi tutulan deney hayvanlarından 12 koyun ikinci kez tohumlanmış ve gebeliklerinin 5. ayı başında tekrar patojen vibrio - fetüs suşu ile peros olarak eprüve edilmişlerdir.

c) Vibriosis'e karşı aşılanmış olan tüm deney koyunları periyodik olarak her üç haftada bir olmak üzere serolojik muayeneden geçirilmişlerdir. Bu muayene içinde komplement - fixasyon test'i uygulanmıştır.

## SONUÇLAR

1 — Bakteriyolojik muayenelerden alınan sonuçlar

a) Araştırmamızda yurdun çeşitli yörelerinden gerek bizzat temin edebildiğimiz ve gerekse lâboratuvarımıza değişik illerden gönderilmiş olan yavru atan koyunlara ait 206 adet atık cenin ve bunların fetal organlarından Nutrient agar ve % 10 koyun kanlı Fluid Thioglycollat besi yerine bakteriyolojik ekim yapılmıştır.

b) Bu ekimler sonunda 31 adet Vibrio suşu izole edilmiştir. (% 15)

c) Tip spesifik antivibrio serumlarıyla yapılan serotip tayini çalışmalarında ayırımı yapılan tüm 31 adet vibrio suşunun «vibrio - fetüs serotip 01» oldukları saptanmıştır.

a) Serotipleri belirlenen yerli vibrio - fetüs suşlarından hazırlanan kültürlerin peros yolla içirildiği gebe koyunlardan (10 adet)

üçü sıkıt yapmış diğer üçünün de doğan kuzuları kısa bir süre sonra ölmüştür. Fötal organlardan yapılan ekimlerde tekrar vibrio - fetüs organizmleri üremiştir. Bakteriyemi oranı % 60 dır.

b) İzole edilen bu vibrio suşlarında serotip: OI olduğu saptanmıştır.

c) Bu suretle sıkıt yapan koyunların fötal organlarından laboratuvarımızda izolesine muvaffak olunan tüm vibrio suşlarının gebe koyunlar için patojen oldukları deneysel olarak kanıtlanmıştır.

### 3 — Serolojik yoklamalardan elde edilen sonuçlar

a) 1973 - 1976 yıllarını kapsayan çalışma süresi içinde; yurdumuzun değişik yöre ve bölgelerinden Antalya, Artvin, Balıkesir, Bursa, Diyarbakır, Elâzığ, İzmit, İzmir, Kastamonu, Kars, Kırklareli, Manisa, Mersin, Sinop, Van illerinden temin edebildiğimiz ve yavru atan ana koyunlara ait 1063 adet kan serumu serolojik olarak Komplement - fixasyon test'i ile işlenmiş olup bunlardan 468'inin vibriosis yönünden reaktör oldukları saptanmıştır. (Ortalama olarak % 44,0).

b) Elde edilen bu sonuç; sıkıt yapan her 100 koyundan takribi olarak 44.0'ünün vibriosis enfeksiyonu geçirmiş olduğunu göstermektedir.

c) Serolojik muayeneye tâbi tutulan 1063 adet koyun kan serumunda vibrio - fetüs serotip: OI karşı teşekkül etmiş antikorların mevcudiyeti tarafımızdan saptanmıştır.

### 4 — Alüminyumhidroksitli adjuvantlı vibrio aşılama denemelerinden alınan sonuçlar

a) Alüminyumhidroksitli canlı vibrio aşısı deneme sonucu;

Bu aşı ile ilk defa kuzulayacak iki yaşlı 12 baş Akkaraman koyunu koç katımından 4 hafta önce aşılanmış ve gebeliklerinin 5. ayı başında patojen vibrio - fetüs suşu kültürü ile peros olarak eprüve edilmişlerdi.

b) Aşılılar her üç haftada bir olmak üzere serolojik muayeneye tabi tutulmuştur. Serolojik muayenede aşılıların kan serumlarında vibriosis'e karşı teşekkül eden spesifik antikorların 3. haftadan itibaren yükselmeye başladığı, kandaki bu seviye 45 - 60. güne ka-

dar korunduğu ve sonra seviye giderek düşerek nihayet 105 - 120. günde kaybolduğu deneysel olarak saptanmıştır.

c) Canlı vibrio aşısı ile aşılanan koyunların eprüvasyon sonucu;

Aşıların eprüvasyonu sayfa 16/4, a, b, c ye göre yapılmıştır. Aşılanan 12 koyundan 5'i kısır kalmış 7'si eprüvasyondan sonra normal doğum yapmıştır. Canlı aşı ile alınan bağışıklık oranı % 100 dür.

d) Aşılardan eprüvasyon tarihine kadar tampon testle vajen mayii alınarak bakteriyolojik ekim yapılmış fakat vibrio organizmleri ürememiştir.

2 — Alüminyumhidroksitli formolle inaktiv canlı vibrio aşısı deneme sonucu

a) Bu aşı ile iki yaşlı 12 koyun koç katımından 4 hafta önce aşılanmış ve aynı şartlarda gebeliklerinin 5. ayı başında peros olarak patojen vibrio - fetüs kültürü ile eprüve edilmiştir.

b) Bu hayvanların kan serumlarında aşılamaadan dolayı teşekkül eden spesifik antikorlarda aynen canlı aşıda olan seyri takip ettiği serolojik olarak saptanmıştır.

c) Formolle inaktiv vibrio aşısı ile aşılanan 12 koyundan 11 adedi normal doğum yapmış yalnız birisi yavru atmıştır. Bu aşılamaadan elde edilen bağışıklık oranı ise % 91.7 dir.

3 — Kontrol hayvanlarının patojen vibrio suşu ile yapılan eprüvasyon sonucu

a) Bu hayvanlarda aynen aşıllar gibi aynı şartlar altında peros olarak patojen suş suspensiyonu ile eprüve edilmişlerdir.

b) 11 kontrol hayvanından 8'i yavru atmış ve bunlara ait fetüslerden 6'sında tekrar vibrio organizmleri üremiştir. Sıkıt oranı % 72.7 dir.

c) Kontrol hayvanlarının atık fetüslerinden izole edilen vibrio suşlarının da vibrio - fetüs serotip: OI olduğu kanıtlanmıştır.

7 — Vibriosise karşı aşılanmış koyunlarda bağışıklık sürelerinin saptanması için yapılan denemelerden alınan sonuçlar

a) Bu maksatla gerek canlı ve gerekse inaktif vibrio aşısı ile aşılanmış toplam 12 baş koyun uzun bir süre denemede tutularak müteakip gebeliklerinin 5. ayı başında ikinci kez aynı patojen vibrio suşu ile peros olarak aynı şartlar altında eprüve edildiler.

b) Eprüvasyon sonunda bu hayvanların hiç birisinde sıkıt olayı görülmemiş olup tümü normal olarak kuzulmuşlardır. Bu husus bize bir kere vibrio'ya karşı aşılanan koyunların ikinci gebeliklerinde bir vibrio epizootisinde bağışık kalacaklarını deneysel olarak kanıtlamış bulunmaktadır.

#### 8 — Aşıların Zararsızlık Kontrolleri

a) Alüminyum hidroksitli canlı aşı ile aşılanan koyunların hiç birisinde aşıdan dolayı herhangi bir komplikasyon meydana gelmemiştir.

b) Aynı şekilde formolle inaktif vibrio aşısı ile aşılananlarda da aşıdan mütevellit herhangi bir komplikasyon teşekkül etmemiştir.

9 — Lâboratuvarımızda hazırlanan Alüminyumhidroksitli canlı ve Formolle inaktif iki vibrio aşısı ile yapılan saha tatbikatı ve alınan sonuçlar

a) Söz konusu aşıların saha tatbikatı için koyunlarda vibriosis'in en fazla saptanmış olduğu Kayseri ilinin Mimarsinan ve Çiftlik köyleri ilgili Veteriner Müdürlüğünün olur ve yardımlarıyla seçilmiştir.

b) Adı geçen köylerde değişik kişilere ait iki yaşlı 420 koyunun yarısına canlı ve diğer yarısına da inaktif vibrio aşısı s/c olarak enjekte edildi. (doz: 2.0 ml ve koç katımından 4 hafta önce aşılama uygulanmıştır.)

c) Koyunlarda doğuma kadar ve doğumda aşıdan ötürü bir komplikasyon görülmemiştir.

#### TARTIŞMA

1 — Dünyanın değişik ülkelerinde çok sayıdaki araştırmacılar; koyunlardaki vibriosis etkeninin çoğunlukla vibrio - fetüs serotip: OI ve OV olduğunda fikir birliği etmektedirler. (1, 2, 3, 17). Bizde kendi araştırmamızla yurdumuzun değişik bölgelerinde yavru atan

koyunlardan izolesine muvaffak olabildiğimiz 31 adet vibrio suşunun vibrio - fetüs serotip: OI olduğunu saptamış bulunuyoruz. Bu bulgu, dünyanın değişik ülkelerindeki bilim adamlarının araştırma sonuçlarını doğrular kapsamıdır. (19, 20)

2 — Yine bir çok araştırmacılar koyunlarda vibriosis'ten ileri gelen sıkıntılarını; epizootinin ilk çıkmış olduğu sürülerde % 70'e kadar varan oranda bir tahribat yaptığını (13, 14) bildirmektedirler. Bu araştırmamızla: yurdumuzda koyunlar arasında meydana gelen sıkıntıların % 44.0'ünün vibriosis'e bağlı olduğunu saptamış bulunuyoruz. Başka bir deyimle yurdumuzda koyunlar arasında görülen her 100 sıkıt vak'asından ortalama bir rakamla 44'ünün vibriosis'ten ileri geldiği anlaşılmaktadır.

3 — Çok sayıdaki araştırmacılar; vibriosis geçiren sürülerdeki koyunların müteakip yıllarda aynı hastalıktan ötürü tekrar yavru atmadıklarını diğer bir deyimle bağışıklık kazandıklarını bildirmektedirler. Bu maksatla saf vibrio jermelerinden vibriosis'e karşı canlı ve formolle inaktif aşılar (6, 7, 11, 17) hazırladıklarını, diğer bazı bilim adamları da Mineral yağlı ve Alüminyumhidroksitli adjuvantlı vibrio aşıları elde ettiklerini (1,2,8,12,15) adjuvantlı aşılardan adjuvantlı olmıyanlara nazaran daha iyi bağışıklık verdiklerini açıklamaktadırlar. İşte bu husus gözönüne alınarak tarafımızdan serotipleri belirlenen yerli vibrio suşlarından (heterelog suşlar kros bağışıklık vermediklerinden, 17) Alüminyumhidroksitli canlı ve inaktif iki çeşit vibrio aşısından deneme koyunlarında çok iyi bir bağışıklık elde edilmiştir. Canlı aşısındaki bağışıklık yüzdesi % 100 ve inaktif aşıda ise % 91.7 dir. (16).

4 — Diğer araştırmacılarca (18) vibrio aşılardan dolayı aşılı koyunlarda herhangi bir komplikasyonun meydana gelmediği saptanmış bulunmaktadır. Bizim yaptığımız vibriosis aşılama denemelerinde de aşılı hayvanlarda aşından ötürü hiç bir komplikasyon görülmemiştir.

5 — Ayrıca bu çalışmamızda tek bir doz aşı ile bir defa vibriosis'e karşı aşılanmış olan koyunlardan 12'si, ikinci gebeliklerinde patojen vibrio kültürü ile ikinci kez eprüve edilmişler ve bu hayvanların vibriosis'e karşı ikinci gebeliklerinde de bağışık oldukları saptanmıştır. Bizim aldığımız bu sonuç diğer bilim adamlarının bu hususdaki bulgularını teyid etmektedir. (10, 11, 12, 20, 21).

Bulguların değerlendirilmesi sonuç olarak :

1 — Çalışmamız sonunda 206 koyun sıkıt marazi maddesinden 31 adet vibrio suşu izole edilmiştir.

2 — Ayırımı yapılan bu vibrio suşlarının tamamının vibrio-fetüs serotip 0I'e ait oldukları deneysel olarak saptanmıştır.

3 — Bu suşların tümünün gebe koyunlar için patojen oldukları kanıtlanmıştır.

4 — Yavru atan 1063 baş ana koyuna ait kan serumlarının serolojik muayenesinde 468'inin vibriosis bakımından reaktör oldukları anlaşılmıştır. (% 44.0)

5 — Alüminyumhidroksitli canlı ve formolle inaktiv vibrio aşılarıyla yapılan denemelerde, canlı aşından % 100 ve inaktivden %91.7 oranda koyunlarda bağışıklık elde edilmiştir.

6 — Vibriosis'e karşı tek bir doz ile bir defa aşılanmış koyunların, ikinci gebeliklerinde yapılan test enfeksiyonunda bağışık oldukları bu araştırmamızla kanıtlanmıştır.

## Ö Z E T

Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumunca desteklenmiş olan bu araştırmamız 1973 - 1976 yılları içerisinde gerçekleştirilmiştir.

1 — Yurdumuzun değişik bölgelerinde koyun sürüleri arasında çıkan enfeksiyöz tabiattaki yavru atma vak'alarından temin edilen 206 adet fetüs marazi maddesinden yapılan bakteriyolojik ekimler sonunda 31 vibrio suşu izole edilmiştir.

a) Ayırımı yapılan bu 31 vibrio suşunun vibrio - fetüs serotip: 0I gurubuna ait oldukları deneysel olarak kanıtlanmıştır.

b) Yine bu vibrio suşlarının tümünün gebe koyunlar için patojen oldukları isbatlanmıştır.

c) Suşlar karaciğerli buyyonda hiçbir pasaja tâbi tutulmadan oda sıcaklığında muhafaza edildiklerinde üreme yeteneklerini en az dört yıl korudular.

2 — Yurdun değişik yörelerinden yavru atan ana koyunlardan temin edilen 1063 kan serumu serolojik olarak komplement - fixasyon testiyle işlenmiş olup bunlardan 468'inin vibriosis yönünden reaktör oldukları saptanmıştır.

a) Muayeneye tâbi tutulan bu serumlarda vibrio - fetüs serotip: OI e karşı teşekkül etmiş spesifik antikorların varlığı tesbit edilmiştir.

3 — Yerli vibrio fetüs suşlarından iki çeşit Alüminyumhidroksitli aşı hazırlanmıştır.

a) Alüminyumhidroksitli canlı,

b) Alüminyumhidroksitli formolle inaktiv vibrio aşısı.

Deneme sonunda canlı aşidan koyunlarda % 100 ve inaktiv aşidan ise % 91.7 oranda bir bağışıklık elde edilmiştir.

4 — Koyunlarda aşılardan ötürü herhangi bir komplikasyon görülmemiştir.

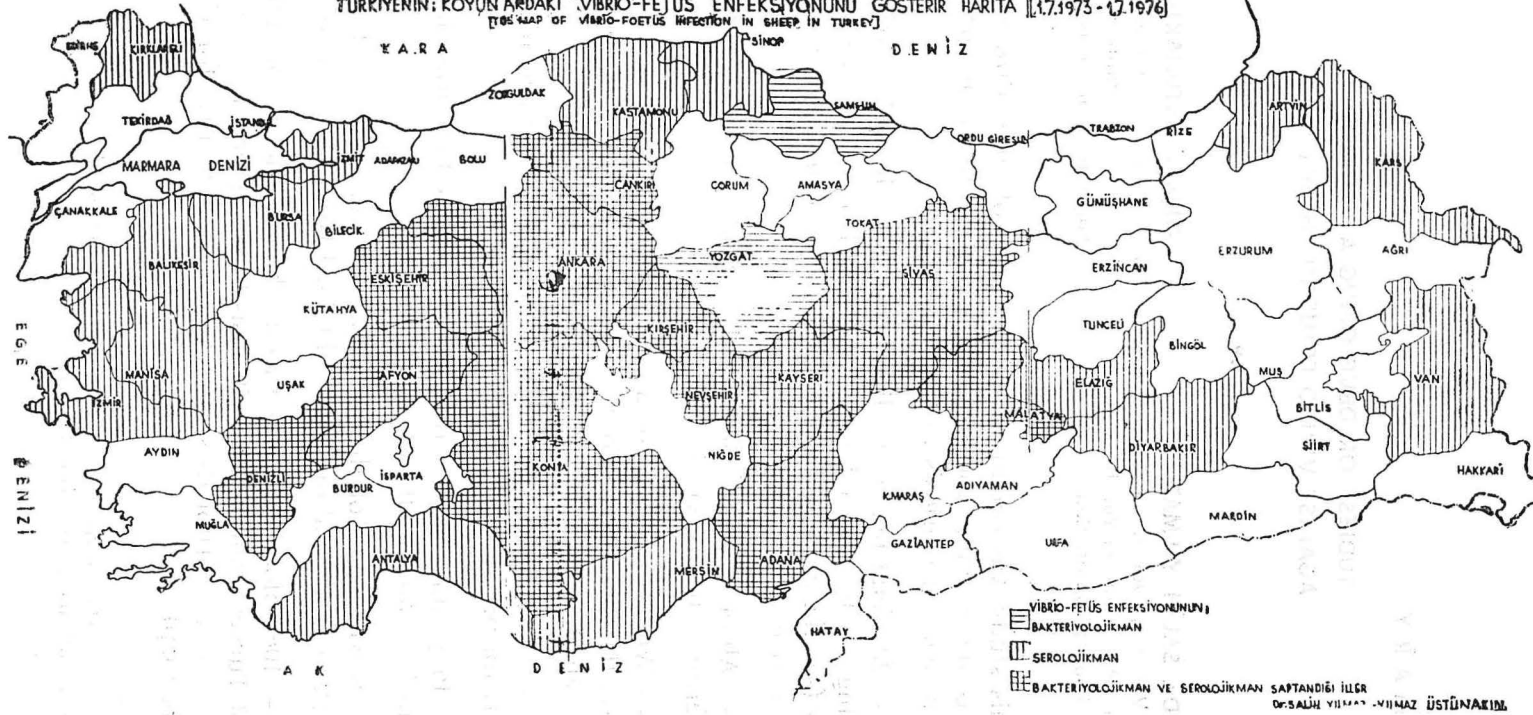
5 — Her iki aşı ile 420 koyun üzerinde saha tatbikatı yapılmış olup tüm aşıllar normal doğum yapmışlar ve aşılardan ötürü hiç bir komplikasyona rastlanmamıştır.

6 — Bu çalışmamızla vibriosise karşı bir kere aşılanmış olan koyunlarda bağışıklığın ikinci gebeliklerinde de devam ettiği deneysel olarak kanıtlanmıştır.



TÜRKİYEİNİN KOYUN ARDAKI VIBRIO-FETÜS ENFEKSİYONUNU GÖSTERİR HARİTA [(17.1973-17.1976)

[THE MAP OF VIBRIO-FETUS INFECTION IN SHEEP IN TURKEY]



**S U M M A R Y**

**STUDIES FOR DEVELOPING A VACCINE  
AGAINST VIBRIO FETUS IN SHEEP (\*)**

by

**Dr. SALİH YILMAZ**

Etlik Vet. Kont. Araştırma Enst.  
Virüsü - Abortuslar ve Yet. Hast.  
Lâboratuvarları Şefi

**YILMAZ ÜSTÜNAKIN**

Etlik Vet. Kont. Araştırma Enst.  
Tüberküloz ve Paratüberküloz  
Lâboratuvarları Uzmanı

This study was conducted in the years of 1973-1976, with the object of determining the incidence of vibrio fetus and producing a vaccine against vibriosis in Turkey.

1 — 206 fetal materials (liver, spleen, brain and gastric Juice) belonging to the aborted fetus of sheep from different parts of Turkey (see the map) were examined bacteriologically for vibriosis, and 31 native vibrio strains were isolated.

2 — All of the vibrio strains reacted positively by serologically with Serotype (OI) of vibrio strains.

3 — When the vibrio strains kept in liver broth at room temperature, the stability of growth did not change at last four years, without any passages.

4 — These vibrio strains were found as pathogenic experimentally for pregnant sheep as follows :

a) Pregnant sheep were aborted in some days after infection with vibrio strains orally.

b) Sero type OI of the vibrio strains were reisolated again in the 60 percent of fetal materials obtained from abortions of sheep.

5 — 1063 blood sera taken from aborted sheep from different parts of Turkey examined for vibriosis by Complement fixation test, and 468 (44 percent) of these sera were found positive for vibriosis (see the map).

(\*) This study was supported by Scientific and Technical Research Council of Turkey, with the project No VHAG-193.

6 — Two kind of vaccines as being of an aliminium hydroxided live vaccine and an aliminium hydroxided vaccine inactivated by formalin were produced with the native vibrio strains, isolated in the study.

Both live and inactive vaccines gave en excellent immunity in pregnant sheep, 100 percent and 91.7 percent respectively. It was also observed that the immunity lasted in the second pregnancy of sheep vaccinated for ones in the experiments.

7 — Two kind of the vaccines were found harmless for sheep in safety tests. The both vaccines were used in 420 sheep as field experiment and there were no complications with them They gave also normal birth.

8 — A map was drawn first time to show where the infection of sheep serologically and bacteriologically in Turkey.

#### L İ T E R A T Ü R

- 1 — Berkenhagen, M. ve Letz, W., 1974 : Vibrio fetus type: 01 as a cause of epidemic abortion in sheep. Mh. Vet. Med. 29/7, 250 - 252.
- 2 — Clark, B. L.; Monsborough, M. J., 1974 : Serological types of Vib. fetus var. intestinales causing ovine vibriosis in southern Australia. Aust. vet. J. 50; No: 1, 16 - 18.
- 3 — Firehammer, B. D. ve arkadaşları 1956 : The role of the ram in vibriosis of sheep. Amer. J. vet. Res., 17, Nr. 65, 573 - 581.
- 4 — Gilmour, N.J.L. and Thompson, D.A., 1972 : Vaccination against vibrionic abortion in sheep with a cell disrupted adjuvant vaccine. Res. vet. Sci., 13, 601 - 602.
- 5 — Gilmour, N.J.L.; Thompson, D.A. and Fraser, J., 1975 : Vaccination against vibrio (Campylobacter) fetus infection in sheep in late pregnancy. Vet. Rec. 96/6, 129 - 131.
- 6 — İyigören, B. ve Ünlü, M., 1967 : Koyun Vibriosisi Üzerinde Araştırmalar. Etlik Vet. Bak. Enst. Dergisi, 3 (3-4), 11 - Cilt : 3, Sayı: 3-4, S. 11. Vet. Mikrobiyoloji Dergisi, Sayı: 1, Sayfa: 40.
- 7 — Jensen, R.; Miller, V. A., Hammarlund, M. A. and Graham, W. R., 1957 : I. Vibronic abortion in sheep Transmission and Immunity. Amer. J. Vet. Res.; 18, 326 - 329.

- 8 — **Lincoln, G.J.L. and Trout, K.J. 1967:** Evaluation of a new trivalent bovine vibriosis bacterin using fluorescent antibody technic. *Vet. Med. Small animal clin.*, 62, 561 - 564.
- 9 — **Lowrie, O.B. and Perarce, J. H., 1970:** The placental localisation of vibrio fetus. *J. Med. Microbiologie*, 3; 607 - 614.
- 10 — **Marković, B. Olujic, M., Popović, B. and Ilic, M., 1970:** Trial of a vaccine to prevent vibrio fetus abortion in ewes. *Vet. Glasn.*, 24, 981 - 983. *Vet. Fak. Belgrad/Yugoslavia.*
- 11 — **Meinershagen, W. A., Waldhahn, D. G., Frank, F. W. and Seivner, L. H., 1965:** Magpies as a reservoir of infection for ovine vibriosis. *J. Amer. vet. med. Ass.*, 147, 843 - 845.
- 12 — **Meinershagen, W. A., Frank, F. W., Hulet, E. V. and Price, D. A., 1969:** Immunity in ewes resulting from natural exposure to vibrio fetus *Amer. J. Vet. Res.*, 30, 203 - 206.
- 13 — **Meinershagen, W. A., Donald, B. S. Waldhahn, D. G. at all. 1971:** Efficacy of combined bacterins for experimental immunisation of sheep against ovine vibriosis and Hlmydial abortion of ewes. *Amer. J. vet. Res. Vol: 32, Nr, 1, 51 - 57.*
- 14 — **Miller, V. A. ve arkadaşları 1959:** Bakteriemia in pregnant sheep following oral administration of vibrio fetus. *Amer. J. vet. Res.*, 20, 677 - 683.
- 15 — **Miller, V. A. and Jensen, R. 1961:** Experimental Immunisation against ovine vibriosis. I. The use of live and formalin killed vibrio fetus vaccines. *Amer. J. vet. Res.*, 22, R. 43 - 46.
- 16 — **Miller, V. A. and Jensen, R. 1963:** Experimental Immunisation against ovine vibriosis. II. Formalin killed vibrio - fetus adjuvant vaccines. *Amer. J. vet. Res.*, 24, 65 - 68.
- 17 — **Miller, V. A., Jensen, R. and Ogg. J. E., 1964:** Immunisation of sheep against ovine vibriosis with bacterins containing serotype: 01 and serotype: 0V in mineral oil. *Amer. J. vet. Res.*, 25, 664 - 667.
- 18 — **Miller, V. A. 1968:** Abortion diseases of livestock ovine genital vibriosis. Charles C. Thomas Publisher Springfield Illinois, 128 - 138.
- 19 — **Mitscherlich, E. und Liess, B. 1958:** Der Serologische Nachweis der Vibrio fetus Infektion des Rindes und Schafes. *Mh. Tierheilk.*, Band: 10, S. 303-328.
- 20 — **Ogg. J. E., 1962:** Studies on the coccoide form of ovine vibrio - fetus. *Amer. vet. Res.*, 23, 354 - 358.
- 21 — **Storz, J., Miner, M.L., Olson, A. E., Mariott, M. E. and Elsner, Y. Y., 1966:** Prevention of ovine vibriosis by vaccination; effect of yearly vaccination of replacement ewes. *Amer. J. Vet. Res.*, 27, 115 - 120.