

FARE VE KOYUNLARDA GİNSENG KATILMIŞ İNAKTİF *SALMONELLA* TYPHIMURIUM AŞILARININ ETKİNLİĞİ

H. Hüseyin Hadimli¹ Osman Erganiş¹ Zafer Sayın¹ Bilgehan Yıldırım¹

The Efficacy of Inactivated *Salmonella* Typhimurium Vaccines with Ginseng in Mice and Sheep

Özet: Bu çalışmada, mineral oil (MO), mineral oil + ginseng (MO+G), alüminyum hidroksit (AH) ve alüminyum hidroksit + ginseng (AH+G) ile adjuvantlanmış inaktif *Salmonella* Typhimurium aşılmasının koyun ve farelerde etkinliğini belirlemek amaçlandı. İnaktif *S. Typhimurium* aşılardan, koyunlara 3 hafta aralıklarla 2 kez deri altı veya kas içi yolla uygulandı. Kan örnekleri aşılamadan sonraki 3., 5. ve 9. haftalarda toplandı. Koyunların serum örneklerinde *S. Typhimurium*'a karşı oluşan antikor titreleri modifiye Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ile belirlendi. İnaktif *S. Typhimurium* aşılardan, farelere 2 hafta aralıklarla 2 kez deri altı veya kas içi yolla uygulandı. Farelerde antikor ölçümü mikro Serum Agglütinasyon Testi (mSAT) ile yapıldı. Kontrollere göre aşılanmış fare ve koyunların serumlarındaki antikor titreleri belirgin olarak yüksek bulundu. Aşılanmış ve çelinç yapılmış farelerde ölüm ve morbitide gözlenmedi. Ayrıca, klasik adjuvantlar ile ginseng arasındaki etkileşimler değerlendirildi. Sonuç olarak, lokal suşlarından hazırlanan inaktif *S. Typhimurium* aşılı, *S. Typhimurium* enfeksiyonlarından korunmada faydalı olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Salmonella* Typhimurium, aşı, ginseng, mineral yağ, alüminyum hidroksit

Summary: The aim of this study was to determine effectiveness of inactivated *Salmonella* Typhimurium vaccines adjuvanted with mineral oil (MO), mineral oil + ginseng (MO+G), aluminium hydroxide (AH) and aluminium hydroxide + ginseng (AH+G) in sheep and mice. *S. Typhimurium* vaccines were administered in sheep twice at 3 weeks intervals, subcutaneously or intramuscularly. Blood samples were collected at weeks 3, 5 and 9 after vaccination. The titers of antibodies against *S. Typhimurium* in serum samples were detected by using self-made Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The inactivated *S. Typhimurium* vaccines were administered to mice twice with two weeks intervals by IM or SC routes. The measurement of the antibody in mice was done by micro serum agglutination test (mSAT). Levels of antibodies in sera of vaccinated animals were significantly higher than the controls. No mortality and morbidity were observed in mice vaccinated and challenged. In addition, interactions between classical adjuvants and ginseng were also evaluated. Consequently, effectiveness of *S. Typhimurium* vaccines prepared from local strains was found to be useful to protect sheep from the infection of *S. Typhimurium*.

Key Words: *Salmonella* Typhimurium, vaccine, ginseng, mineral oil, aluminium hydroxide

Giriş

Salmonellozis, yoğun yetiştirme yapılan özellikle sığır, koyun ve kanatlılarda ekonomik önemi olan ve en yaygın enterik bakteriyel bir enfeksiyondur (McClure ve ark., 1994; Kirk ve ark., 2002; Smith-Palmer ve ark., 2003). *Salmonella* türleri zoonoz karakterde olup süt, yumurta ve etle insanlara bulaşabilmektedir (Evans ve ark., 1999; Cruchaga ve ark., 2001). Bu nedenle, salmonellozisin önlenmesindeki temel strateji, aşılama ile salmonella türlerine karşı genç hayvanları korumak şeklindedir (Jones ve ark., 1988; Mukkur

ve ark., 1998; Pace ve ark., 1998; Raupach ve Kaufman, 2001). Bir işletmede salmonella enfeksiyonun çıkması durumunda antibakteriyel ilaçlarla mücadelede çoğunlukla istenilen sonuçlar alınamamaktadır (Kirk ve ark., 2002; Erganiş ve ark., 2003).

Salmonella enterica serovars typhimurium (*S. Typhimurium*), insan ve hayvanları tehdit eden zoonotik ajanların en yaygını olarak belirtilmektedir (Cruchaga ve ark., 2001; Robertson ve ark., 1982; Smith-Palmer ve ark., 2003). Etken, fekal kontaminasyon ile bulaşmış materyallerde ve hay-

vanların bulunduğu çevrede yaygın olarak bulunmaktadır. *Salmonella* türleri, hayvanlarda akut septisemi, atık, artritis ve solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olabilmektedir (Kang ve ark., 2003; Smith-Palner ve ark., 2003). Bununla birlikte, salmonellozisi hayvanların çoğunda herhangi bir klinik belirti görülmemektedir (Erganiş ve ark., 2003). Böyle hayvanlar, sürü içerisinde enfeksiyonun yayılmasına ve insanlarda gıda zehirlenmesine sebep olabilmesi açısından önem arz etmektedir (Lascelles ve ark., 1988; Evans ve ark., 1999).

Ginseng; Asya ülkelerinde uzun yıllardan beri kullanılan *Panax ginseng* C.A. Meyer (Araliaceae) kökünden elde edilen bir ekstraktır. Ginseng; i-Merkezi sinir sistemini uyarmak, mental konsantrasyonu artırmak veya anti-stress etkisi amacıyla ii- Genel enfeksiyonlara karşı doğal direnci artırmak amacıyla kullanılmaktadır (Rivera ve ark., 2003a). Çeşitli çalışmalarda (Hu ve ark., 2003; Kim ve ark., 2003; Rivera ve ark., 2003b), insan alveolar makrofajların fagositik aktivitesini geliştirdiği, *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte fareler üzerinde terapötik etkinliği olduğu ve sığır polimorf nükleolar lökositlerin fagositik ve oksidatif aktivitelerini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, ginseng total saponinleri, Rb2, Rg1 ve Rd ginsenoidleri, IL-6'yı artırdığı ve bu nedenle stresle ilişkili bozuklukların terapötik düzeltilmesinde veya araştırılmasında kullanılabilecekleri ifade edilmektedir (Kim ve ark., 2003).

Enfeksiyöz hastalıklarla mücadelede aşı uygulamalarının yeri ve önemi tartışılmayacak kadar büyüktür. *Salmonella* türlerinin oluşturduğu hastalıkların önlenmesinde insan ve hayvanlarda zayıflatılmış *Salmonella* türleri canlı aşı olarak kullanılmaktadır (Lascelles ve ark., 1988; Mukkur ve ark., 1998; Raupach ve Kaufmann, 2001; Kang ve ark., 2003). Bu tür aşılarda oral olarak uygulama kolaylığı, mukozal bağışıklığı uyarması, heterolog antijenler kadar taşıyıcı olması nedeniyle humoral ve hücrel bağışıklık oluşturması gibi avantajlara sahip olmaktadır (McClure ve ark., 1994; Mansurova ve ark., 1995). Ayrıca, inaktif bakterin ve toksoid aşılarda kullanılmaktadır (Pace ve ark., 1998; Erganiş ve ark., 2003). Erganiş ve ark. (2003), inaktif *S. Typhimurium* ve *Klebsiella pneumoniae* kombine aşının danalarda hem koruyucu hemde terapötik etkinliğinin olduğunu belirtmektedirler. Barbour ve ark. (1996), koyunlarda inaktif *S. Typhimurium* aşı uygulaması ile yüksek titrede antikor belirlediklerini ve 2. kez aşılamanın humoral bağışıklığı artırdığını ifade etmektedirler.

Lascelles ve ark. (1988), koyunlara canlı *S. Typhimurium*'un aşısının oral uygulamasının koruyucu bir immünite oluşturduğunu, fakat lokal olarak barsaklarda antikor üretimini indüklediği sonucuna ulaşmışlardır. Kwang ve Littledike (1995), 15 rekombinant flagellum proteini identifiye ve üretimi yaptıklarını, ayrıca koyun ve danalara canlı ve inaktif *S. Typhimurium* uyguladıklarını ve denemedeki hayvanların serumlarında immünoaktif proteinleri tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Mukkur ve ark. (1995), koyunlara inaktif ve canlı *S. Typhimurium* aşı uygulamalarında; inaktif aşıya göre canlı aşılardan antikor titrelerini daha da yükselttiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, barsaklarda aşılama 7 gün sonra IgM, 14 ve 21 gün sonrada IgG₁ ve IgG₂ tespit ettiklerini rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada, koyun ve danalardan izole edilen *S. Typhimurium* suşlarından hazırlanan inaktif aşının fare ve koyunlardaki immünojenik etkinliklerinin belirlenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Hayvan Materyali: Bu çalışmada, herhangi bir klinik anormallik göstermeyen Merinos koyun (6-8 aylık) ve swiss albino fareler (6-8 haftalık) kullanıldı. Koyunlar, her bir grupta (4 aşı grubu ve kontrol grubu) 7'şer hayvan olmak üzere toplam 5 gruba ayrıldı. Fareler, her bir grupta 10'ar hayvan olmak üzere 5 gruba (4 aşı grubu ve kontrol grubu) bölündü. Hayvanlara optimum şartlarda bakım, besleme ve aşılama uygulamaları yapıldı.

Aşı suşları: Koyun ve danalardan izole edilen *S. Typhimurium* suşları, aşı, çelinç ve serolojik testlerdeki antijenlerin hazırlanmasında kullanıldı. İzolatlar, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalında, *S. Typhimurium* (1,4,5,12:1,2) olarak serotiplendirildi.

***Salmonella Typhimurium* Suşlarının Patojeniteleri:** Koyunlardan izole edilen *S. Typhimurium* çelinç miktarını belirlemek için fareler kullanıldı. Bakteriyel konsantrasyon miktarları (6×10^8 , 6×10^7 , 6×10^6 , 6×10^5 bakteri/ml) göz önüne alınarak, Swiss albino fareler 5'erli 4 gruba bölündü. Bakterinin BHI buyyonda taze kültürleri hazırlandı, farelere kas içi yola enjekte edildi ve 15 gün boyunca gözlandı (Mukkur ve ark 1992). Fareler standart ışık (12/12 saat ışık/karanlık) ve ısı (22°C) şartlarında tutuldu ve ad libitum yem ve su verildi.

Inaktif *S. Typhimurium* Aşılardan Hazırlanması: *S. Typhimurium* suşlarının ayrı ayrı, Brain-Heart Infusion (BHI) buyyona ekimleri yapıldı ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Üreyen koloniler santrifüj ile

(4500 rpm, 30 dak) toplandı, 3 kez PBS ile yıkandı. Son konsantrasyonu 1.2×10^9 bakteri/ml'ye ayarlandı ve % 0.3-5 formalin katılarak inaktive edildi (Erganiş ve ark., 2002b).

Her bir bakteri süspansiyonundan eşit miktarda alındı ve karıştırıldı. Daha sonra, antijenler %3'lük alüminyum hidroksite (Al (OH)₃ jeline (Alhydrogel, Superfors A/S; Denmark) absorbe edildi veya mineral yağlı adjuvant (Montanide ISA 50, Seppic, France) ile homojenize edildi. Daha sonra, 4 mg/ml ginseng ekstraktı (Solgar, Leonia, N. J., USA) eklendi.

1. Grup: Bir kısım her iki *S. Typhimurium* suşlarından ibaret antijen solüsyonu ve 1 kısım Mineral Oil adjuvant ile homojenize edildi.

2. Grup: Her iki *S. Typhimurium* suşlarından ibaret antijen solüsyonuna %3 oranında Aliminyum hidroksit jeli ilave edildi.

3. Grup: Her iki *S. Typhimurium* suşlarından ibaret antijen solüsyonuna, %3 oranında Aliminyum hidroksit jeli ve 4 mg/ml ginseng ekstraktı ilave edildi.

4. Grup: Bir kısım her iki *S. Typhimurium* suşlarından ibaret antijen solüsyonu ve 1 kısım Mineral adjuvant ile homojenize edildi ve 4 mg/ml ginseng ekstraktı ilave edildi.

Aşıların Sterilite ve Zararsızlık Kontrolleri: Aşılar, 5'er adet swiss albino fareye deri altı yolla 0.2 ml dozunda verildi ve 15 gün süreyle gözlemlendi. Ayrıca, 1'er ml aşı materyalleri BHI, Kanlı agar, MacConkey agar ve Saboraud Dextroz agara ekildi ve 1 hafta süreyle üreme yönünden günlük kontrolleri yapıldı (Erganiş ve ark., 2002b).

Koyun ve Farelerin Aşılama: Koyunlar, 1'er ml dozunda aşı ile 21 gün ara ile kas içi (mineral yağlı) veya deri altı (alüminyum hidroksit jelili) yolla aşılandı. Fareler, 1'er ml dozunda aşı ile 15 gün ara ile arka bacadan kas içi yolla aşılandı. Kontrollere benzer şekilde 1'er ml steril fizyolojik tuzlu su enjekte edildi (Mukkur ve ark., 1995; Barbour ve ark., 1996).

Çelinç Denemeleri: Fareler 5 gruba (10'ar) bölündü ve toplam 50 fare üzerinde çelinç denemeleri gerçekleştirildi. İkinci aşılama 15 gün sonra, her bir fareye 6×10^7 bakteri/ml periton içi verildi ve 10 gün boyunca gözlemlendi. Bu dönemde şekillenen ölüm ve bulaşma oranları kaydedildi. Tüm farelerin iç organlarından bakteriyolojik ekimler yapılarak *S. Typhimurium* yeniden izolasyonu yapıldı (Mukkur ve ark., 1992).

Bakteriyolojik Yoklamalar: Farelerin iç organlarından alınan örneklerin bakteriyolojik yoklamaları klasik metotlara göre yapıldı.

Serolojik Yoklamalar: Anti- *Salmonella* Typhimurium Antikorlarının Ölçümü

Koyunlardan aşılama öncesi (0. gün) ve sonrası 3., 5. ve 9. haftalarda kan örnekleri alındı. Serum örnekleri çıkartılarak test edilinceye kadar -80°C'de saklandı. Serum örneklerinde *S. Typhimurium*'a suşlarına karşı gelişen antikorların varlığı laboratuvarda hazırlanan modifiye bir ELISA ile belirlendi. Ön çalışmalarda antijen, serum ve konjugatın optimal sulandırılmaların standardizasyonu yapıldı. Testlerde pozitif ve negatif kontrol serumları kullanıldı.

ELISA: Koyunlardan izole edilen *S. Typhimurium* (1,4,5,12:1,2), BHI'a ekilip 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Üreyen bakteriler santrifüjle toplandı, konsantrasyonu karbonat-bikarbonat buffer ile (pH 9.6) 1.2×10^9 bakteri/ml'ye ayarlandı ve inaktive edildi.

Immulon II mikroplyetlere 100 ml antijen konuldu, 37°C'de 1 saat ve 4°C'de 24 saat inkübe edildi. Yıkama sonrası, adsorbe olmamış alanları kaplamak için mikroplyetlere % 1'lik Bovine Serum Albumin (BSA)'den 100 ml kondu ve 37 °C'de 1 saat bekletildi. Daha sonra fosfat buffer solüsyonu ile (PBS-T; 0.15 mol/L, 0.5 % Tween 20, pH 7.2) ile 3 kez yıkandı.

Serum örneklerinin 10'ar katlı sulandırılmalarından (1/10, 1/20, 1/40,.....1/20480) 100 ml kondu ve 37 °C'de 60 dak inkübe edildi. PBS-T ile 3 kez yıkaması sonrası, tüm çukurlara 100 ml horseradish peroksidaz ile işaretli donkey anti-sheep IgG ilave edildi (1:8000, whole molecule, Sigma A 3415, St. Louis, MO, USA) ve 37 °C'de 30 dak inkübe edildi. Yıkama sonrası, tüm çukurlara 100 ml substrat olarak 0.4 mg/ml d-phenylenediamine dihydrochloride (0.05 M phosphate-citrate buffer, d-phenylenediamine tablets, Sigma P 8287, St Louis, MO, USA) ilave edildi. Mikroplyetler 20 dak oda ısısında bekletildi ve ELISA okuyucusunda (Anthos Labtec Instruments, A 5022, Salzburg) 450 nm'de okutuldu (Barbour ve ark 1996).

Serum Aglütinasyon Testi: Koyunlardan izole edilen *S. Typhimurium* suşu (1,4,5,12:1,2) % 5 koyun kan: içeren Blood Agar Base (Difco) ekilip 37°C'de 48 saat üretilti. Daha sonra üreyen mikroorganizmalar santrifüjle (4500 rpm for 30 min) toplandı ve PBS ile 3 kez yıkandı. Mikroorganizma

konsantrasyonu 1×10^7 bakteri/ml ayarlandı ve % 0.5 formalin ile inaktive edildi. Mikroorganizma süspansiyonu serum aglütinasyon test antijeni olarak kullanıldı (Erganiş ve ark., 2002a).

Farelerden aşılama öncesi (0. gün) ve çelinç uygulamasının 10. gününde kan örnekleri alındı. Serum örnekleri çıkartılarak test edilinceye kadar -80°C 'de saklandı. Serum Aglütinasyon testi 96 gözlü mikroplyetlerde yapıldı. Önce, 1. çukurcuklara 80 μl , diğerlerine 50 μl fizyolojik tuzlu su kondu. Birinci çukurcuka test edilecek serumdan 20 μl ilave edildi, karıştırıldı ve 2. çukurcuka 50 μl aktarıldı. Serum sulandırması (1/10, 1/20, 1/40,.....1/20480) son tüpe kadar yapıldı. Daha sonra tüm çukurcuklara 50 ml SAT antijeni ilave edildi ve 37°C 'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Serum sulandırmaları 1/10=1, 1/20=2, 1/40=3...., şeklinde numerik rakamlara çevrildi ve geometrik ortalamaları değerlendirildi (Erganiş ve ark., 2002a).

İstatistiksel Analizler: SPSS istatistiksel paket programı kullanılarak gruplar arasında farklılığın belirlenmesi için Varyans analizi, farklılıkların önem düzeyinin belirlenmesi içinde Tukey testi kullanıldı.

Bulgular

Koyunlardan izole edilen *S. Typhimurium* su-

şunun, yüksek konsantrasyonlarda (6×10^8 bakteri/ml, 6×10^7 bakteri/ml ve 6×10^6 bakteri/ml) verilen farelerin tümünü öldürürken, 6×10^5 bakteri/ml *S. Typhimurium* verilen farelerin 3'ü hastalandı ve 2'si öldü (Tablo 1).

Aşılınmış farelerde hastalanma ve ölüm meydana gelmezken, aşısız farelerden 3'ü hastalandı ve 7'si öldü. (Tablo 2).

İç organların mikrobiyolojik muayenesinde; kontrollere göre aşıli gruplardaki farelerin tümünde daha düşük oranda *S. Typhimurium* izole edildi. Aşılınmış farelerin (MO, AH, AH+G ve MO+G) organlarından *S. Typhimurium* izolasyonları sırasıyla; 17 (% 34), 12 (% 24), 7 (% 14) ve 8 (% 16) iken kontrol farelerde 33 (% 66) olarak tespit edildi. Bununla birlikte, normal aşı gruplarındaki (AH ve MO) farelere göre, ginseng ekstraktı ilave edilmiş aşı gruplarındaki (AH+G ve MO+G) farelerin iç organlarından daha düşük oranda *S. Typhimurium* izole edildi (Tablo 3).

Kontrollere göre aşılınmış ve çelinç yapılmış farelerin serumlarında anti-*S. Typhimurium* antikor titreleri belirgin olarak daha yüksek bulundu. İstatistiksel olarak, aşıli gruplar arasındaki farklılıklar önemsiz bulunmasına rağmen, ginseng eklenmiş *S. Typhimurium* aşısı (AH+G ve MO+G) ile aşı-

Tablo 1. *Salmonella Typhimurium* suşunun farelerdeki patojenitesi

6×10^8 bakteri/ml		6×10^7 bakteri/ml		6×10^6 bakteri/ml		6×10^5 bakteri/ml	
Hasta	Ölüm ^a	Hasta	Ölüm	Hasta	Ölüm	Hasta ^b	Ölüm
5/5	5/5 ^c	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5 ^c	2/5

^a Periton içi inokulasyon sonrası 15 gün süresince ölen farelerin sayısı

^b Periton içi inokulasyon sonrası 15 gün süresince hastalanan farelerin sayısı

^c Ölen veya hastalanan /örnek sayısı

Tablo 2. *Salmonella Typhimurium* (6×10^7 CFU) ile çelinç edilen farelerde hasta ve ölüm sayıları*,**

	MO ^a	AH ^b	AH+G ^c	MO+ G ^d	Kontrol
Hasta	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10 ^e
Ölüm	0/10	0/10	0/10	0/10	7/10

^aMO: Mineral yağlı, ^bAH: Alüminyum hidroksit, ^cAH+G: Alüminyum hidroksit + Ginseng (4 mg), ^dMO+G: Mineral yağlı + Ginseng (4 mg)

^e Ölen veya hastalanan /örnek sayısı

*Fareler 15 gün ara ile 2 kez aşılandı.

** Fareler 2. aşılamaadan 15 gün sonra periton içi yolla *S. typhimurium* ile çelinç edildi ve 10 gün süresince gözlemlendi.

Tablo 3. Çelinç yapılmış farelerin iç organlarından *S. Typhimurium* izolasyon sonuçları

İç organlar	MO ^a	AH ^b	AH+G ^c	MO+ G ^d	Kontrol
Karaciğer	7/10	5/10	2/10	2/10	10/10 ^e
Dalak	4/10	3/10	3/10	1/10	5/10
Kalp	0/10	1/10	1/10	1/10	5/10
Böbrek	4/10	1/10	0/10	2/10	5/10
Akciğer	2/10	2/10	1/10	2/10	8/10
Toplam	17/50	12/50	7/50	8/50	33/50

^aMO: Mineral yağlı, ^bAH: Alüminyum hidroksit, ^cAH+G: Alüminyum hidroksit + Ginseng (4 mg), ^dMO+G: Mineral yağlı+Ginseng (4 mg)

^e İzole edilen/Örnek sayısı

*Fareler 15 gün ara ile 2 kez aşılandı.

** Fareler 2. aşılama 15 gün sonra periton içi yolla *S. Typhimurium* ile çelinç edildi ve 10 gün süresince gözlemlendi.

Tablo 4. mSAT ile Farelerin Serumlarındaki Anti- *S. Typhimurium* Antikor Titreleri

	MO ^a	AH ^b	AH+G ^c	MO+G ^d	Kontrol
Aşılama Öncesi	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Çelinç sonrası	10.90±0.10	10.90±0.10	11.50±0.22	11.50±0.31	2.30±0.36

^aMO: Mineral yağlı, ^bAH: Alüminyum hidroksit, ^cAH+G: Alüminyum hidroksit + Ginseng (4 mg), ^dMO + G: Mineral yağlı + Ginseng (4 mg)

^eSerum sulandırılmaları numerik rakamlara çevrildi; 1/10= 1, 1/20=2, 1/40=3,...

*Fareler 15 gün ara ile 2 kez aşılandı.

** Fareler 2. aşılama 15 gün sonra periton içi yolla *S. Typhimurium* ile çelinç edildi ve 10 gün süresince gözlemlendi.

Tablo 5. ELISA ile Koyunların Serumlarındaki Anti- *S. Typhimurium* Antikör Titreleri

Hafta	MO ^a	AH ^b	AH+G ^c	MO+G ^d	Kontrol
Aşılama Öncesi	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
3	8.33±0.31	7.71±1.25	6.57±0.8	8.71±1.50	0.00±0.00
5	10.83±0.40	10.57±1.81	8.43±0.57	10.33±1.21	0.00±0.00
9	9.83±0.17	9.25±0.50	8.80±0.37	10.00±0.71	0.00±0.00

^aMO: Mineral yağlı, ^bAH: Alüminyum hidroksit, ^cAH+G: Alüminyum hidroksit + Ginseng (4 mg), ^dMO + G: Mineral yağlı + Ginseng (4 mg)

^eSerum sulandırılmaları numerik rakamlara çevrildi; 1/10= 1, 1/20=2, 1/40=3,...

lanmış farelerin serumlarında daha yüksek titrede antikorlar belirlendi (Tablo 4).

Aşılı ve aşısız koyunların kan serumlarındaki *S. Typhimurium*'a karşı oluşan antikor titreleri Tablo 5'de gösterilmektedir. Kontrollere göre *S. Typhimurium* aşılı ile aşılanmış koyunların serumlarında anti-*S. Typhimurium* antikor titreleri belirgin olarak daha yüksek bulundu ($P<0.05$). Bütün aşılanmış koyunlarda, ilk aşılama sonrası 3. haf-

tada antikor titrelerinde artış belirlendi. İkinci aşılama sonrası 5. haftada, artışlar daha da belirginleşti. Bununla birlikte, aşılı gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz ($P>0.05$) bulunmasına rağmen, ginseng eklenmiş mineral yağlı *S. Typhimurium* aşısı (MO+G) ile aşılanmış farelerin serumlarında daha yüksek titrede antikorlar belirlendi.

Tartışma ve Sonuç

Salmonellozis, koyun dahil bütün çiftlik hayvanlarında büyük ekonomik kayıplara sebep olan ve gıda zinciri içerisinde insanlarda enfeksiyon yapabilme potansiyeline sahip bir hastalıktır. Zoonoz özelliğe sahip birçok salmonella serotipi (yaklaşık 2000) mevcuttur. Bununla birlikte, *S. Typhimurium* koyun, kanatlı, sığır dahil geniş bir konakçı spektrumunda adapte olabilmektedir (Kwang ve ark., 1995; Evans ve ark., 1999; Kirk ve ark., 2002; Cruchaga ve ark., 2001; Smith-Palmer ve ark., 2003).

Ginsengin kuru ekstraktında; bir çeşit saponin olan ginsenoidler, kimyasal olarak tri-terpenoid glikozidler belirlenmiştir. Ayrıca, Ginseng influenza ve leptospirozis gibi enfeksiyonlara karşı immünmodulatör olarak önerilmiştir (Rivera ve ark 2003). Aslında, uzun yıllardan beri aşılar da saponinler adjuvant olarak kullanılırken ginseng daha çok enfeksiyonlara karşı doğal direnci artırmak için kullanılmıştır (Rivera ve ark 2003). Bununla birlikte, daha düşük immünojeniteye sahip antijenlerin uyurum özelliklerini artırmak suretiyle bağışıklığı da geliştirebilmektedir (Hu ve ark., 2003).

Rivera ve ark (2003), 2 mg ginseng ekstraktı eklenen *Parvovirus* ve *Erysipelothrix rhusiopathiae* aşıları ile aşılanan domuzlarda, aşılama sonrası daha yüksek titrede antikorların oluştuğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, alüminyum hidroksitli aşılar IgG₁'in sentezini uyarırken, ginseng ilaveli aşıların IgG₂'nin sentezini sağladığını tespit etmişlerdir. Hu ve ark. (2003), süt ineklerinde ginseng ekstraktı ve Rb₁ ginsenoidini ile kombine edilen *Staphylococcus aureus* bakterin ve ovalbuminin; tek başlarına verilmelerine göre daha yüksek titrede antikor oluşturduğunu belirlemişlerdir. Bunun yanısıra, ginseng ekstraktı aşılar ile aşılanmış hayvanlarda Pokeweed mitojen, Concanavalin A ve *S. aureus* antijenlerine karşı oluşan cevapta lenfosit proliferasyonunda artış gözlemlenmiştir. Sonuçta, saha denemelerinde, ginseng ekstraktı ve Rb₁ ginsenoidini adjuvant olarak mastitis aşılarına katılması meme içi enfeksiyonlara karşı korunmada etkili olduklarını ifade etmişlerdir.

Bu çalışmada, aşıları gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmasına rağmen, ginseng eklenmiş mineral yağlı *S. Typhimurium* aşısı (MO+G) ile aşılanmış koyunların ve (AH+G ve MO+G) aşıları ile aşılanmış farelerin serumlarında daha yüksek titrede antikorlar belirlendi. Rivera et al. (2003) ve Hu ve ark. (2003), aşı adjuvantı olarak alüminyum hidroksit ve

ginseng'in antikor üretimi üzerine sinerjik etkili olduğunu ifade etmektedir. Bu çalışmanın bulguları araştırmacıların (Rivera et al., 2003 ve Hu ve ark., 2003) sonuçlarını teyit etmektedir. Ayrıca, normal aşı gruplarındaki (AH ve MO) farelere göre ginseng ekstraktı ilave edilmiş aşı gruplarındaki (AH+G ve MO+G) farelerin iç organlarından daha düşük oranda *S. Typhimurium* izole edilmesi; ginseng'in immun sistemin bakterisidal aktivitesini artırdığını göstermektedir.

Aşı çalışmalarında; suş, antijen miktarı, inaktivasyon yöntemleri ve kullanılan adjuvantın çeşidi şekillenecek humoral ve hücresele bağışıklık üzerine etkili olabilmektedir. Antijen ve aşı kaynağı olarak kullanılan *S. Typhimurium*'un patojenitesinin belirlenmesi önemlidir. Bu çalışmada, yüksek konsantrasyonlarda (6×10^8 bakteri/ml, 6×10^7 bakteri/ml ve 6×10^6 bakteri/ml) taze *S. Typhimurium* kültürü verilen farelerin tümü ölürken, 6×10^5 bakteri/ml konsantrasyonunda 3'ünün hastalandığı ve 2'sinin öldüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlar, sahadan izole edilen *S. Typhimurium* suşunun patojenitesinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Erganiş ve ark. (2003), bir besi işletmesinde ölen 2 sığırdan izole edilen *S. Typhimurium* ve *K. pneumonia* suşlarından hazırlanan otojen bakterin aşısı ile 2 kez aşılanan hayvanlarda yüksek titrede antikor tespit etmişlerdir. Aşının yan etkilerinin olmaması, ilaç kullanımının azalması ve salmonellozis yönünden herhangi bir klinik bulgunun gözlenmemesi nedeniyle inaktive otojen *Salmonella* ve/veya *Klebsiella* aşılarının koruyucu olduğu kadar tedavi edici olarak da faydalı olduğu ifade edilmiştir.

Deneysel aşı çalışmalarında, kullanılan antijenlere karşı oluşan humoral bağışıklığın belirlenmesinde ELISA önemli bir yer tutmaktadır. Kwang ve ark (1995), doğal enfekte veya salmonella ile aşıları hayvanların kanlarında lipopolisakarid, flagellin, bakteriyel lizatlar ve yüzey antijenlerine karşı oluşan antikorları ELISA ile tespit etmişlerdir. Brennan ve ark (1994), salmonella aşısı ile aşılanan fare ve koyunların serumlarında aşılama sonrası yüksek titrede salmonella spesifik IgM, IgG, ve IgA ve intestinal yıkantıda da IgA tespit etmişlerdir. Mukkur ve ark (1995), canlı aromatik *S. Typhimurium* CS332 suşunun kas içi ve oral yolla veya aseton ile inaktive edilmiş virulent *S. Typhimurium* suşunun kas içi verildiği koyunların intestinal yıkantı ve serumlarında; kontrollere göre veriliş yoluna bakılmaksızın, anti-flagellin veya antilipopolisakarit antikorlarını daha yüksek bulmuşlardır. Ayrıca serumda anti-LPS antikorlarının

IgM, IgG₁ ve IgG₂ olduğunu rapor etmişlerdir. Bununla beraber, inaktif aşırıya göre canlı *S. Typhimurium* aşırıları ile aşıl原因an koyunlarda antikor titreri daha yüksek tespit edilmiştir. Canlı aşırıları ile kas içi veya oral yolla aşıl原因a sonrası 7. günde koyunların intestinal yıkantılarında hem anti-LPS hemde anti-flagellin antikorlarında IgM tespit edilirken, aşıl原因a sonrası 14 ve 21. günlerde IgG₁ ve IgG₂ belirlemişlerdir. Ölü aşırılarda ise en fazla antikor izotipi IgG₁ olarak bulunmuştur. Barbour ve ark (1996), inaktif *S. Typhimurium* yağlı aşırı ile aşıl原因an iki farklı koyun ırkının (İvesi koyunu ve Fin x Texel x İvesi melezi) serumlarında ELISA ile ilk immunizasyondan 2 hafta sonra, serokonversiyon % 66.7 iken İvesi koyunlarda rapel sonrası 3. haftada %100 artış gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada, kontrollere göre aşıl原因anmış ve çelinç yapılmış farelerin serumlarında *S. Typhimurium*'a karşı şekillenen antikor titreri belirgin olarak daha yüksek bulundu. Benzer şekilde, *S. Typhimurium* aşırıları ile aşıl原因anmış koyunların serumlarında da; yüksek titrelerde anti-*S. Typhimurium* antikorları belirlendi (P<0.05). Bütün aşıl原因anmış koyunlarda, ilk aşıl原因a sonrası 3. haftada antikor titreri artışı gözlenirken, ikinci aşıl原因a sonrası 5. haftada artışlar daha da belirginleşti. Koyunlarda, kontrollere göre aşılı hayvanlarda aşıl原因a sonrası 9. haftada antikor titreri hala yüksek olduğu belirlendi. Bu çalışma ve diğer araştırmaların (Kwang ve ark 1995, Mukkur ve ark 1995, Barbour ve ark 1996) sonuçları uyumlu bulundu.

Begg ve ark., (1990), canlı aromatik *S. Typhimurium* suşu ile deri altı ve kas içi aşıl原因an koyunlarda ölüm ve ishal oranlarının düştüğünü belirtmektedirler. Mukkur ve ark (1992), canlı aromatik *S. Typhimurium* CS332 suşunun parenteral verilmesi sonrası, farelerde 7. günde yapılan çelinç karşı bir koruma oluştuğunu ve 3 ay korumanın devam ettiğini tespit etmişlerdir. Koyunlarda ise, korumanın 6. ayda varken, 12. ayda belirleyemediklerini ifade etmektedirler.

Bu çalışmada, çelinç yapılan aşısız farelerin 3'ünde hastalanma ve 7'sinde ölüm meydana gelirken aşılı farelerde hastalanma ve ölüm gözlenmedi. Ayrıca, çelinç yapılan farelerin iç organlarının mikrobiyolojik muayenesinde; kontrollere göre aşılı farelerin tümünde daha düşük oranda *S. Typhimurium* izole edildi. Aşıl原因anmış farelerin (MO, AH, AH+G ve MO+G) organlarından *S. Typhimurium* izolasyonları sırasıyla; 17 (% 34), 12 (% 24), 7 (% 14) ve 8 (% 16) iken kontrol farelerde 33

(% 66) olarak tespit edildi. Kontrollere göre aşılı hayvanlarda hastalanma ve ölüm gözlenmemesi, hem de iç organlarında daha az etken izole edilmesi aşırıların etkinliğine bağlandı. Diğer çalışmalarda (Begg ve ark., 1990; Mukkur ve ark., 1992) belirtilen salmonella aşırılarının ölüm ve hastalanma oranları üzerine etkileri ile bu çalışmadaki koruma sonuçları paralellik göstermektedir.

Araştırmacılar (Begg ve ark., 1990; Brennan ve ark., 1994), humoral bağışıklığın yanı sıra hücresel bağışıklığın şekillendiğini de belirtmektedirler. Aşıl原因anmış farelerde salmonella antijenlerine karşı güçlü bir gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu oluştuğunu da bildirmektedirler (Begg ve ark., 1990; Brennan ve ark., 1994; Polotskii ve ark., 1994). Polotskii ve ark. (1994), koyunlarda *S. Typhimurium* 274 aşısının kas içi aşıl原因a sonrası blastosit transformasyonu, mitozis oranında, plazma, dalak, lenf düğümlerinde hücre sayısında artış gözlemiştir.

Sonuç olarak; patojenitesi yüksek *S. Typhimurium* ile farelerin çelinç denemelerinde *S. Typhimurium* aşırılarının koruma gücünün olduğu bulundu. Ayrıca, Ginseng mineral yağlı veya aliminyum hidroksit adjuvant ile bakterin aşırının kombine edilmesi; aşırının hem humoral hemde bakterisidal etkinliğini pozitif olarak artırmaktadır. *S. Typhimurium* aşırıları, koyun sürülerinde salmonella enfeksiyonlarının önlenmesinde kullanılabilir. Bununla birlikte, aşırıların hücresel bağışıklık üzerine etkileri ve etkenin fekal saçılımının belirlenmesi için yeni araştırmaların sürdürülmesi gerektiği kanaatine varıldı.

Teşekkür

Projeyi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (BAP-2004/108) teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Barbour, E. K., Hamadeh, S. K., Zoubiane, G., Talhouk, R., Hilan, C. (1996). An enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of an experimental *Salmonella* Typhimurium vaccine in two breeds of ewes. *Small Rum. Res.*, 21, 239-244.

Begg, A. P., Walker, K. H., Love, D. N., Mukkur, T. K. (1990). Evaluation of protection against experimental in sheep immunised with 1 or 2 doses of live aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium. *Aust. Vet. J.*, 67, 294-298.

Brennan, F.R., Oliver, S. J., Baird, G. D. (1994). Differences in the immune responses of mice and sheep to an aromatic-dependent mutant of *Salmonella* Typhimurium. *J. Med. Microbiol.*, 41, 20-28.

Cruchaga, S., Echeita, A., Aladuena, A., Garcia-Pene, J.,

- Frias, N., Usera, M. A. (2001). Antimicrobials resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. *J. Antimicrobial Chemoth.*, 47, 315-321.
- Erganis, O., Çorlu, M., Hadimli, H. H., Kav, K. (2003). Development and therapeutic effects of inactivated salmonella and klebsiella vaccine for beef cattle: A preliminary report. Condition and Perspectives of Veterinary Science and Practice Development Materials of Int. Scientific and Research Conference, Almaty, Kazakistan.
- Erganis, O., Hadimli, H. H., Kav, K., Çorlu, M., Öztürk, D. A. (2002a). Comparative study on detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* antibodies in meat-type turkeys by dot immunobinding assay, rapid agglutination test and serum agglutination test. *Avian Path.*, 31, 201-204.
- Erganis, O., Hadimli, H. H., Solmaz, H. (2002b). Vaccine development from serotypes O1, O2 and O78 of *Escherichia coli* against avian colibacillosis: Layer chickens. *Turk J Vet Anim Sci.*, 26, 1213-1221.
- Evans, M. R., Salmon, R. L., Nehaul, L., Mably, S., Waford, L., Nolan-Rarrel, M. Z., Gardner, D., Ribeiro, C. D. (1999). An outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 170 associated with kebab meat and yogurt relish. *Epidemiol. Infect.*, 122, 377-383.
- Hu, S., Concha, C., Lin, F., Persson Waller, K. (2003). Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune responses to immunisation against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. *Vet. Immun. Immunopathol.*, 91, 29-37.
- Jones, P. W., Collins, P., Aitken, M. M. (1988). Passive protection of calves against experimental infection with *Salmonella* Typhimurium. *Vet Rec.*, 123, 536-541.
- Kang, H. Y., Curtiss, R. (2003). Immune responses dependent on antigen location in recombinant attenuated *Salmonella* Typhimurium vaccines following oral immunization. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1519, 1-6.
- Kim, D., Moon, Y., Lee, T., Jung, J., Suh, H., Song, D. (2003). The inhibitory effect of ginseng saponins on the stress induced plasma interleukin-6 in mice. *Neuroscience Lett.*, 353, 13-16.
- Kirk, J., Atwill, E., Holmberg, C., Arana, M., et al. (2002). Prevalence of and risk factors for *Salmonella* in water offered to weaned dairy calves in California, USA. *Prev. Vet. Med.*, 54, 169-178.
- Kwang, J., Littlelidge, E. T. (1995). Production and identification of recombinant proteins of *Salmonella* Typhimurium and their use in detection of antibodies in experimentally challenged animals. *FEMS Microbiol. Lett.*, 130, 25-30.
- Lascelles, A. K., Beh, K. J., Mukkur, T. K. S., Willis, G. (1988). Immune response of sheep to oral and subcutaneous administration of live aromatic-dependent mutant of *Salmonella* Typhimurium (SL1479). *Vet. Immun. Immunopathol.*, 18, 259-267.
- Mansurova, N. L., Chuprinina, R. P., Egorova, N. B., Kuzmina, L. A., Scorikova, I. G., Kaverina, K. G. (1995). Antigen-specific activity of poly-component vaccine after oral administration and subcutaneous injection. *Zhurnal Mikrobiol. Epidemiol Immunobiol.*, 1, 37-39.
- McClure, A. M., Christopher, E. E., Wolff, W. A., Fales, W. H., Krause, G. E., Miromonti, J. (1994). Effect of Re-17 mutant *Salmonella* Typhimurium bacterin toxoid on clinical coliform mastitis. *J Dairy Sci.*, 77, 2272-2280.
- Mukkur T. K. S., Walker, K. H. (1992). Development and duration of protection against salmonellosis in mice and sheep immunised with live aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium. *Res. Vet. Sci.*, 52, 147-153.
- Mukkur T. K. S., Walker, K. H., Baker, P., Jones, D. (1995). Systemic and mucosal intestinal antibody response of sheep immunised with aromatic-dependent live or killed *Salmonella* Typhimurium. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 18, 27-39.
- Mukkur, T. K. S., Walker, K. H., McDowell, G. H. (1998). Passive immunisation of neonatal lambs via colostrum and milk of ewes previously immunised with live attenuated *Salmonella* Typhimurium protects neonatal lambs from experimental salmonellosis. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 21, 327-336.
- Pace, J. L., Rossi, H. A., Esposito, V. M., Frey, S. M., Tucker, K. D., Walker, R. I. (1998). Inactivated whole cell bacterial vaccines: Current status and novel strategies. *Vaccine*, 16, 1563-1574.
- Polotskii, Iu. E., Efremov, V. E., Bondarenko, V. M., Svirideko, V. F., Khozhai, L. I., Kreichman, G. S., below, A. G., Zhorykunov, A. I. (1994). The vaccinal process after intramuscular immunization of sheep with *Salmonella* Typhimurium strain 274. *zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 2, 67-74.
- Raupach, B., Kaufmann, S. H. E. (2001). Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: How to choose the appropriate *Salmonella* vaccine strain. *Microbes and Infection*, 3, 1261-1269.
- Rivera, E., Dagfeldt, A., Hu, S. (2003a). Ginseng extract in aluminium hydroxide adjuvanted vaccines improves the antibody response of pigs to porcine *Parvovirus* and *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet. Immun. Immunopathol.*, 91, 19-27.
- Rivera, E., Hu, S., Concha, C. (2003b). Ginseng and aluminium hydroxide act synergistically as vaccine adjuvant. *Vaccine*, 21, 1149-1157.
- Robertsson, J. A., Svenson, S. B., Renstrom, L. H. et al. (1982). Defined salmonella antigens for detection of cellular and humoral immune responses in salmonella infected calves. *Res. Vet. Sci.*, 33, 7-11.
- Smith-Palmer, A., Stewart, W. C., Mather, H., Greig, A., Cowden, A., Cowden, J. M., Reilly, W. J. (2003). Epidemiology of *Salmonella enterica* serovars *enteritidis* and *typhimurium* in animals and people in Scotland between 1990 and 2001. *Vet. Rec.*, 153, 517-520.