



## ARAŞTIRMA MAKALESİ

### Farelerde ve koyunlarda inaktif *Corynebacterium pseudotuberculosis* aşısının kazeöz lenfadenitise karşı etkinliği

Osman Erganiş, H. Hüseyin Hadimli, Kürşat Kav, Aslı Sakmanoğlu, Zafer Sayın, Yasemin Pınarkara

Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University,  
42075, Campus, Konya, Turkey  
Geliş: 08.10. 2013, Kabul: 07.01.2014  
\*hhadimli@selcuk.edu.tr

#### Özet

**Erganiş O, Hadimli HH, Kav K, Sakmanoğlu A, Sayın Z, Pınarkara Y.** Farelerde ve koyunlarda inaktif *Corynebacterium pseudotuberculosis* aşısının kazeöz lenfadenitise karşı etkinliği.

**Eurasian J Vet Sci, 2014, 30, 2, 72-79**  
DOI:10.15312/EurasianJvetSci.201425922

**Amaç:** Bu çalışmada, Kazeöz Lenfadenitis'e (KLA) karşı hazırlanan *Corynebacterium pseudotuberculosis* aşısının etkinliğini fare ve koyunlarda belirlemek amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Üç farklı kombinasyonda (PLD, bakterin ve kombine) *C. pseudotuberculosis* aşılı hazırlandı. Aşılar, farelere 3 hafta aralıkla 2 kez deri altı yolla (0.1 mL) uygulandı. Farelere aşılamadan 15 gün sonra, çelinc olarak patojenitesi LD<sub>50</sub>'si belirlenen *C. pseudotuberculosis* suşu ve PLD deri altı yolla verildi. Fareler 20 gün boyunca ölüm ve hastalık yönünden gözlemlendi. Ölen hayvanların nekropsisi yapıldı ve iç organları mikrobiyolojik yönden incelendi. Koyunlar, ticari ve kombine aşılar ile deri altı yolla (1 mL) 3 hafta aralıkla 2 kez aşılandı. Aşılama öncesi ve 45-60 gün aralıklarla 20 haftaya kadar kan örnekleri alındı. Ayrıca apse oluşumu yönünden lenf düğümleri makroskopik olarak muayene edildi. Koyun ve fare kanlarında *C. pseudotuberculosis*'e karşı oluşan antikor titreleri modifiye ELISA ile belirlendi.

**Bulgular:** Kontrollere göre aşılanmış fare serumlarındaki antikor titreleri belirgin olarak yüksek bulundu. Çelinc denemelerinde PLD verilen, PLD ve kombine aşılı ile aşılanan farelerde hastalık ve ölüm gözlenmedi. Canlı bakteri verilen bakterin, kombine aşılı ile aşılanan farelerde kontrol gruplarına göre daha az olarak hastalık ve ölüm tespit edildi (P<0.05). Koyunlarda kontrollere göre antikor titreleri daha yüksek bulunurken apse oluşumu daha düşük olarak belirlendi (P<0.05).

**Öneri:** *C. pseudotuberculosis* kombine aşısının koyunları KLA enfeksiyonundan korunmasında yararlı olduğu kanaatine varıldı.

**Anahtar kelimeler:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, aşı, kazeöz lenfadenitis.

#### Abstract

**Erganiş O, Hadimli HH, Kav K, Sakmanoglu A, Sayin Z, Pınarkara Y.** Efficacies of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines against caseous lymphadenitis in mice and sheep.

**Aim:** This study was aimed to prepare *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines against Caseous Lymphadenitis (CLA) and to determine the effectiveness of vaccines in mice and sheep.

**Materials and Methods:** *C. pseudotuberculosis* vaccines were prepared in 3 different combination (PLD, bacterin and combined). Vaccines were subcutaneously administered twice (0.1 mL) 3 weeks intervals to mice. After vaccination at 15 days, mice were subcutaneously challenged with *C. pseudotuberculosis* and PLD of the challenge strain with LD<sub>50</sub> dose. All mice were observed throughout 20 days for morbidity and mortality. Internal organs of deaths/euthanized mice were cultured for re-isolation of bacteria. Sheep were subcutaneously vaccinated twice (1 mL) with vaccines of commercial or combined, 3 weeks intervals. Blood sera were taken before and after vaccination at 45-60 days intervals. In addition, lymph nodes were examined microscopically by the presence any abscess. Antibody titers to *C. pseudotuberculosis* in mice and sheep were determined by modified ELISA.

**Results:** When compared to controls, antibody titers were significantly higher in vaccinated mice (P<0.05). In challenged trials with PLD, the ratio of morbidity and mortality was not observed in the vaccines groups PLD and combined. But, the lower ratio of morbidity and mortality in challenged trials with live bacteria were determined in the groups of bacterin and combined. When the levels of antibody in sheep were found to be high, abscess formation were lower in, comparison to controls.

**Conclusions:** Especially combined *C. pseudotuberculosis* vaccines were concluded to be useful in prevention of CLA in sheep.

**Keywords:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, vaccine, caseous lymphadenitis.





## Giriş

*Corynebacterium pseudotuberculosis*; tüm dünyada koyun ve keçilerde yaygın olan, periferik lenf düğümleri ve akciğerlerde apse oluşumu ile karakterize Kazeöz Lenfadenitis'e (KLA) sebep olmaktadır (Erganiş ve ark 1990, Baird ve Fontaine 2007, Fontaine ve Baird 2008, Al-Gaabary ve ark 2009). Etkenin hayvanların çevresinde bulunması, enfekte hayvan ve/veya kontamine materyal ve ekipmanlar ile sinsi bir şekilde sürüde bulunan diğer hayvanlara yayılmada önemlidir. Hastalıklı hayvanlarda yün kalitesinin bozulması, apseler nedeniyle karkas kalitesinin düşmesi ve süt veriminin azalması ile ekonomik kayıplar oluşmaktadır (Valli ve Parry 1993, Paton ve ark 1999, O'Reilly ve ark 2010). Gram pozitif kokobasil olan *C. pseudotuberculosis* daha çok, küçük ruminantlarda ve farklı memeli türlerinde (at, lama, alpaga ve bizon) kronik enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Esterabadi ve ark 1975, Yeruham ve ark 1997, Hawari 2008). Yaygın olmamakla birlikte, potansiyel bir zoonoz olarak insanlarda da çeşitli vakalar bildirilmiştir (Peel ve ark 1997). KLA, küçük ruminantlarda (koyun-keçi) periferik lenf düğümleri, deri altı dokular ve iç organlarda apse oluşumu ile karakterize, ekonomik olarak önemli, zoonoz, kronik bir enfeksiyondur (Valli ve Parry 1993, Baird ve Fontaine 2007, Fontaine ve Baird 2008, Al-Gaabary ve ark 2009, Guimaraes ve ark 2009). Etken, apse oluşumu için gerekli olan fosfolipaz D (PLD) ve sfingomyelinaz aktiviteye sahip 31,5 kDa ağırlığında bir ekzotoksin üretmektedir.

KLA antibakteriyel ilaçlarla tedavi edilememekte, çoğunlukla semptomatik ya da açılan apselerle müdahale edilmesi sebebiyle tedaviden ziyade cerrahi müdahale ve dezenfeksiyon önemli olmaktadır (Baird 2006). Sürüdeki kötü yönetim, aşırı popülasyon sıklığı, yetersiz hijyen, kontamine barınaklar ve meralar, sürüdeki primer veya sekonder enfeksiyonların bulunması gibi değişik predispoze faktörlerin oluşması hastalığın görülme sıklığını artırabilmektedir. Çok hızlı bulaşması/yayılması nedeniyle, bir sürüye KLA'nın girmesi sonrası hastalığın önlenmesi çok güçtür. Bundan dolayı, hastalıkla mücadelede hastalığın insidensini azaltmak için çeşitli aşı geliştirme çalışmaları yapılmaktadır (Walker ve ark 1994, Simmons ve ark 1998, Hodgson ve ark 1999, Paton ve ark 2003, Fontaine ve ark 2006, Moura-Costa ve ark 2008).

Bu çalışmada, KLA'lı koyunlardan izole ve idendifiye edilen *C. pseudotuberculosis* suşundan hazırlanan inaktif bakterin, PLD ve kombine aşı ile aşılanan fare ve koyunlarda *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonlarına karşı aşılamanın etkinliğini belirlemek amaçlandı.

## Gereç ve Yöntem

### Aşı suşu

Aşı ve serolojik test antijenlerin hazırlanmasında KLA'lı koyunlardan izole edilen, biyokimyasal ve moleküler metodlar ile *C. pseudotuberculosis* olduğu tanımlanan ve PLD aktivitesi en yüksek tespit edilen suş kullanıldı.

### *C. pseudotuberculosis*'in LD<sub>50</sub> değeri

*C. pseudotuberculosis* suşu BHI sıvı besiyerinde mikroaerofilik olarak 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Daha sonra, bakteri 10.000g'de 20 dakika santrifüj edildi. Bakteri peleti sulandırılarak, koloni sayım metodu ile 1x10<sup>9</sup>, 1x10<sup>8</sup>, 1x10<sup>7</sup> ve 1x10<sup>6</sup> bakteri/mL olarak ayarlandı. Canlı bakteri konsantrasyonları 8'er fareye deri altı yolla verildi (Hadimli ve ark 2011a).

### PLD'nin LD<sub>50</sub> değeri

BHI sıvıbesiyeri santrifüj edilerek alınan süpernatantın protein miktarı (Lowry assay kit, BCATM Protein Assay Kit Thermo Scientific) ölçüldü. Daha sonra, PLD olarak süpernatant 4.8, 2.4, 1.2, 0.6, 0.3, 0.15, 0.75, 0.375 mg/mL. Farklı PLD değerleri 8'er fareye deri altı yolla verildi (Hadimli ve ark 2011a).

### *C. pseudotuberculosis* bakterin aşısı

*C. pseudotuberculosis* aşı suşu, Brain Heart Infuzyon (BHI) buyyona ekimi yapılarak 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Üreyen koloniler santrifüj ile (4500 rpm, 30 dak) toplandı, 3 kez PBS ile yıkandı ve tekrar süspansiyon haline getirildi. Son

Tablo 1. *Corynebacterium pseudotuberculosis* suşu ile çelinc yapılan farelerde hastalık ve ölüm oranları.

	Bakteri Konsantrasyonu (Bakteri/mL)			
	1x10 <sup>9</sup>	1x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>6</sup>
Hastalık	8/8	8/8	5/8	1/8
Ölüm	8/8	8/8	4/8	1/8

Tablo 2. Fosfolipaz D' nin farelerde LD<sub>50</sub> değerinin tespiti.

Protein mg/mL	Hastalık	Ölüm
4.8	7/7	7/7
2.4	7/7	7/7
1.2	7/7	7/7
0.6	7/7	4/7
0.3	7/7	2/7
0.15	4/7	2/7
0.075	4/7	0/7
0.0375	3/7	3/7

Tablo 3. *C. pseudotuberculosis* bakteri ve PLD ile çelinc yapılan aşıli farelerde iç organların mikrobiyolojik sonuçları.

Aşı	PLD	Bakterin	Bakterin+PLD		Ticari		Kontrol
Çelinc	PLD	Bakteri	PLD	Bakteri	PLD	Bakteri	Bakteri+PLD
Karaciğer	0/8	4/8	0/8	0/8	0/8	0/8	6/9
Dalak	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	6/9
Kalp	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	6/9
Böbrek	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	5/9
Akciğer	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	5/9
Toplam	0/40	4/40	0/40	0/40	0/40	0/40	28/45

Tablo 4. Aşıli farelerde *Corynebacterium pseudotuberculosis* bakteri ve PLD ile çelinc sonrası hastalık ve ölüm oranları.

Aşı	PLD	Bakterin	Kombine		Ticari		Kontrol
Çelinc	PLD	Bakteri	PLD	Bakteri	PLD	Bakteri	Bakteri+PLD
Hastalık	0/8	3/8	0/8	2/8	1/8	1/8	7/9
Ölüm	0/8	3/8	0/8	2/8	0/8	0/8	7/9

konsantrasyonu  $1 \times 10^9$  bakteri/mL'ye ayarlandı ve formalin ile inaktive edildi. Daha sonra, içerisine alüminyum hidroksit jeli (%4) katıldı ve homojenize edildi (Eggleton ve ark 1991c, Hadimli ve ark 2011b).

#### *C. pseudotuberculosis* PLD aşısı

*C. pseudotuberculosis* aşısı suşu, BHI buyyona ekilerek ve  $37^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edildi. Kültür santrifüj (6000 rpm, 30 dak) edildi ve supernatant alındı. Supernatant milipor (0.2  $\mu\text{m}$ ) filtreden süzülerek diyaliz membran ile PLD dışındaki moleküller uzaklaştırıldı (Eggleton ve ark 1991a, Eggleton ve ark 1991b).

#### *C. pseudotuberculosis* kombine aşısı

Kombine aşısı bir kısım *C. pseudotuberculosis* bakterin solüsyonu ( $1 \times 10^9$  bakteri/mL) ve bir kısım *C. pseudotuberculosis* PLD'si (0.6 mg/mL) karıştırıldı. Daha sonra alüminyum hidroksit jeli (%4) ilave edildi ve homojenize edildi (Eggleton ve ark 1991b, Hadimli ve ark 2011b).

#### Aşıların sterilite ve zararsızlık kontrolleri

Her bir aşısı (bakterin, PLD ve kombine) için, 5'er adet swiss albino fareye deri altı yolla 0.2 mL dozunda verildi ve 15 gün süreyle izlendi. Ayrıca, 1'er mL aşısı materyali, kanlı agar, MacConkey agar, Mycoplasma agar ve Saboroud Dextroz agara ekilerek 1 hafta süreyle üreme yönünden günlük kontrolleri yapıldı (Hadimli ve ark 2011b).

#### Hayvan materyali

Aşıların deney hayvanlarında etkinliğini (potens ve çelinc) belirlemek amacıyla, bakterin (8+8), PLD (8+8), kombine (8+8) aşısı ve kontrol (9) gruplarında olmak üzere toplam 57 fare kullanıldı. Saha etkinliği için, 6 farklı sürüde otovaksin aşısı ile 84 (37+47), ticari aşısı ile 199 (130+69) ve kontrol grubu için 175 (71+04) olmak üzere toplamda 548 koyun kullanıldı. Farelere uygun şartlarda bakım ve besleme yapıldı. Koyunların tüm aşılama yapıldı ve sürü şartlarında bakım ve beslemesi yapıldı.

#### Farelerin aşılama ve çelinc denemeleri

Fareler (her bir aşısı için 16), 0.2 mL aşısı ile 10 gün aralıkla 2 kez aşılandı. Her bir aşısı grubu için 8'er fareye son aşılamadan 10 gün sonra, çelinc denemeleri için  $1 \times 10^9$  bakteri/mL ile canlı *C. pseudotuberculosis* veya protein değeri 0.6 mg/mL olan PLD kas içi verildi ve 20 gün süre ile gözlemlendi. Süre sonunda ölmeyen farelere dekapitasyon yöntemi ile ötenazi yapıldı. Çelinc denemelerinde ölen yada öldürülen farelerin iç organlarından (kalp, dalak, karaciğer, akciğer, böbrek) etken izolasyonu için ekim yapıldı (Hadimli ve ark 2011b).

#### Koyunların aşılama

Koyunlar, 1 mL ticari aşısı veya kombine aşısı ile 3 hafta ara ile iç uyluktan deri altı yolla 2 kez aşılandı. Aşılama öncesi ve sonrası 20. haftaya kadar 45-60 gün aralıklarla kan örnekleri alındı (Hadimli ve ark 2005).





### Lenf düğümlerinin muayenesi

Aşılamadan 5-6 ay sonra, sürülerdeki koyunlarda saha çelincine karşı /doğal enfeksiyondan koruma oranının belirlenmesi için yüzeysel (baş, çene, omuz ve kasık) lenf düğümleri apse oluşumu yönünden muayene edildi.

### Serolojik bulgular

Koyunlardan alınan kan örneklerinde *C. pseudotuberculosis*'e karşı gelişen antikorların varlığı ELISA ile belirlendi.

### ELISA antijeninin hazırlanması

Aşılamada kullanılan *C. pseudotuberculosis* suşu %0.1 Tween 80 içeren BHI'a ekilerek 37°C'de 72 saat inkübe edildi. Kültür 8000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant milipor (0.2 µm) filtreden süzüldü ve 1/10000 oranında mertiolat katılarak ekzotoksin ELISA antijeni olarak kullanıldı. Santrifüj ile elde edilen pelet 3 kez PBS ile yıkanarak %0.5 formaldehit ile inaktive edildi. İnaktive edilen antijen sonike edilerek yoğunluğu McFarland No:5'e (1.5x10<sup>6</sup> bakteri/ml) ayarlanarak bakterin ELISA antijeni olarak kullanıldı (İlhan 2003, Binns ve ark 2007, Hadimli ve ark 2011b). BIORAD protein ölçüm kiti ile hem ekzotoksin ve hem de sonike bakterinin protein miktarları belirlendi.

### ELISA pleytlerinin hazırlanması

Bakterin ve ekzotoksin antijenleri kaplama tamponu (Karbonat/bikarbonat, pH 9.6) ile sulandırılarak ELISA pleytleri kaplandı. İdeal antijen, serum ve konjugat dilüsyonları, pozitif ve negatif kontrol serumları kullanılarak, dama tahtası yöntemi ile belirlendi. Karbonat/bikarbonat tampon sistemi

ile sulandırılan 100µl antijen düztabanlı ELISA pleytinin çukurlarına konuldu, 37°C'de 1 saat ve +4°C'de 1 gece inkübe edildi. Antijen ile kaplanan pleytler PBS-T (0.15 mol/L PBS, % 0.5 Twen 20, pH 7.2) ile 3 kez yıkandı. Daha sonra 10'ar katlı sulandırılan serum örneklerinden 100µl mikropleyt çukurlarına alınarak, 37°C'de 1 saat inkübe edildi. PBS-T ile 3 kez yıkanan pleytlere, 100µl horseradish peroksidase ile işaretleli donkey anti-sheep IgG (Sigma, A 3415) ilave edildi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Yıkama sonrası tüm çukurlara 100µl, 0.4 mg/mL σ-phenylenediamine dihydrochloride substrate (Sigma, P8287) ilave edilerek 20 dakika oda ısısında inkübe edildi ve ELISA okuyucuda (Antos, htII, Austria) 450 nm'de okutuldu (İlhan 2003, Binn ve ark 2007, Hadimli ve ark 2011b).

### İstatistiksel analizler

SPSS istatistiksel paket programı kullanılarak gruplar arasında farklılığın belirlenmesi için Varyans analizi, farklılıkların önem düzeyinin belirlenmesi için de Tukey testi kullanıldı. P<0.05 değeri istatistiki olarak önem sınırı kabul edildi.

### Bulgular

Farklı konsantrasyonlarda *C. pseudotuberculosis* süspansiyonu verilen farelerde hastalık ve ölüm sayıları dikkate alınarak LD<sub>50</sub> değerinin 1x10<sup>7</sup> bakteri/ml olduğu tespit edildi. Yüksek konsantrasyonlarda (1x10<sup>9</sup> ve 1x10<sup>8</sup> bakteri/mL) *C. pseudotuberculosis* verilen farelerin tümünde hem hastalık hem de ölüm gözlenirken, 1x10<sup>7</sup> bakteri/mL konsantrasyonunda 8 farenin 5'inin hastalandığı ve 4'ünün öldüğü belirlendi (Tablo 1). Farklı konsantrasyonlarda *C. pseudotuberculosis* PLD'si verilen farelerde hastalık ve ölüm sayıları dikkate alınarak LD50 değerinin 0,6 mg/mL olduğu tespit edildi.

Tablo 5. Koyunlarda *C. pseudotuberculosis* antikor titreleri (ELISA sonuçları).

Örnek	PLD		Bakteri	
	Aşılı	Aşısız	Aşılı	Aşısız
1	0.422±0.016a*	0.102±0.006c*	0.281±0.012b*	0.087±0.003c*
2	0.423±0.015a	0.099±0.010c	0.230±0.007b	0.076±0.002c
3	0.422±0.016a	0.121±0.007c	0.229±0.009b	0.093±0.005c
4	0.405±0.012a	0.087±0.005c	0.251±0.006b	0.095±0.009c
5	0.417±0.012a	0.114±0.009c	0.252±0.007b	0.081±0.003c
6	0.418±0.014a	0.095±0.011c	0.240±0.005b	0.103±0.008c
7	0.418±0.010a	0.100±0.011c	0.234±0.010b	0.090±0.004c
8	0.465±0.016a	0.097±0.006c	0.251±0.005b	0.086±0.007c
9	0.429±0.08a	0.108±0.009c	0.228±0.010b	0.079±0.002c
10	0.343±0.040a	0.117±0.012c	0.244±0.007b	0.107±0.011c

\*a, b, c: Satırlar arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemli bulundu (P<0.05).



Tablo 6. Aşılı ve aşısız koyunlarda lenf düğümlerinin muayene sonuçları.

	Otovaksin		Ticari		Otovaksin	
	1.Sürü N=37	2.Sürü N=47	1.Sürü N=130	2.Sürü N=69	1.Sürü N=71	2.Sürü N=104
Lenf Düğümleri						
Lymphodi cervicales superficiales (sağ)	1	1	8	1	5	3
Lnn. cervicales superficiales (sol)			3	1	2	2
Lnn parotidea (sağ)			5	1	6	3
Lnn parotidea (sol)			3		3	1
Lnn. subiliaci (sağ)			1	1		
Lnn. subiliaci (sol)			3		1	
Lnn. Mandibulare			1	1		2
Ara Toplam	1	1	24	5	17	11
TOPLAM	2		29		28	
Aşılama sonrası %	2.7	2.12	18.46	7.24	23.94	10.57
Toplam %	2.38		14.57		16	

Protein miktarı 0.6 mg/mL değerinde 7 farenin hepsi hastalanırken 4'ünde ölüm gözlemlendi (Tablo 2). Aşılanan hayvanlarda anormal davranışlar gözlenmedi ve aşının yapıldığı bölgede herhangi bir farklılık tespit edilmedi. *C. pseudotuberculosis* bakterin aşısı ile aşılanan ve canlı *C. pseudotuberculosis* bakterisi ile çelinc yapılan 4 farenin karaciğerinde *C. pseudotuberculosis* tekrar izole edilirken diğer iç organlarda herhangi bir etken izolasyonu gözlenmedi. Aynı zamanda, ticari, PLD ve kombine aşılar ile aşılanan ve aktif PLD veya canlı *C. pseudotuberculosis* bakterisi verilen farelerin iç organlarında da herhangi bir etken izole edilmedi. Bununla birlikte, canlı *C. pseudotuberculosis* ve PLD ile çelinc yapılan aşısız farelerin iç organlarının yarısından fazlasında *C. pseudotuberculosis* tekrar izole edildi (Tablo 3). Canlı *C. pseudotuberculosis* bakterisi verilen, bakterin aşısı ile aşılanan farelerin 3'ünde, kombine aşısı ile aşılanan farelerin 2'sinde ve ticari aşısı ile aşılanan farelerin 1'inde ölüm gözlemlendi. Ayrıca, bakterin aşısı grubunda 3, kombine aşısı grubunda 2 ve ticari aşısı grubunda 1 farede hastalık tespit edildi (Tablo 4). Aktif PLD verilen, PLD ve kombine aşıları ile aşılanan farelerde hastalık ve ölüm tespit edilmedi. Ancak, aktif PLD verilen ve ticari aşısı ile aşılanan farelerin 1'inde hastalık gözlenirken ölüm belirlenmedi. Bununla birlikte, aşısız farelerin 7'sinde hastalık ve ölüm belirlendi (Tablo 4). Aşısız hayvanlar ile karşılaştırıldığında; Al(OH)<sub>3</sub> jeli ile karıştırılan *C. pseudotuberculosis* kombine aşısı ile aşılanan koyunların serumlarında hem bakteri hem de PLD'ye karşı oluşan antikorların daha yüksek olduğu tespit edildi. Bakteri antijenine göre PLD'ye karşı oluşan antikor titrelerinin daha yüksek olduğu gözlemlendi (P<0.05, Tablo 5). Kombine ve ticari aşılar ile aşılanan koyunların lenf düğümlerinin apse yönünden elle muayene karşılaştırıldığında; otojen kombine aşısı ile aşılanan sürülerin %2.38'inde, ticari aşısı ile

aşılanan sürülerin %14.57'sinde ve aşısız sürülerin %16'sında lenf düğümlerinde apseleşme olduğu kaydedildi.

### Tartışma

Birçok ülkede hastalık tam olarak belirtilmediği için gerçek prevalansı daha düşük olarak bildirilmektedir (Pepin ve ark 1994, Erganiş ve ark 1990). Enfeksiyonun ekonomik öneminin hayvan sahipleri tarafından yeterince anlaşılması nedeniyle veteriner hekimlerin tavsiyeleri uygulanmamaktadır. Bununla birlikte, tahmini olarak %8-90 arasında olduğu ifade edilmektedir (Erganiş ve ark 1990, Al-Gaabary ve ark 2009, Guimares ve ark 2009). Türkiye'de konu ile ilgili epidemiyolojik çalışma yapılmamakla birlikte farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda, özellikle koyun sürülerinde yaygın olduğu belirtilmektedir (Erganiş ve ark 1990, İlhan 2003). Ülkemizde bildiri zorunlu hastalıklar listesinde yer almamakta ve hastalığın prevalansının düşürülmesine ve/veya eradikasyonuna yönelik bir çalışma da bulunmamaktadır.

KLA'nın kontrolünde seçilecek en etkili yol hala netlik kazanmamaktadır (Baird ve Fontaine 2007). Bununla birlikte, ilk tercih aşılama olarak önerilmekte, bağışıklama ile etken saçılımının azaltılması ve hastalığın prevalansında kademeli bir düşme amaçlanmaktadır. Ancak, KLA'ya karşı bütünüyle etkin bir aşının olmamasından dolayı günümüzde hastalık belirgin bir şekilde görülmeye devam etmektedir (Hodgson ve ark 1999, Fontaine ve ark 2006, O'Reilly ve ark 2010). Etken karşı koruma amaçlı anlamlı çalışmalar Güney Afrika ve Avusturya'da gerçekleştirilmiştir (Eggleton ve ark 1991a, Eggleton ve ark 1991b, Hodgson ve ark 1992). Avustralya'da 1983'den beri ticari olarak bir aşısı kullanılmamasına rağmen,







KLA prevalansı 2002'de yaklaşık %20'dir.

KLA'ya karşı farklı aşı formülasyonları (bakterin, toksoid, kombine, canlı ve DNA aşıları) hazırlanmıştır (Eggleton ve ark 1991a, Eggleton ve ark 1991c, Hodgson ve ark 1992, Walker ve ark 1994, Simmons ve ark 1998, Hodgson ve ark 1999, Fontaine ve ark 2006, Moura-Costa ve ark 2008, Pinho ve ark 2009). Kuzular 4-6 haftalık yada süten kesilme periyodunda 2 kez aşılanmalıdır. Yetişkin koyunlar için aşılama yılda 1 kez yapılmalıdır. Aşılama öncelikle kırkımdan önce yapılmalıdır, kırkım esnasında yapılan aşılamaların daha az koruyuculuğa sahip olduğu belirtilmiştir (Batey 1986, Eggleton ve ark 1991a).

Formalinle inaktive *C. pseudotuberculosis* aşısının koyunlarda koruyuculuğuna yönelik bir çalışmada, etkenin yüksek dozda intravenöz verilmesi ile pulmoner ödem ve ani ölümler oluşturması sebebiyle tatmin edici, sonuçlar alınması güçleşmiştir. Bununla birlikte, aşılama ile enfeksiyon etkenlerinin letal dozuna karşı koyunlarda koruma sağlanırken, kronik enfeksiyon ile ilişkili lezyonların oluşumu engellenmemiştir. Ayrıca, etkili korumanın kan dolaşımındaki antikorlara bağlı olmadığı, hücresel bağışıklığın önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Batey 1986, Eggleton ve ark 1991a).

PLD önemli bir virülens faktör olduğundan, pld geninin genetik inaktivasyonu canlı bir rekombinant aşı için temel sağlayabilir. PLD geni olmayan *C. pseudotuberculosis* (Toxminus) suşundan 107 bakterinin koyunlara verilmesiyle, virulent *C. pseudotuberculosis* ile apselerin oluşmadığı görülmüştür (Hodgson ve ark 1992). Formalin ile inaktive edilen ekzotoksinin kobaylara uygulamalarının homolog çelince karşı bir dereceye kadar koruma sağladığı bildirilmiştir. Bundan dolayı, hastalığın patogeneğinde etkin rol oynayan PLD'nin de korumada faydalı olabileceği fikri üzerinde durulmuştur (Eggleton ve ark 1991a). Bu çalışmada, PLD'nin farelerde LD<sub>50</sub> değeri farelerde 0.6 mg/ml iken bakterinin LD<sub>50</sub> değeri 1x10<sup>7</sup> bakteri/mL olarak tespit edildi.

Avusturalya'da klostridial aşılar ile kombine edilen bir *C. pseudotuberculosis* aşısı mevcuttur (Eggleton ve ark 1991b, Eggleton ve ark 1991c). Bu aşı ile aşılanan keçilerde, *C. pseudotuberculosis* suşuyla yapılan deneysel enfeksiyonlara karşı lezyonların görülme sıklığında azalma ile birlikte belirgin bir koruma sağlandığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, klostridial komponentlerle kombine edilen aşılardan tek başına hazırlanan aşıdan daha iyi koruma sağladığı bildirilmiştir (Anderson ve Narin 1984). KLA'ya karşı koruma humoral ve hücreyel olmakla birlikte, PLD dolaşımdaki antikorları nötralize etmektedir (Batey 1986, Eggleton ve ark 1991a, Sutherland ve ark 1992). PLD'nin formalinle muamelesi sonrasında çok az bir kısmının (%1) aktif kaldığı ve koruma için yeterli olduğu belirtilmektedir. Hodgson ve ark (1999), hazırladıkları genetik olarak inaktif ve formalin ile inaktif PLD aşıları ile koyunları aşıladıklarını ve *C. pseudotuberculosis* ile çelince yap-

tıklarını bildirmişlerdir. *C. pseudotuberculosis* enfeksiyonuna karşı genetik olarak inaktif PLD aşısının %44 ve formalinli aşısının %95 oranında koruma sağladığını belirtmişlerdir.

*C. pseudotuberculosis*'in sekret ve ekskretlerinin humoral ve hücreyel bağışıklığı uyarmasından dolayı aşı geliştirilmesinde önemli bir potansiyele sahip olduklarını ifade edilmiştir (Hodgson ve ark 1999). Bu çalışmada, aşısız hayvanlar ile karşılaştırıldığında *C. pseudotuberculosis* aşıları ile aşılanan koyunlarda yüksek titrede anti-*C. pseudotuberculosis* ve anti-PLD antikorları tespit edildi. Bakteri ve PLD antijenlerine karşı şekillenen antikorların titreleri karşılaştırıldığında ise anti-PLD antikorlarının daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Formalin ile inaktive edilen bakterin ve PLD'si kombine hazırlanan aşılardan, koyunlarda deneysel enfeksiyonlara karşı koruma sağladığı, iç ve dış yüzeysel KLA lezyonlarının insidensinde düşme sağladığı belirtilmiştir (Fontaine ve ark 2006). Fontaine ve ark (2006), koyunları çeşitli *C. pseudotuberculosis* aşıları (rekombinant PLD, formalin ile inaktif bakterin veya rekombinant PLD ilaveli bakterin) ile immunize ettiklerini; çelince sonrasında PLD ve bakterin aşılardan enfeksiyona karşı belirgin bir koruma sağladığını gözlediklerini belirtmişlerdir. Daha da önemlisi kombine aşının enfeksiyona karşı tam bir koruma sağlanmasında başarılı olduğunu ve bütün aşı hayvanlarda çelince suşunun elimine olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada, hazırlanan *C. pseudotuberculosis* aşılarının fare ve koyunlara uygulanması sonrasında herhangi bir yan etkisine rastlanılmadı. Kontrollere göre, *C. pseudotuberculosis* aşıları ile aşılanan ve PLD ve *C. pseudotuberculosis* suşu ile çelince yapılan farelerde hastalık ve ölüm oranları düşük bulundu (Tablo1). Bununla birlikte, PLD ve kombine aşılardan aşılanan farelerde PLD ile çelince sonrasında hastalık ve ölüm gözlenmezken, ticari aşı ile aşılan bir farede ölüm tespit edildi. Ayrıca, ölen ve uyutulan farelerin iç organlarının mikrobiyolojik yönden incelenmesinde, sadece bakterin aşı ile aşılanan ve *C. pseudotuberculosis* suşu ile çelince yapılan 4 farenin karaciğer örneklerinde etkenin tekrar izolasyonu yapılırken diğerlerinde üreme tespit edilemedi. Bu çalışmada, *C. pseudotuberculosis* (kombine ve ticari) aşılardan aşılanan koyunların lenf düğümlerinin klinik lezyon gelişimi karşılaştırıldığında; kombine aşı ile aşılanan koyunlarda daha düşük oranda (%2.38) apseleşme tespit edildi. Bununla birlikte, kontrol grubuna göre (%16) ticari aşı ile aşılanan koyunların lenf düğümlerinde apseleşme oranı (%14.57) tespit edilmesine rağmen istatistiksel olarak önemsizdi ( $p < 0.05$ ). Kombine aşısı hastalık gelişimini azaltma yönünden, aşısız hayvanlarla karşılaştırıldığında (16/2.38) 6.95 kat etkin bulundu.

KLA ile mücadelede, her ne kadar *C. pseudotuberculosis* izolatlarında serotip, genotip farklılıkları olması ve PLD toksoidi yeterli olarak görülse de, yüksek etkinlik elde edilebilmesi bakımından, yerel/ülkesel suşlardan hazırlanan aşılardan daha etkin olabileceği bildirilmektedir.



## Öneriler

Sonuç olarak, KLA'li koyunlardan izole edilen *C. pseudotuberculosis* suşundan hazırlana bakterin, PLD ve kombine aşılmasının farelerdeki ve kombine aşısının koyunlardaki sonuçlarına göre; koyunlarda *C. pseudotuberculosis*'in sebep olduğu KLA enfeksiyonlarından korunmada *C. pseudotuberculosis* aşılarının kullanılmasının faydalı olduğu kanaatine varılmıştır.

## Teşekkür

Bu makale, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenen projenin (BAP-09401091) bir bölümüdür.

## Kaynaklar

- Al-Gaabary MH, Osman SA, Oreiby AF, 2009. Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. *Small Rum Res*, 87, 116-121.
- Anderson ML, Narin ME, 1984. Control of caseous lymphadenitis in goats by vaccination. In: *Les Maladies de la Chevre. Les colloques de l'INRA*, 28, 605-609.
- Baird GJ, 2006. Treatment of ovine caseous lymphadenitis. *Vet Rec*, 159, 500.
- Baird GJ, Fontaine MC, 2007. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. *J Comp Path*, 137, 179-210.
- Batey RG, 1986. Pathogenesis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. *Aust Vet J*, 63, 269-272.
- Binns SH, Green LE, Bailey M, 2007. Development and validation of an ELISA to detect antibodies to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in ovine sera. *Vet Microbiol*, 123, 169-179.
- Eggleton DG, Doidge CV, Middleton HD, Minty DW, 1991a. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: Efficacy of the monocomponent *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid vaccine and combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Australian Vet J*, 68, 320-321.
- Eggleton DG, Haynes JA, Middleton HD, Cox JC, 1991b. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: correlation between *Corynebacterium pseudotuberculosis* toxoid contents and protective efficacy in combined clostridial-corynebacterial vaccines. *Australian Vet J*, 68, 322-325.
- Eggleton DG, Middleton HD, Doidge CV, Minty DW, 1991c. Immunisation against ovine caseous lymphadenitis: comparison of *Corynebacterium pseudotuberculosis* vaccines with and without bacterial cells. *Aust Vet J*, 68, 317-319.
- Erganiş O, Kaya O, Ateş M, İstanbulluoğlu E, 1990. Konya EBK kombinasyonunda kesilen koyunlardaki apseli lenf yumruları üzerine mikrobiyolojik ve serolojik incelemeler. *Veterinarium*, 1, 8-11.
- Esterabadi AH, Entessar F, Hedayati H, Narimani AA, Sadri M, 1975. Isolation of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from camel in Iran. *Archives de L'Institut Razi*, 27, 61-66.
- Fontaine MC, Baird GJ, Connor KM, Rudge K, Sales J, Donachie W, 2006. Vaccination confers significant protection of sheep against infection with a virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vaccine*, 24, 5986-5996.
- Fontaine MC, Baird GJ, 2008. Caseous lymphadenitis. *Small Rum Res*, 76, 42-48.
- Guimaraes AS, Seyffert N, Bastos BL, Portela RWD, Meyer R, Carmo FB, Cruz JCM, McCulloch JA, Lage AP, Heinemann MB, Miyoshi A, Azevedo V, Gouveia AMG, 2009. Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys. *Small Rum. Res*, 87, 86-91.
- Hadimli HH, Erganiş O, Sayın Z, Yıldırım B, 2005. Evaluation of the Efficacy of an Inactivated Salmonella Typhimurium vaccine in Sheep: Preliminary Report. 6th International Sheep Veterinary Congress, 17-21 June, Crete, Greece.
- Hadimli HH, Erganiş O, Kav K, Sayın Z, Sakmanoğlu A, Pınar-kara Y, 2011a. Determination of pathogenicity of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in mice. 3th East Mediterranean ICLAS Symposium & XV. ICLAS General Assembly. June 13-15, pp 71, Istanbul, Turkey.
- Hadimli HH, Sayın Z, Kav K, Erganiş O, Türütoğlu H, Dinç DA, 2011b. The determination of effectiveness combined mastitis prepared vaccines for dairy cows in mice. 3th East Mediterranean ICLAS Symposium & XV. ICLAS General Assembly. June 13-15, pp 52, Istanbul, Turkey.
- Hawari AD, 2008. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection (caseous lymphadenitis) in camels (*Camelus dromedarius*) in Jordan. *Am J Animal Vet Sci*, 3, 2, 68-72.
- Hodgson ALM, Carter K, Tachedjian M, Krywult J, Corner LA, McColl M, Cameron A, 1999. Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. *Vaccine*, 17, 802-808.
- Hodgson ALM, Krywult J, Corner LA, Rothel JS, Radford AJ, 1992. Rational attenuation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Potential cheesy gland vaccine and live delivery vehicle. *Infect. Immunity*, 60, 7, 2900-2905.
- İlhan Z, 2003. Koyunlarda *Corynebacterium pseudotuberculosis*'in ELISA ve Dot-Blot ELISA ile teşhisi. *Turk J Vet Anim Sci*, 27, 1327-1333.
- Moore RJ, Rothel L, Krywult J, Radford, AJ, Lund K, Hodgson ALM, 2000. Foreign gene expression in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. *Vaccine*, 18, 487-497.





- Moura-Costa LF, Bahia RC, Carminati R, Vale VLC, Paule BJA, Portela R W, Freire SM, Nascimento I, Schaer R, Barreto LMS, Meyer R, 2008. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Caninde' goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. *Vet Immun Immunopathol*, 126, 131-141.
- O'Reilly KM, Medley GF, Green LE, 2010. The control of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep flocks: A mathematical model of the impact of vaccination, serological testing, clinical examination and lancing of abscesses. *Prevent Vet Med*, 95, 115-126.
- Paton MW, Mercy AR, Sutherland SS, Ellis TM, 1988. The influence of shearing and age on the incidence of caseous lymphadenitis in Australian sheep flocks. *Acta Vet Scand*, 84, 101-103.
- Paton MW, Walker SB, Rose IR, Watt GF, 2003. Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks. *Australian Vet J*, 81, 91-95.
- Peel MM, Palmer GG, Stacpoole AM, Kerr TG, 1997. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Report of ten cases from Australia and review. *Clin Infect Dis*, 24, 185-191.
- Pepin M, Paton M, Hodgson AL, 1994. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. *Curr Topics Vet Res*, 1, 63-82.
- Pinho JMR, Dorella FA, Coelho KS, Fonseca CT, Cardoso FC, Meyer R, Portela RWD, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V, 2009. Immunization with Recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis* Heat-Shock Protein (Hsp)-60 is Able to Induce an Immune Response in Mice, But Fails to Confer Protection Against Infection. *Open Vet Sci J*, 3, 22-27
- Simmons CP, Dunstan SJ, Tachedjian M, Krywult J, Hodgson ALM, Strugnell RA, 1998. Vaccine potential of attenuated mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in sheep. *Infect Immun*, 66, 2, 474-479.
- Sutherland SS, Ellis TM, Paton MJ, Mercy AR, 1992. Serological response of vaccinated sheep after challenge with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Australian Vet J*, 69, 168-169.
- Valli VEO, Parry BW, 1993. Caseous lymphadenitis, In: *Pathology of Domestic Animals*, Vol. 3, 4th Edit., K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer, Eds, Academic Press, San Diego, USA, pp: 238-240.
- Walker J, Jackson HJ, Eggleton DG, Meeusen ENT, Wilson MJ, Brandon MR, 1994. Identification of a novel antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis* that protects sheep against caseous lymphadenitis. *Infect Immun*, 62, 6, 2562-2567.
- Yeruham I, Elad D, Van Ham M, Shpigel NY, Perl S, 1997. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli cattle: clinical and epidemiological studies. *Vet Rec*, 140, 423-427.