

Tavuk tifosuna karşı aşı geliştirilmesi üzerine çalışmalar*

Hasan SOLMAZ¹

Mehmet ATEŞ²

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı-VAN

²Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı-KONYA

ÖZET

Bu çalışmada, *Salmonella gallinarum*'un dış membranlarından semipurifiye elde edilen protein ekstraktı aşı, *Salmonella enteritidis*'ten hazırlanan bakterin aşı, her ikisinin kombine edilmesi ile elde edilen bivalan aşının immünojenik etkinlikleri ve epruvasyonlara karşı koruyuculukları karşılaştırıldı. Denemelerde Babcock B380 yumurtacı tip kahverengi civcivlerden 300 adet kullanıldı. Hayvanlar 60'ar adetlik 3 gruba ve 40 adetlik kontrol grubuna ayrılarak; 6, 10 ve 16. haftalarda aşı uygulamaları yapıldı ve 1 kez, 2 kez ve 3 kez aşılananlar diye sınıflandırma yapıldı. Deneme gruplarına 10, 14, 18 ve 22. haftalarda önceden patojenitesi belirlenmiş *S. gallinarum* suşu ile epruvasyon yapıldı. Çalışmanın sonuçlarına göre; protein ekstraktı, bakterin ve bivalan aşıları deneysel *S.gallinarum* enfeksiyonlarına karşı hayvanları belli oranda korumasına rağmen, koruma 2.5-3 ay düzeyindedir. Bu aşıların tavuk tifosu enfeksiyonunu önlemede en az 2 defa ve aşılamayı 3 ayda bir tekrarlamak suretiyle kullanılabilceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Tavuk tifosu, *Salmonella*, aşı

The studies on the development of vaccines against fowl typhoid

SUMMARY

The extract of semipurified proteins of outer membrane of *Salmonella gallinarum*, bacterin vaccine of *Salmonella enteritidis* and the combination of both vaccine given above have all been compared in terms of immunologic efficiency and epruvation at present study. In the experiments, a total number 300 of Babcock B380 chicks have been employed. The groups, each of 60 animals, were performed. The vaccines were applied to the chicks at 6, 10 and 16 weeks of experiment and the animals were classified as those either vaccinated once, or twice or three times on the weeks of 10, 14, 18 and 22. The animals in the control groups were challenge with strain of *S.gallinarum* of which the pathogenicity was already reported. The result from present study revealed that although the vaccine trials (protein extract, bacterin and bivalan) gave some protection to the animals against *S.gallinarum* infections, period for the protection was observed to be limited between 2.5-3 months. It may be concluded that the disease may be prevented by two subsequent applications of vaccine in 3 months interval.

Key Words: Fowl typhoid, *Salmonella*, Vaccine

GİRİŞ

Son yıllarda giderek bir sanayi sektörü haline dönüşmekte olan ülkemiz tavukçuluğunun bu gelişmesine paralel olarak; tavuk hastalıkları, yem, bakım, yönetim ve pazarlama gibi sorunlar da giderek artmaktadır. Bu sorunların en önemlilerinden bir tanesi de *Salmonella gallinarum* tarafından oluşturulan tavuk tifosu hastalığıdır (21, 28). Tavuk tifosu, başta tavuk ve hindi olmak üzere evcil kanatlıların septisemik bir hastalığıdır. Latin ve Güney Amerika, Ortadoğu, Afrika ve bazı Avrupa ülkeleri de dahil olmak üzere, tavukçuluk yapılan her ülkede görülmektedir. Hastalık; perakut, akut, subakut ve kronik seyredebilmektedir. Yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden hastalık, büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalıklı sürülerdeki mortalite oranı daha çok, *S. gallinarum*'un patojenitesine bağlıdır (4, 5, 10, 17, 18, 44, 45, 53). Hastalık ülkemizde de tavukçuluğun yoğun olduğu bölgelerde sıklıkla ortaya çıkmaktadır (14, 21, 28, 37, 42, 49). Kanatlılarda büyük oranda ölümlere ve önemli miktarlarda ekonomik kayıplara neden olan, hızla çevreye yayılan enfeksiyonu kontrol altına almada; sülfonamid, nitrofuran ve antibiyotikler kullanılmaktadır (7, 48). Fakat, bu yolla ancak ölüm olayları azaltılabilmekte ve portörlük ortadan kaldırılamamaktadır. Aynı zamanda koruyucu ve tedavi edici amaçla kullanılan kemoterapötik ve antibiyotiklere karşı *Salmonella*'lar direnç kazanarak, bu özelliği insan ve diğer hayvan orijinli suşlara da aktarabilmektedirler

(40, 49). Kanatlı Salmonellosis'ini kontrol amacı ile, uzun yıllardan beri bir çok aşı çalışması yapılmıştır. İlk önceleri *Salmonella gallinarum*'un çeşitli suşlarından bakterin (8, 24, 58) ve attenüe canlı aşı (3, 4, 11, 16, 20, 26, 29, 32) çalışmaları yapılmıştır. Bu aşıları hazırlamada çeşitli metotlar denenmiş ve değişik adjuvant ilaveleri ile araştırmalar devam etmiştir. Son yıllarda ise, bakterilerden ribozomal ve protein aşılar ile antijenik yapılarında benzerlik bulunan suşlardan, ortak antijenler kullanılarak aşı çalışmaları yapılmaktadır (9, 11, 17, 18, 19, 22, 24, 39, 46). Bu çalışmada, *S.gallinarum*'un dış membranlarından semipurifiye elde edilen protein ekstraktı aşı, *S.gallinarum* ile somatik antijenleri benzer olan *S.enteritidis*'ten hazırlanan bakterin aşı, her ikisinin karıştırılması ile elde edilen bivalan aşının immünojenik etkinliklerinin LAT, MAT, IHA ve ELISA testleri ile ölçülmesi, bu aşıların epruvasyonlara karşı koruyuculuklarının karşılaştırılması, yüksek düzeyde ve uzun süreli bağışıklık veren aşı/aşılar geliştirilmesi amaçlandı.

MATERYAL VE METOT

Deneme Hayvanları: Denemelerde kullanılmak üzere ticari bir firmadan 300 adet Babcock B380 kahverengi yumurtacı tip civciv temin edildi. Civcivlere 6 hafta süre ile normal bakım şartları (yem, su, ışık, ısı v.s.) ve yetiştiricilikte uygulanan rutin aşılama programı uygulandı.

* Aynı adlı doktora tezinin özetidir ve araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (97 VF 017).

Suşlar: Aşı ve epruvasyon suşu olarak kullanılmak üzere Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (SÜVFM) kültür koleksiyonundan, Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü (KVKAÉ)'nden, Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü (EVKAÉ)'nden, Azim Tavukçuluk Laboratuvarı'ndan temin edilen *Salmonella gallinarum* ve *Salmonella enteritidis* suşları kullanıldı.

Kimyasal Maddeler: Aşılar da kullanılan mineral yağlı adjuvant (Span80 7.42 kısım + Span20 2.16 kısım + Tween60 2.37 kısım + Marcol 84.05 kısım) Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Üretim Enstitüsü'nden temin edildi.

Lam Aglutinasyon Test Antijeni: Antijen olarak, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen Pullorum plate test antijeni kullanıldı.

ELISA Okuyucusu: Testin değerlendirilmesi amacı ile BIO-TEK (USA) marka EL-311 sx ELISA reader kullanıldı.

ELISA Test Kitleri ve Malzemeler: Testte kullanılan; antijen kaplı mikroplyetler, konjugat, pozitif ve negatif serumlar, substrat, stop solusyonu, sulandırma solusyonu, yıkama solusyonu IDEXX firmasından temin edildi.

Aşı Suşlarının Seçimi: *S.gallinarum* ve *S.enteritidis* suşları, hücre kültürü üretme şişelerinde hazırlanmış Tryptic Soy Agar (TSA)(Oxoid)'a ekilerek 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Üreyen kültürler Phosphate Buffer Solution (PBS, pH:7.2) ile kaldırılarak santrifüj tüplerinde toplandı. Toplanan bakteri süspansiyonu PBS (pH:7.2) ile 3 kez yıkandı ve (%37'lik formaldehit (Merck) %100'lük kabul edilerek hazırlanan %0.1 formalin ile inaktive edildi. İnaktive edilen bakteri süspansiyonunun yoğunluğu Mac Farland No:4'e göre ayarlandı ve tavşanlara 4'er gün ara ile sırası ile 0.5, 1, 1.5, 2 ve 4 ml dozlarında kulak venasından verildi. Son antijen verildikten 10 gün sonra tavşanlardan kan alınarak serumları çıkarıldı (6, 12) ve mikroaglutinasyon testi (56, 57) ile titreleri ölçüldü. Antikor titresi en yüksek bulunan *S.gallinarum* ve *S.enteritidis* suşları aşı suşu olarak seçildi.

Epruvasyon Suşunun Seçimi: Temin edilen *S.gallinarum* suşları erlenmayerde 50'şer ml hazırlanan Tryptic Soy Broth'a (TSB) (Oxoid) ekilerek 37°C'de 18-20 saat inkübe edildi. Daha sonra her suşun 1 ml besiyerindeki bakteri sayısı tespit edildi. Besiyerlerindeki taze kültürler 1×10^7 , 1×10^8 ve 1×10^9 bakteri/ml miktarında ayarlandı. Her bir suşun her dilusyonu için (kanında *S.gallinarum*'a karşı antikor bulunmayan, sağlıklı) 6 haftalık 5'er adet pilice 1 ml dozunda taze *S.gallinarum* sıvı kültürlerinden kas içi yolla enjekte edildi. İki haftalık gözlem sonucu bütün dilasyonlarında hayvanların %100'ünü öldüren suş epruvasyon suşu olarak seçildi.

Epruvasyon Dozunun Tespiti: Bu amaçla; 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 ve 1×10^9 bakteri/ml dilasyonlarındaki yeni üretilmiş (epruvasyon suşu olarak tespit edilmiş) *S.gallinarum* bakteri kültüründen, her dilusyon için 6 haftalık 7'şer adet aşısız, sağlıklı pilice kas içi enjekte edilerek epruvasyon yapıldı. İki haftalık gözlem sonucu 7 piliçten 5 tanesi (%71.4) ölen grubun bakteri dilusyonu denemelerde epruvasyon dozu olarak kullanıldı.

Aşı Antijenlerinin Hazırlanması

Salmonella gallinarum'un dış membran proteinlerinden semipurifiye protein ekstraktı aşı antijeninin hazırlanması: Bu antijen; Bouzoubaa ve ark (17), Bouzoubaa ve ark (18), Charles ve ark (19),

Hassan ve ark (31), Plant ve ark (43), Sharma ve ark (46), Weinberg ve ark (55)'nin metotları modifiye edilerek yapıldı.

Bakterin aşı antijeninin hazırlanması: Hücre kültürü üretme şişelerinde hazırlanan TSA(Oxoid)'ya aşı suşu olarak tespit edilen *S.enteritidis* (KVKAÉ SE2) ekilerek üretilen bakteriler PBS (pH:7.2) ile kaldırıldı ve bakteri konsantrasyonu 1×10^{11} bakteri/ml olacak şekilde ayarlandı. Bakteri süspansiyonu içerisine son konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde formalin ilave edilip inaktive edildi (17, 41, 51, 52).

Aşıların Kullanım Solusyonlarının Hazırlanması

Protein ekstraktı aşının hazırlanması: Ekstrakte edilen bakteri proteinleri 100 gram canlı ağırlık (CA) için 400 µgr olacak şekilde ayarlandı (17) ve 1 kısım protein ekstraktı aşı antijeni+1 kısım (eşit oranda su ile karıştırılmış) mineral yağlı adjuvanttan (Span80 7.42 kısım + Span20 2.16 kısım + Tween60 2.37 kısım+Marcol 84.05 kısım) alınarak çift enjektör sistemi ile homojenize edilerek (23) hazırlandı.

Bakterin aşının hazırlanması: Bir kısım (ml) bakterin aşı antijeni+1 kısım (ml) (eşit oranda su ile karıştırılmış) mineral yağlı adjuvanttan (Span80 7.42 kısım + Span20 2.16 kısım+Tween60 2.37 kısım + Marcol 84.05 kısım) alınarak çift enjektör sistemi ile homojenize edilerek (23) hazırlandı.

Bivalan aşının hazırlanması: Bivalan aşı; 1 kısım (ml) protein ekstraktı aşı antijeni + 1 kısım (ml) bakterin aşı antijeni+1 kısım (eşit oranda su ile karıştırılmış) mineral yağlı adjuvanttan (Span80 7.42 kısım + Span20 2.16 kısım + Tween60 2.37 kısım+Marcol 84.05 kısım) alınarak çift enjektör sistemi ile homojenize edilerek hazırlandı .

Deneme hayvanlarına aşıların uygulanması: Deneme hayvanları 6 haftalık (17, 26) iken 60'ar adetlik 3 ve 40 adetlik 1 tane olmak üzere toplam 4 gruba ayrıldı. Birinci gruptaki 60 piliç protein ekstraktı aşı ile, 2. gruptaki 60 piliç bakterin aşı ile, 3. gruptaki 60 piliç bivalan aşı ile aşılanacak şekilde ayrıldı. Dördüncü gruptaki 40 piliç ise kontrol grubu olarak ayrıldı. Aşılar deneme hayvanlarının boyun gerisine ve deri altı yolla 0.5 ml uygulandı. Deneme hayvanlarına 6. haftanın sonunda 1. aşılama yapıldı. Aşılamadan 3 hafta sonra 7 adet piliç *S.gallinarum*'un epruvasyon dozu (1×10^5 bakteri/ml) ile i.m. yolla epruve edildi. Birinci aşılamadan 4 hafta sonra, her gruptaki epruve edilmeyen hayvanlar kendi aralarında 1 kez aşılananlar ve 2 kez aşılananlar diye 2'şer gruba ayrıldılar ve 2. aşılama yapıldı. İkinci aşılamadan 3 hafta sonra her gruptan 7 adet piliç *S.gallinarum*'un epruvasyon dozu (1×10^5 bakteri/ml) ile i.m. yolla epruve edildi. Altı hafta sonra ise her gruptaki epruve edilmeyen hayvanlar kendi aralarında 1 kez aşılananlar, 2 kez aşılananlar ve 3 kez aşılananlar diye 3'er gruba ayrıldılar ve 3. aşılama yapıldı. Üçüncü aşılamadan 3 hafta sonra da her gruptan 7 adet piliç *S.gallinarum*'un epruvasyon dozu (1×10^5 bakteri/ml) ile i.m. yolla epruve edildi. Buna göre 1 kez aşılananlar 10, 14 ve 18. haftalarda 3 kez, 2 kez aşılananlar 14, 18 ve 22. haftalarda 3 kez, 3 kez aşılananlar ise 18 ve 22. haftalarda 2 kez epruve edilmiş oldu. Yapılan epruvasyonlar sonunda epruve edilen hayvanlar 15 gün süre ile gözlemlendi. Ölenler kaydedilerek otopsileri yapıldı. Canlıların ise, 15 günlük gözlem sonrası otopsileri yapılarak *S.gallinarum* yönünden bakteriyolojik ekimler yapılarak incelendi (18, 26, 33, 36).

Bakteriyolojik inceleme: Epruvasyon sonunda

ölen bütün hayvanların otopsi yapılarak iç organlarından, ölmeyen hayvanların kloakalarından steril sıvı örnekleri alınarak epruvayon suşu yönünden hayvanların portörlük durumları incelendi (2, 9, 11, 30, 51).

Serolojik Testler: Test materyali olarak aşılamalardan sonra 15 gün aralıklarla, her gruptaki deneme hayvanlarının 7'şer tanesinin kanat venasından kan alınarak hazırlanan kan serumları kullanıldı. Test materyalleri; Lam aglutinasyon testi (LAT) (54), Mikroaglutinasyon testi (MAT) (50, 56, 57), İndirekt hemaglutinasyon testi (IHA) (34, 45, 47) ve bakterin aşı grubu da ayrıca ELISA (1) ile antikor varlığı yönünden test edildi.

İstatistiksel Analiz: Bu çalışmanın verilerinin istatistiksel analizi, Minitab istatistik programında "two sample t" testi uygulanarak yapıldı (35)

BULGULAR

Aşıların piliçlerdeki immünojeniteleri : Protein ekstraktı aşı ile birinci aşılama sonrası bütün serumlar LAT ile pozitif. MAT ve IHA testlerinde en yüksek antikor titresi aşılama sonrası 23 gün sonra yapılan örneklemede görüldü (Tablo 1). İkinci ve üçüncü aşılamalardan 3'er hafta sonra yapılan örneklemede ise antikor titrelerinde yükselmeler belirlendi (Tablo 1). Bakterin aşı ile birinci aşılama öncesi alınan kan örnekleri LAT ile negatif, aşılama sonrası örneklemede ise pozitif. Aşılama sonrası 3 hafta sonra yapılan örneklemede MAT ve IHA testleri ile en yüksek seviyede antikor titreleri elde edildi. Daha sonraki örneklemede titrelerde düşüşler gözlemlendi. İkinci ve üçüncü kez aşılamalardan 3'er hafta sonra yapılan örneklemede, birinci aşılama oranla antikor titrelerinde fazla yükselme gözlenmedi. Hatta birinci aşılamanın ilk örneklemedeki değerlere yakın değerler bulundu. İki kez aşıların 3. ve 4. örneklemedeki IHA titreleri, aynı grubun 2. örneklemedeki IHA titresinden büyüktü. İkinci örnekleme ile 3. örneklemenin IHA titreleri arasındaki fark önemli ($P > 0.05$), 3. ile 4. örneklemenin IHA titresindeki fark önemsiz bulundu ($P < 0.05$) (Tablo 3). ELISA testi ile yapılan incelemelerde, kontrol grubu haricindeki

bütün serumlar pozitif bulunmasına rağmen serumların antikor titre düzeyleri heterojendi (%CV 61.5-66.3).

Bivalan aşı ile birinci aşılama sonrası 3 hafta sonra alınan kan örneğinde titre MAT ile 5.14, IHA ile 6.71 idi. İkinci aşılama öncesi ortalama titreler MAT ile 4.42, IHA ile 4.85 iken, ikinci aşılama sonrası 22 gün sonra alınan kan örneklerinde titrelerin MAT ile 5.14, IHA ile 6.85'e yükseldiği görüldü. Üçüncü aşılama öncesi MAT ve IHA ile 4.28 ve 4.42 olan titrelerin, aşılama sonrası 21 gün sonra alınan kan örneğinde 5.42 ve 5.57'ye yükseldiği gözlemlendi. Daha sonraki örneklemede ise titrelerde düşüşler görüldü (Tablo 5).

Aşılı grupların epruvasyon sonuçları: Protein ekstraktı aşı ile birinci aşılama sonrası yapılan 3 epruvasyon sonunda sırasıyla; %71.4, %57.2 ve %14.2 oranlarında, iki kez aşılama sonrası sırasıyla; %85.8, %71.4 ve %28.6 oranlarında, üç kez aşılama sonrası yapılan 2 epruvasyon sonunda sırasıyla %100 ve %71.4 oranında epruvasyona karşı koruma tespit edildi (Tablo 2). Ölen hayvanların hepsinden *S.gallinarum* izole edildi. Ölmeyenlerde tavuk tifosunun klinik semptomları ve makroskopik bulgular tam olarak görülemediğine rağmen, bakteriyolojik incelemede *S.gallinarum* izole edildi. Yani aşı ile korunan hayvanların portör kaldığı görüldü. Bakterin aşı ile bir kez aşılama sonrası yapılan 3 epruvasyon sonunda sırasıyla; %71.4, %42.9 ve %28.6 oranlarında, iki kez aşılama sonrası yapılan 3 epruvasyon sonunda sırasıyla; %71.4, %71.4 ve %14.2 oranlarında, üç kez aşılama sonrası yapılan 2 epruvasyon sonunda sırasıyla; %85.8 ve %71.4 oranlarında koruma tespit edildi (Tablo 4). Ölen hayvanların hepsinden *S.gallinarum* izole edildi. Bivalan aşı ile bir kez aşılama sonrası yapılan üç epruvasyon sonunda sırasıyla; %85.8, %71.4 ve %28.6 oranlarında, iki kez aşılama sonrası sırasıyla %85.8, %71.4 ve %42.9 oranlarında, üç kez aşılama sonrası ise %100 ve %71.4 oranlarında koruma sağlandı (Tablo 6).

Kontrol gruplarında epruvasyon sonuçları: Yapılan epruvasyonlarda kontrol gruplarındaki 7 hayvandan; 1. epruvasyonda (10. hafta) 6, 2. epruvasyonda (14. hafta) 5, 3. epruvasyonda (18. hafta) 6 ve 4. epruvasyonda (22. hafta) ise 6 hayvan öldü (Tablo 7).

Tablo 1. Protein ekstraktı aşı ile aşılama sonrası grupların antikor titrelerinin geometrik ortalamaları (Her aşılama döneminde 7 hayvandan kan alındı.)

Dönem (Gün)	Bir kez aşı			İki kez aşı			Üç kez aşı		
	LAT*	MAT**	IHA**	LAT*	MAT**	IHA**	LAT*	MAT**	IHA**
1	0	0	0						
46		1. AŞILAMA							
69	+	4.57±1.27	5.28±1.38						
74		2. AŞILAMA							
82	+	3.71±1.49	4.28±1.70						
96	+	3.57±1.61	3.85±1.77	+	6.00±1.82	7.57±1.39			
103		3. AŞILAMA							
110	+	3.00±0.81	4.14±1.21	+	4.28±1.11	5.28±1.38			
124	+	2.00±0.57	2.85±0.90	+	3.71±0.95	4.42±1.13	+	6.00±0.81	5.71±0.75
140	+	2.00±0.57	2.85±0.90	+	3.14±0.89	3.85±1.21	+	4.85±0.69	6.00±0.81
152	+	1.87±0.89	2.71±0.95	+	2.42±0.97	3.00±0.81	+	3.57±0.97	4.57±0.97

*LAT: Lam Aglutinasyon Testi

**Titreler normal sayılara çevrilerek (Mikro Aglutinasyon Testi (MAT) için; 1/12.5=1, 1/25=2, 1/50=3..., 1/1600=8, İndirekt Hemaglutinasyon Testi (IHA) için; 1/8=1, 1/16=2, 1/32=3...1/2048=9 gibi) hesaplandı.

Tablo 2. Protein ekstraktı aşı ile aşılanan grupların epruvasyon sonuçları

	Bir kez aşı			İki kez aşı			Üç kez aşı			
	Dönem (Hafta)	Ölen/Aşılanan	Koruma (%)	Ölü (%)	Ölen/Aşılanan	Koruma (%)	Ölüm (%)	Ölen/Aşılanan	Koruma (%)	Ölüm (%)
1. Epruvasyon	10	2 / 7	71.4	28.6						
2. Epruvasyon	14	3 / 7	57.2	42.8	1 / 7	85.8	14.2			
3. Epruvasyon	18	6 / 7	14.2	85.8	2 / 7	71.4	28.6	0 / 7	100	0
4. Epruvasyon	22	YAPILMADI			5 / 7	28.6	71.4	2 / 7	71.4	28.6

Tablo 3. Bakterin aşı ile aşılanan grupların antikor titrelerinin geometrik ortalamaları (Her aşılama döneminde 7 hayvandan kan alındı.)

Dönem (Gün)	Bir kez aşı			İki kez aşı			Üç kez aşı		
	LAT	MAT*	IHA*	LAT	MAT*	IHA*	LAT	MAT*	IHA*
1	0	0	0						
46		1. AŞILAMA							
69	+	4.42±0.97	5.57±1.27						
74		2. AŞILAMA							
82	+	3.57±1.81	4.42±1.61						
96	+	3.42±0.81	4.28±1.60	+	4.42±1.27	4.42±1.81			
103		3. AŞILAMA							
110	+	3.42±1.31	4.28±1.38	+	3.57±0.97	3.71±0.75			
124	+	2.14±0.69	3.14±1.34	+	3.57±0.53	4.57±0.53	+	5.00±0.81	5.00±1.15
140	+	1.71±0.75	2.85±1.21	+	3.14±0.69	3.85±0.90	+	3.85±0.69	5.00±0.81
152	+	1.71±1.11	2.71±0.95	+	2.28±0.95	3.14±1.12	+	3.00±1.41	4.28±1.25

*LAT: Lam Aglutinasyon Testi

**Titreler normal sayılara çevrilerek (Mikro Aglutinasyon Testi (MAT) için; 1/12.5=1, 1/25=2, 1/50=3...., 1/1600=8, İndirekt Hemaglutinasyon Testi (IHA) için; 1/8=1, 1/16=2, 1/32=3...1/2048=9 gibi) hesaplandı.

Tablo 4. Bakterin aşı ile aşılanan grupların epruvasyon sonuçları

	Bir kez aşı			İki kez aşı			Üç kez aşı			
	Dönem (Hafta)	Ölen/Aşılanan	Koruma (%)	Ölü (%)	Ölen/Aşılanan	Koruma (%)	Ölüm (%)	Ölen/Aşılanan	Koruma (%)	Ölüm (%)
1. Epruvasyon	10	2 / 7	71.4	28.6						
2. Epruvasyon	14	4 / 7	42.9	57.2	2 / 7	71.4	28.6			
3. Epruvasyon	18	5 / 7	28.6	71.4	2 / 7	71.4	28.6	1 / 7	85.8	14.2
4. Epruvasyon	22	YAPILMADI			6 / 7	14.2	85.8	2 / 7	71.4	28.6

Tablo 5. Bivalan aşı ile aşılanan grupların antikor titrelerinin geometrik ortalamaları (Her aşılama döneminde 7 hayvandan kan alındı.)

Dönem (Gün)	Bir kez aşı			İki kez aşı			Üç kez aşı		
	LAT	MAT*	IHA*	LAT	MAT*	IHA*	LAT	MAT*	IHA*
1	0	0	0						
46		1. AŞILAMA							
69	+	5.14 ± 0.89	6.71 ± 1.11						
74		2. AŞILAMA							
82	+	4.42 ± 2.63	4.85 ± 2.41						
96	+	4.14 ± 1.57	4.57 ± 1.71	+	5.14 ± 1.46	6.85 ± 1.46			
103		3. AŞILAMA							
110	+	3.14 ± 1.46	3.57 ± 1.51	+	4.28 ± 1.11	4.42 ± 0.97			
124	+	2.42 ± 0.97	3.71 ± 0.48	+	3.85 ± 0.89	4.28 ± 0.75	+	5.42 ± 0.78	5.57 ± 0.53
140	+	2.14 ± 1.06	3.28 ± 1.11	+	3.71 ± 0.75	4.42 ± 0.97	+	4.57 ± 0.97	5.14 ± 0.69
152	+	1.85 ± 0.69	2.71 ± 0.75	+	2.71 ± 0.75	2.71 ± 1.11	+	3.14 ± 0.69	4.28 ± 0.75

*LAT: Lam Aglutinasyon Testi

**Titreler normal sayılara çevrilerek (Mikro Aglutinasyon Testi (MAT) için; 1/12.5=1, 1/25=2, 1/50=3...., 1/1600=8, İndirekt Hemaglutinasyon Testi (IHA) için; 1/8=1, 1/16=2, 1/32=3...1/2048=9 gibi) hesaplandı.

Tablo 6. Bivalan aşı ile aşılanan grupların epruvasyon sonuçları

	Bir kez aşı			İki kez aşı			Üç kez aşı			
	Dönem (Hafta)	Ölen/Aşılana	Koruma (%)	Ölü (%)	Ölen/Aşılana	Koruma (%)	Ölüm (%)	Ölen/Aşılana	Koruma (%)	Ölüm (%)
1. Epruvasyon	10	1/7	85.8	14.2						
2. Epruvasyon	14	2/7	71.4	28.6	1/7	85.8	14.2			
3. Epruvasyon	18	5/7	28.6	71.4	2/7	71.4	28.6	0/7	100	0
4. Epruvasyon	22	YAPILMADI			4/7	42.9	57.2	2/7	71.4	28.6

Tablo 7. Kontrol gruplarında epruvasyon sonuçları

	Dönem(Hafta)	Ölen/Aşılana	Koruma(%)	Ölü(%)
1.Epruvasyon	10	6/7	14.2	85.8
2.Epruvasyon	14	5/7	28.6	71.4
3.Epruvasyon	18	6/7	14.2	85.8
4.Epruvasyon	22	6/7	14.2	85.8

TARTIŞMA VE SONUÇ

Tavuk tifosunun kontrol ve eradike edilmesi için uzun yıllardan beri aşı çalışmaları yapılmaktadır. İlk önceleri *S.gallinarum*' un S ve R suşlarından canlı (4, 11, 30, 36) ve çeşitli metotlarla inaktive edilmiş bakterin (8, 58) aşı çalışmaları yapılmıştır. Son yıllarda ise tavuk tifosuna karşı aşılama, *S.gallinarum* ile somatik antijenik yapılarındaki benzerlikten dolayı (15, 38) *S.enteritidis*' ten hazırlanan bakterin aşı çalışmaları yapılmaktadır (11, 24, 41, 51, 52). Tavuk tifosuna karşı hazırlanan canlı ve bakterin aşılarda yanında, Salmonella suşlarının dış membran proteinleri ekstrakte edilerek aşı çalışmaları yapılmıştır (17, 18, 19, 46, 55).

Bouzoubaa ve ark (17), *S.gallinarum*' dan ekstrakte ettikleri dış membran proteinlerinden aşı olarak 400 µgr/100gr canlı ağırlık dozunda verdikleri (adjuvantlı ve adjuvantsız) piliçlerde aşılama sonrası oral olarak yapılan epruvasyona karşı koruma oranının %100 olduğunu bildirmektedirler. Başka bir çalışmada ise Bouzoubaa ve ark (18), 200 µgr/100gr canlı ağırlık dozunda verdikleri protein ekstraktı aşığı iki defa uyguladıklarını ve aşının, canlı *S.gallinarum* kültürü ile intraperitoneal yolla yapılan epruvasyonlara karşı korumasının, *S.gallinarum* 9R suşundan hazırlanan canlı aşıdan daha iyi (%95) olduğunu rapor etmektedirler. Araştırmacılar (18) ayrıca, epruvasyon sonucu ölmeyen hayvanlardan epruvasyon suşu izolasyonunun (%10-50) gerçekleştiğini ve intraperitoneal epruvasyon sonucu etkenin organlarda yayılmasının oral epruvasyonlardan daha fazla olduğunu bildirmektedirler.

Bu çalışmada ise, protein ekstraktı aşı ile 1. aşılama sonrası yapılan 3 epruvasyonda sırasıyla; %71.4, %57.2 ve %14.2 oranında, iki kez aşılama sonrası yapılan epruvasyonlarda sırasıyla; %85.8, %71.4 ve %28.6 oranında ve üç kez aşılama sonrası yapılan 2 epruvasyon sonucu sırasıyla; %100 ve %71.5 oranlarında koruma tespit edildi (Tablo 2). Ölen hayvanların hepsinden *S.gallinarum* izole edildi. Bu çalışmada, protein ekstraktı aşı ile 1 kez aşı grubunda 1. epruvasyon, 2 kez aşı grubunda 1. ve 2. epruvasyon sonuçları, Bouzoubaa ve ark (17, 18)'nin elde ettiği koruma oranından düşük bulundu. Elde edilen koruma oranlarının düşük olması, aşı antijenlerinin

elde edilmişlerindeki farklılıktan ve bu çalışmada kullanılan epruvasyon suşunun patojenitesinin yüksek olmasından kaynaklanabilir. Çünkü bu çalışmada aşı antijeni semipurifiye, diğer araştırmalarda ise purifiye olarak hazırlanmıştır. Buna rağmen, 3 kez aşı grubunun epruvasyon sonuçlarının Bouzoubaa ve ark (17, 18)'nin sonuçları ile uyum halinde olduğu görüldü. Epruve edildikleri halde ölmeyen hayvanlarda tavuk tifosunun klinik semptomları ve makroskopik bulgular tam olarak görülmemesine rağmen, bakteriyolojik incelemede *S.gallinarum* izole edildi. Yani epruvasyon sonrası canlı kalan hayvanlarda da portörlük tespit edildi. Ayrıca Bouzoubaa ve ark (18)'nin araştırmasında protein ekstraktı aşının %95 korumasına karşın, ölmeyen hayvanlarda epruvasyon suşunun izole edilmesi (%10-50), bu çalışmadaki epruvasyon sonrası ölmeyen hayvanların portör kaldığı sonucunu desteklemektedir.

Timms ve ark (51), *S.enteritidis* PT4 suşundan formülle inaktive ederek hazırladıkları bakterin aşığı bir kez (3. hafta) ve iki kez (3. ve 6. hafta) uyguladıklarını ve bir kez aşı grubu 5., iki kez aşı grubu 8. haftada epruve ettiklerini bildirmektedirler. Araştırmacılar, yaptıkları i.m. ve i.v. epruvasyonlar sonucu bir kez aşılama sonrası %50, iki kez aşılama sonrası ise %62 oranında koruma tespit ettiklerini rapor etmektedirler. Gast ve ark (24), iki farklı *S.enteritidis* suşundan; birisi asetonla inaktive edilmiş yağlı adjuvantlı, diğeri ticari bakterin aşığı (Layermune SE) deri altı yolla uyguladıklarını, aşılama sonrası her iki gruptaki ve kontrol grubundaki hayvanların oral yolla epruvasyonu sonucu, kontrol grubuna göre her iki aşı grubundaki hayvanlarda da etkenin barsaklara kolonizasyon insidensinde ve epruvasyon sonrası 1. haftada dışkı ile yayılmada bir azalma olduğunu ifade etmektedirler. Timms ve ark (52) diğeri bir çalışmada, *S.enteritidis* PT4 suşundan formol ile inaktive bakterin aşığı, 1 günlük ve 4 haftalık piliçlere uyguladıklarını ve 1. aşı uygulamasından 20 gün sonra 2. uygulamayı yaptıklarını bildirmektedirler. Araştırmacılar (52), virulent *S.enteritidis* PT4 suşu ile 2. aşılama sonrası 8, 12 ve 16 hafta sonra yapılan i.v. epruvasyonlar sonucu 1 günlüklerde sırasıyla; %55.6, %27.0 ve %33.3, 4 haftalıklerde da 2. aşılama sonrası 8, 12 ve 16 hafta sonra yapılan i.v. epruvasyonlar sonrası sırasıyla; %80.0, %80.0 ve %49.9 oranlarında koruma tespit ettiklerini

bildirmektedirler. Nakamura ark (41) ise, *S.enteritidis*'ten hazırladıkları formalin ile inaktive bakterin aşırı uyguladıkları hayvanlara 1×10^6 ile 1×10^8 bakteri/ml miktarında oral yolla yapılan epruvasyonlardan sonra 2-15 ve 6-21. günlerde aşılınmayan kontrol hayvanlardan ve aşılarının çoğunluğundan alınan fekal örneklerden, 1 haftalık aşılarının önemli bir kısmının karaciğer ve dalaklarından *S.enteritidis* izole ettiklerini bildirmektedirler.

Bu çalışmada, bakterin aşı ile 1 kez aşılana grupta aşılama sonrası yapılan 3 epruvasyonda sırasıyla; %71.5, %42.9 ve %28.6 oranlarında koruma tespit edildi. Birinci epruvasyon sonucu makul denebilecek olan koruma, diğer 2 epruvasyonda çok düşük gerçekleşti. Bu sonuçlar Gast ve ark (24)'nın sonuçları ile uyum halindedir. İki kez aşılana grupta aşılama sonrası yapılan 3 epruvasyonda sırasıyla; %71.4, %71.4 ve %14.2 oranında gerçekleşti (Tablo 4). Bu sonuçların; Timms ve ark (51), Gast ve ark (24), Timms ve ark (52)'nin sonuçları ile uyum halinde olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar 2 kez aşılamanın da kısa süreli (2.5-3 ay) bir koruma sağlaması olarak açıklanabilir. Üç kez aşılana grupta aşılama sonrası yapılan 2 epruvasyonda sırasıyla %85.8 ve %71.4 oranlarında koruma tespit edildi (Tablo 4). Kontrol grubunda ise 7 hayvandan 6'sı öldü. Bu gruptaki epruvasyonlar sonucu tespit edilen koruyuculuk diğer iki gruba göre yüksek gerçekleşti. Fakat bütün araştırmacılar (18, 24, 51, 52) iki kez aşılama önermektedirler. Bunun yanında, aşıların epruvasyonlara karşı koruyuculuklarının farklı olması, çalışmalarda kullanılan deney hayvanları sayısının az olması ile epruvasyon suşlarının ve bunların patojenitelerinin farklı olmasından kaynaklanabilir. Çünkü deney hayvanı sayısının az olmasından dolayı, bir hayvanın bile epruvasyona karşı korunması veya korunmaması yüzdeyi büyük oranda etkilemektedir. Ayrıca, farklı suşların patojenitelerinin derecesi de farklı olabilmektedir. Bir çok araştırmada (11, 24, 25, 26, 29, 30, 41) olduğu gibi, epruvasyonlar sonrası ölmeyen hayvanlardan alınan fekal örneklerden ve otopsileri sonucu iç organlarından epruvasyon suşu izole edildi ve ölmeyen hayvanların portör kaldığı gözlemlendi.

Bivalan aşı ile 1 kez aşılana grupta aşılama sonrası yapılan 3 epruvasyonda sırasıyla; %85.8, %71.4 ve %28.6 oranlarında koruma sağlandı. İki kez aşılana grupta aşılama sonrası yapılan 3 epruvasyonda sırasıyla; %85.8, %71.4 ve %42.8 oranlarında koruma sağlandı. Üç kez aşılana grupta aşılama sonrası yapılan 1. epruvasyonda %100 ve 2. epruvasyonda ise %71.4 oranında koruma sağlanırken, ölen hayvanların hepsinden *S.gallinarum* izole edildi (Tablo 6).

Bu çalışmada, bir kez aşıları gruplarda 10, 14 ve 22. haftalarda yapılan epruvasyonlar sonucu; protein ekstraktı aşıları grupta sırasıyla %71.4, %57.2 ve %14.2, bakterin aşıları grupta %71.4, %42.9 ve %28.6, bivalan aşıları grupta %85.8, %71.4 ve %28.6 oranlarında koruma sağlandı. Bu gruplarda protein ekstraktı ve bakterin aşıları 1. epruvasyonda aynı düzeyde koruma sağladı, 2 ve 3. epruvasyonlarda ise ikisinde de koruma olmadı. Bivalan aşıları ise 1. ve 2. epruvasyonlarda koruma sağlamasına rağmen, 3. epruvasyonda yeterli koruma olmadı. İki kez aşıları gruplarda 14, 18 ve 22. haftalarda yapılan epruvasyonlar sonucu; protein ekstraktı aşıları grupta sırasıyla %85.8, %71.4 ve %28.6, bakterin aşıları grupta %71.4, %71.4 ve %14.2, bivalan aşıları grupta %85.8, %71.4 ve %42.9 oranlarında koruma tespit edildi. Bu gruplarda protein

ekstraktı, bakterin ve bivalan aşıları 1. ve 2. epruvasyonlarda koruma sağlamasına rağmen, 3. epruvasyon da üçünde de koruma olmadı. Fakat en yüksek koruma oranı protein ekstraktı ve bivalan aşıda görüldü. Üç kez aşıları gruplarda 18 ve 22. haftalarda yapılan epruvasyonlar sonucu ise; protein ekstraktı aşıları grupta sırasıyla %100 ve %71.4, bakterin aşıları grupta %85.8 ve %71.4, bivalan aşıları grupta %100 ve %71.4 oranlarında koruma sağlandı. Bu gruplarda protein ekstraktı, bakterin ve bivalan aşılarında yapılan iki epruvasyonda da korumadı. Üç kez aşıları gruplarda en yüksek koruma oranı protein ekstraktı ve bivalan aşı gruplarında tespit edildi.

Sonuç olarak; protein ekstraktı, bakterin ve bivalan aşıları, deneysel *S.gallinarum* enfeksiyonlarına karşı hayvanları belli oranda korumasına rağmen, koruma 2.5-3 ay düzeyindedir. Fakat saha şartlarında hayvanlar, bu çalışmada kullanılan epruvasyon dozundaki bakteri miktarı ile yoğun bir şekilde karşılaşmayacakları gözönüne alınırsa, koruma süresi 4-5 aya kadar uzayabilir. Ayrıca aşılama sonrası alınan kan örneklerinde, serum antikor titrelerinin standart sapmalarının büyük olması, örneklemelerde alınan serumların antikor titrelerinin heterojen olduğunu gösterdiği ve epruvasyonlara karşı koruma/korumamayı belirlemediği kanaatine varılmıştır (Tablo 1, 3 ve 5). Bu aşıların tavuk tifosu enfeksiyonunu önlemede en az 2 defa ve aşılama 3 ayda bir tekrarlamak suretiyle kullanılabilirliği, bunun yanında tavuk tifosuna karşı aşı geliştirilmesi çalışmalarında deneme hayvanları sayısının mümkün olduğunca artırılması ve aşı hazırlama metodlarının çeşitlendirilerek çalışmalara devam edilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Anonim (1996): Salmonella enteritidis Antibody Test Kit, Idexx Laboratories, Inc Westbrook, Maine 04092, USA
2. Arda M, Akyol İ ve Kahraman M (1969): Salmonella gallinarum'a karşı aşılama (9R ile) tavukların deneysel enfeksiyonu üzerinde araştırmalar, Ankara Üniv Vet Fak Derg, 16, 191-199.
3. Arda M (1971): Tavuk tifosuna karşı kanatlıları aşılama Salmonella gallinarum apatojen 9R suşunun içme suyu vasıtasıyla kullanılması üzerinde bir araştırma, Ankara Üniv Vet Fak Derg, 18(2), 229-237.
4. Arda M, Akay Ö, Aydın N ve İzgür M (1983): Tavuk tifosuna karşı etkin bir aşı hazırlanması üzerinde araştırmalar, Ankara Üniv Vet Fak Derg, 30(3), 420-429.
5. Arora A K, Gupta S C and Kaushik R K (1988): Isolation of Salmonella gallinarum from turkeys, Indian Vet J, 65(2), 171.
6. Ateşoğlu A (1996): Escherichia coli K99 pilus antijeni ile immünize edilen tavukların kan serumları ve yumurta sarılarında serolojik çalışmalar, Uzmanlık tezi, İstanbul.
7. Aydın N (1984): Bölge tavukçuluğunu etkileyen hastalık sorunları ve alınması gerekli hijyenik önlemler, S Ü Vet Fak Derg, Özel Sayı, 77-90.
8. Babila A ve Akçadağ B (1986): Tavuk tifosu aşı denemeleri üzerinde çalışmalar, Pendik Vet Mikrobiyol Derg, 18(1-2), 28-36.
9. Barrow P A (1990): Immunity to experimental fowl typhoid in chickens induced by a virulence plasmid cured derivative of Salmonella gallinarum, Infect Immun, 58(7), 2283-2288.

10. Barrow P A, Lovell M and Berchieri A (1990) Immunization of laying hens against Salmonella enteritidis with live attenuated vaccines, Vet Rec, 126, 241-242.

11. Barrow P A, Lovell M and Berchieri A (1991): The use of two live attenuated vaccines to immunize egg-laying hens against Salmonella enteritidis phage type 4, Avian Pathology, 20, 681-682.

12. Bekar M ve Doğrul F (1988): Salmonella'ların B, C (C1, C2) ve D grubu bakterilerine özgü "O " faktör hiperimmün serumlarının elde edilmesi ve bu serumlar yardımı ile ülkemiz hayvanlarında serogrup insidansının tespiti üzerinde çalışma, Etlik Vet Mikrob Derg, 6(3), 79-86.

13. Bekar M ve Doğrul F (1988): Salmonella'ların B, C (C1, C2) ve D grubu bakterilerine özgü "O " faktör hiperimmün serumlarının elde edilmesi ve bu serumlar yardımı ile ülkemiz hayvanlarında serogrup insidansının tespiti üzerinde çalışma, Etlik Vet Mikrob Derg, 6(3), 79-86.

14. Bekar M, Ayaz Y, Akman A, Yazıcıoğlu N, Uysal Y, Tekin C ve ark (1993): Tavukmezbahalarının Salmonella yönünden taranması, Etlik Vet Mikrob Derg, 7(4), 1-23.

15. Bilgehan H (1994) :Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış Yay, Fakülteler Kitabevi, 24-25.

16. Botes H J W (1965): Live vaccines in the control of salmonellosis, J S Afr Vet Med Ass, 36(4), 461-474.

17. Bouzoubaa K, Nagaraja K V, Newman J A and Pomeroy B S (1987): Use of membrane proteins from Salmonella gallinarum for prevention of fowl typhoid infection in chickens, Avian Dis, 31, 699-704.

18. Bouzoubaa K, Nagaraja K V, Kabbaj F Z, Newman J A and Pomeroy B S (1989): Feasibility of using proteins from Salmonella gallinarum vs. 9R live vaccine for the prevention of fowl typhoid in chickens, Avian Dis 33, 385-391.

19. Charles S D, Nagaraja K V, and Sivanandan V (1993): A lipid conjugated immunostimulating complex subunit vaccine against salmonella infection in turkeys, Avian Dis, 37, 477-484.

20. Cooper GJ (1994): Salmonellosis infection in man and the chicken: pathogenesis and the development of live vaccine: a review, Veterinary Bulletin, 64(2), 123-143.

21. Çarlı K T (1990): Bursa bölgesindeki yumurta ve broyler tipi tavuklardan izole edilen salmonella türleri üzerinde bakteriyolojik ve serolojik çalışmalar, II. Uluslararası Tavukçuluk ve Tavuk Hastalıkları Sempozyumu, 20-21 Eylül, Manisa.

22. Eisenstein T K (1975): Evidence for O antigens as the antigenic determinants in ribosomal vaccines prepared from Salmonella, Infect Immun, 12 (2), 364-377.

23. Erganiş O, Hadimli H H ve Solmaz H (1997): Tavukların kolibasilozu için Escherichia coli O1, O2 ve O78 serotiplerinden aşı geliştirilmesi, TÜBİTAK projesi (VHAG-1126) kesin raporu.

24. Gast R K, Stone H D and Holt P S (1993): Evaluation of the efficacy of oil emulsion bacterins for reducing fecal shedding of Salmonella enteritidis by laying hens, Avian Dis, 37, 1085-1091.

25. Gordon W A M and Luke D (1959): A note on the use of the 9R fowl typhoid vaccine in poultry breeding flocks, Vet Rec, 71(44), 926-927.

26. Gordon R F, Garside J S and Tucker J F (1959):

The use of living attenuated vaccines in the control fowl typhoid, Vet Rec. 71 (15): 300-304.

27. Gökçen S ve Erganiş O (1996): İzmir mezbahalarında kesilen hayvanlardan salmonella izolasyonun ve serotiplendirilmesi, Bornova Vet Kontr ve Araşt Enst Md Derg, 21 (35), 91-111.

28. Gülyaz V ve Taştan R (1996): Erzurum ve Erzincan illerinde kanatlı hayvan mezbahalarının salmonella yönünden taranması, Pendik Vet Mikrobiyol Derg, 27(1), 33-41.

29. Harbourne J F (1957): The control of fowl typhoid in the field by the use of live vaccines, Vet Rec, November 30th, 1102-1107.

30. Harbourne J F, Williams B M, Parker W H and Fincham I H (1963): The prevention of fowl typhoid in the field using a freeze-dried 9R vaccine, Vet Rec, 75 (34), 858-860.

31. Hassan J O, Porter S B and Curtiss III R (1993): Effect of infective dose on humoral immune responses and colonization in chickens experimentally infected with Salmonella typhimurium, Avian Dis, 37, 19-26.

32. Hormaeche C E, Mastroeni P, Harrison J A, Hormaeche R D, Svenson S and Stocker B A D (1996): Protection against oral challenge three months after i.v immunization of BAL/c mice with live oral Aro Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis vaccines is serotype (species)-dependent and only partially determined by the main LPS O antigen. Vaccine, 14 (4), 251-259.

33. Iliadis V N (1987): Ein beitrage zur epidemiologie der salmonellosen bei hühnern und truthühnern nach natürlicher und experimenteller infektion, Wien tierarztl Mschr, 74, 416-422.

34. İstanbulluoğlu E ve Arda M (1979): İndirekt hemaglutinasyon testinin kanatlıların Salmonella gallinarum enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılması, plate test ve serum aglutinasyon testi ile karşılaştırılması üzerinde incelemeler, Ankara Üniv Vet Fak Derg, 26, 98-110.

35. Jarvis M C (1993): Minitab for windows, release 9.2, Minitab Inc, 3081 Enterprise Drive State Colloge, PA 16801 USA.

36. Kahraman M ve Özcan C (1985): Tavuk tifosuna karşı 9R suşu ile hazırlanmış dört çeşit aşının immunojenik değerleri üzerinde bir çalışma, Ankara Üniv Vet Fak Derg, 32 (2), 330-341

37. Kalender H (1997): Elazığ bölgesindeki tavuklardan izole edilen salmonella türleri üzerinde bakteriyolojik ve serolojik çalışmalar, Doktora tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

38. Le Minor L (1984): Salmonella, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1, Williams & Wilkins, Baltimore.

39. Misfeldt M L and Johnson W (1978): Identification of protective cell surface proteins in ribosomal fractions from Salmonella typhimurium, Infect Immun, 24(3), 808-816.

40. Nagaraja K V, Pomeroy B S and Williams J E (1991): Paratyphoid infections, Diseases of Poultry, 99-130.

41. Nakamura M, Nagamine N, Takahashi T, Suzuki S and Sato S (1994): Evaluation of the efficacy of a bacterin against Salmonella enteritidis infection and the effect of stress after vaccination, Avian Dis, 38, 717-724.

42. Orhan G ve Güler L (1993): Tavuk iç organları,

fekal flora, yumurta ve yemde Salmonella türlerinin bakteriyolojik ve serolojik tespiti, Veterinarium, 4(2), 15-20.

43. **Plant J, Glynn A A and Wilson B M (1978):** Protective effects of a supernatant factor from Salmonella typhimurium on Salmonella typhimurium infection of inbred mice, Infect Immun, 22(1), 125-131.

44. **Samberg Y (1984):** The control of poultry diseases in Israel, Refuah Veterinarith, 41(3), 91-103.

45. **Sapre V A and Mehta M L (1967):** Indirect hemagglutination test for diagnosis of Salmonellosis in poultry, Ind Vet J, 44, 647-652.

46. **Sharma P, Sharma B K, Sharma S, Rawal I J, Saxena S N, Panigrahi D and Shivaprasad H L (1997):** Pullorum Disease and Fowl Typhoid, "Diseases of Poultry" Ed. By B W Calnek, Ninth Edition, 72-86, Iowa State University Press, Ames, Iowa.

47. **Smith P J, Larkin M and Brooksbank N H (1972):** Bacteriological and serological diagnosis of Salmonella of fowls, Res Vet sci, 13, 460-467.

48. **Tauxe R V (1991):** Salmonella: A postmodern pathogens, J Food Protection, 54(7), 563-568.

49. **Tavukçuoğlu F (1993):** Bursa bölgesinde tavuklardan Salmonella gallinarum izolasyon ve identifikasyonu ile suşların antibiyotiklere duyarlılığı üzerinde çalışmalar, Veterinarium, 4(1),4-6.

50. **Thaxton P, Williams J E and Siegel H S (1970):** Microtitration of Salmonella pullorum agglutinins, Avian Dis, 14, 813-819.

51. **Timms L M, Marshall R N and Breslin M F (1990):** Laboratory assessment of protection given by a Salmonella enteritidis PT4 inactivated adjuvant vaccines, Vet rec, 127, 611-614.

52. **Timms L M, Marshall R N and Breslin M F (1994):** Laboratory field trial assessment of protection given by a Salmonella enteritidis PT4 inactivated adjuvant vaccines, Br Vet J, 150, 93-102.

53. **Tuchili L, Ulaya W, Kato Y and Kaneuchi C (1995):** Recent characterisation of Salmonella strain isolated from chickens in Zambia, J Vet Med Sci, 58(1), 77-78.

54. **Waltman W D and Horne A M (1993):** Isolation of Salmonella from chickens reacting in the pullorum-typhoid agglutination test, Avian Dis, 37, 805-810.

55. **Weinberg J B, Ribic E and Wheat R W (1983):** Enhancement of macrophage mediated tumor cell killing by bacterial outer membrane proteins (porins), Infect Immun, 2(1), 219-223.

56. **Williams J E and Whittemore A D (1970):** Serological diagnosis of pullorum disease with the microagglutination system, Appl Microbiol, 21, 394-399.

57. **Williams J E and Whittemore A D (1973):** Avian Salmonella stained microtest antigens produced on solid media, Appl Microbiol, 26(1), 1-3.

58. **Wilson J E (1956)** Fowl typhoid - The effect of vaccination on the natural and experimental disease, Vet Rec, September 29th, 664-667.