

Tavukların Kolibasillozu İçin *Escherichia coli* 01, 02 ve 078 Serotiplerinden Aşı Geliştirilmesi: Yumurtacı Tavuklar*

Osman ERGANİŞ, H. Hüseyin HADİMLİ

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Alaaddin Keykubat Kampüsü, Konya - TÜRKİYE

Hasan SOLMAZ

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 17.11.2000

Özet: *Escherichia coli* 01, 02 ve 078 serotiplerinden trivalent *E. coli* aşısı (TECA) hazırlandı ve TECA'nın bir serisi inaktif Newcastle (ND) aşısı ile kombine (ND+TECA) edildi. Deneysel olarak piliç ve tavuklarda TECA ve kombine aşının immunojenik etkinliği incelendi. Bu çalışma yetiştirme ve yumurtlama dönemleri olmak üzere 2 safhada gerçekleştirildi:

(1) On beş günlük 40 civciv 0.2 ml TECA ile enseden deri altı yolla aşılandı. Benzer bir grup aşısız kontrol grubu olarak tutuldu. Aşılı grubun yarısı 71. günde 0.5 ml TECA ile tekrar aşılandı. Aşılamalardan 30 gün sonra aşılı ve aşısız piliçler eprüve edildi.

(2) Damızlık tavuklar, 17. haftada 0,5'er ml TECA ve ND+TECA aşılı ile deri altı yolla aşılandı.

Aşılama sonrası, civciv/piliçlerden 15 gün, tavuklardan 21 gün aralıklarla kan örnekleri alındı ve *E. coli* 01, 02 ve 078 serotipleri yönünden somatik ve pilus antijenlerine karşı mikro serum aglütinasyon testi (mSAT) ve lam aglütinasyon testi (RAT) ile antikor titreleri ölçüldü. Kontrol gruplarına göre; bir ve iki kere aşılanan piliçlerde ~0,5 ve 3,6 kat daha yüksek antikor titresi bulundu. Aşılanan damızlık tavuklarda ise ~1,5 ve 4,8 kat daha yüksek antikor titreleri gözlemlendi.

E. coli 01, 02 ve 078 serotipleri ile yapılan eprüvasyon denemelerinde; TECA ile aşılanan piliçlerde koruma oranı % 77,8 iken kontrol grubunda % 46,7 idi. *E. coli* 01, 02 ve 078 serotipleri ile yapılan eprüvasyon sonrasında; TECA ve TECA+ND aşılanan ve aşısız damızlık tavukların civcivlerinde mortalite oranları sırasıyla % 8,8, % 13,3 ve % 50,3 olarak bulundu. Sonuç olarak, TECA'nın yumurtacı civcivlerde-piliçlerde koruyucu, damızlık tavuklarda hem koruyucu hem de maternal bağışıklık oluşturmak amacıyla kullanılabileceği, aynı zamanda, TECA'nın inaktif Newcastle aşısı ile kombine edilmesinin faydalı olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: *Escherichia coli* 01, 02, 078 serotipleri, aşı, tavuk

Vaccine Development from Serotypes 01, 02 and 078 of *Escherichia coli* against Avian Colibacillosis: Layer Chickens

Abstract: A trivalent *Escherichia coli* vaccine (TECA) was prepared from serotypes 01, 02 and 078 and one series of TECA was combined with an inactivated Newcastle Disease vaccine. TECA and combined vaccine were experimentally investigated for immunogenic effects in pullets and hens.

This study was carried out at two stages consisting of rearing and laying periods:

(1) A number of forty chicks aged 15 days were subcutaneously vaccinated with 0.2 ml TECA. A similar group served as non-vaccinated controls. Half of the vaccinated group were revaccinated with 0.5 ml TECA at 71 days of age. The vaccinated and nonvaccinated pullets were challenged at 30 days after vaccinations.

(2) Untreated breeder hens were vaccinated with TECA and combined vaccine by 0.5 ml, via SC route at 17 age of weeks. After vaccinations, the blood samples were taken from chicks/pullets with 15 days intervals and from the hens with 21 days intervals and then tested against 01, 02 ve 078 somatic "O" and pilus antigens by micro serum agglutination test (mSAT) and rapid agglutination test (RAT). The antibody titers in pullets vaccinated once or twice were found to be ~0.5-3.6 times higher than controls, respectively. In breeder hens, the antibody titer figures were observed ~1.5-4.8 times higher than those from nonvaccinated hens.

By challenge trials with homologous *E. coli* serotypes, the rates of protection in vaccinated and nonvaccinated pullets were found to be 77.8 and 46.7 %, respectively.

*Bu araştırma TÜBİTAK VHAG-1126 nolu projenin bir bölümüdür.

The mortality rates of the chicks from the hens which had been vaccinated with TECA and combined vaccine or not been vaccinated were as follows: % 8,8, % 13,3 and % 50,3, respectively.

In conclusion, TECA could be recommended for protection of both chicks and layers to *E. coli* infections. We also suggest that to combine inactivated *E. coli* with Newcastle vaccines could be useful.

Key Words: *Escherichia coli* O1, O2, O78 serotypes, vaccine, chicken

Giriş

Türkiye'de yapılan araştırma sonuçlarına (1,2) göre tavuk hastalıklarında primer ve/veya sekonder etken olarak en fazla karşılaşılan bakteriyel hastalıklar *E. coli*'lerin sebep olduğu / katıldığı enfeksiyonlardır (2). *E. coli* enfeksiyonlarının antibiyotiklerle tedavi imkanlarından dolayı (1,3-5) bağışıklama üzerinde yeterince durulmamaktadır. Halen, Türkiye'de kanatlı *E. coli* enfeksiyonları için aşı üretilmemektedir (6). Tavuklarda *E. coli* enfeksiyonlarının yaygınlığından dolayı çok yoğun antibiyotik kullanılarak ekonomik kayıplar ve ekolojik zararlar oluşmaktadır. Hatta bazı kolibasilloz vakalarında dirençli suşlardan (7) ötürü tedavide çaresiz kalınmaktadır. Bununla birlikte, günümüzde et ve/veya yumurtada antibiyotik kirliliğinin çok önemli boyutlara varması (8,9) yüzünden, enfeksiyonlardan korunmada, aşilar ve probiyotikler gibi biyolojik koruma ve mücadele yolları daha da önem kazanmaktadır.

Kolibasilloza karşı kanatlıların immünizasyonu için, yumurtacı civcivlerde (10-14), broylerlerde (15-18), pekin ördeği (19) ve hindilerde (20) çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu amaçla *E. coli* pilus antijenleri (12,14), canlı bakteri (11) ve inaktif bakterin (10,13,15-17,21, 22) aşiları hazırlanmıştır. *E. coli* aşiları genellikle 1-21 günlük civciv ve piliçlere (10,12-15,22) derialtı (SC), kasiçi (IM) ve intraperitoneal (IP) yolla uygulanmaktadır. *E. coli*'lerde bulunan tip-1 pilusların uzun bir süre apatojen *E. coli* pilileri/somatik pili kabul edilmesi, araştırmacıları (7,23) bakterin aşilara yöneltmiştir. Ancak, bakterin *E. coli* aşiların tavukları sadece homolog suşlara karşı koruması, bir çok araştırmacıyı (12,14,24-27) kanatlılardan izole edilen patojenik *E. coli* suşlarının antijenik yapılarının incelenmesine ve bağışıklıkta etkin olabilecek antijenik determinantların belirlenmesine sevk etmiştir.

Kanatlı kolibasillozu ve *E. coli*'lerin antijenik yapıları üzerinde çalışan araştırmacılar (7,23) daha çok *E. coli* O1, O2, O35 ve O78 serotiplerinin enfeksiyonlardan izole edildiğini bildirmektedirler. Aşı çalışmalarında genellikle O1, O2 veya O78 serotipindeki *E. coli* suşları seçilmişler,

seçilen suşlar aşı antijeni olarak ya tek başlarına veya kombine olarak kullanılmışlardır (10-12,14,16,21,22).

Türkiye'de kümes hayvanlarının *E. coli* enfeksiyonlarına karşı aşı üretilmemektedir. Yapılan literatür taramasında konu ile ilgili bir araştırmaya da rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, tavukları *E. coli* enfeksiyonlarından korumak amacıyla, ülkemizde yaygın olduğu belirlenen (1,5,28) *E. coli* O1, O2 ve O78 serotiplerinden trivalan inaktif aşı geliştirilmesi, koruma gücünün araştırılması ve ülkemizde üretilen inaktif Newcastle aşısı ile kombine edilerek her iki aşının immünojenik etkinliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Hayvan Materyali: Çalışmaya içerisinde 1/8'i horoz civciv bulunan toplam 350 adet damızlık yumurtacı (Hy-line beyaz) civciv ile başlandı. Civcivler için uygun besleme, aşılama ve bakım koşulları sağlandı.

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

Antijenlerin Hazırlanması

Tip 1 Pilus Antijeni Üretimi: *E. coli* O1, O2 ve O78 suşlarından ayrı ayrı Minca agarda 37 °C'de 8-10 saat inkübe edilerek üretilmiş taze kültürler fosfat buffer solusyonu (PBS) ile alınarak 3 kere yıkandı. Son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde etilenimin katılarak inaktive edildi ve yoğunluğu MacFarland no. 4'e göre ayarlandı.

Bu antijen hem tavşanlarda antiserum üretiminde hem de serum ve antiserumlarda tip-1 antikorlarının lam aglutinasyonu ile test (RAT) edilmesinde kullanıldı.

Somatik "O" Antijenlerinin Üretimi: *E. coli* O1, O2 ve O78 suşlarından ayrı ayrı Blood Agar Base'e ekilerek 37 °C'de 1 gece inkübasyonla üretilmiş kültürler PBS ile 3 kere yıkayıp otoklavda 121 °C'de 15 dak. tutularak inaktive edildiler. Her serotip için konsantrasyon MacFarland no. 4'e ayarlandı. Sterilite kontrolünden sonra tavşanlarda enjeksiyonlarda kullanılıncaya kadar +4C'de saklandı.

Mikro serum aglutinasyon testi (mSAT) için her serotipten 6×10^9 bakteri / ml olacak şekilde ayarlanmış ve otoklav edilmiş bakteri süspansiyonu mikro serum aglutinasyon antijeni (mSAA) hazırlandı. Sterilite kontrolünden sonra mSAT'lerinde kullanılıncaya kadar $+4$ °C'de saklandı.

Tavşanlarda Antiserumların Hazırlanması

Çalışma boyunca kullanılacak serolojik testlerdeki antijen standardizasyonu ve tavuk kan serumlarının titrasyonları için *E. coli* O1 O2 ve O78 suşlarının somatik "O" antijenlerine ve Tip 1 pilus antijenlerine karşı tavşanlar hiperimmünize edilerek antiserumlar üretildi.

a-Tip 1 Pilus Antiserumu Üretimi ve Ölçümü: Bu amaçla *E. coli* O1, O2 ve O78 suşlarından ayrı ayrı hazırlanan Tip 1 Pilus Antijeni sterilite kontrolünden sonra tavşanlara 0,2 ml'den başlayarak haftada 2 kere olmak üzere 4 hafta süreyle ve artan dozlarda intravenöz yolla enjekte edilerek hiperimmün serum elde edildi. Bu serumlar 1/5 oranında PBS ile sulandırıldıktan sonra herbiri kendinin eldesinde kullanılan serotipteki *E. coli* suşunun Minca agarda 20 °C'de üretilmiş kültürü ile ("K" ve "O" antijenleri yönünden) adsorbe edilerek pilus antiserumları hazırlandı. Antiserumlar küçük porsiyonlar halinde -20 °C 'de saklandı ve serolojik testlerde pozitif kontrol olarak kullanıldı (5).

b-Somatik "O" Antiserumlarının Üretimi ve Ölçümü: *E. coli* O1, O2 ve O78 suşlarından ayrı ayrı hazırlanan ve sterilite kontrolü yapılan somatik "O" antijenleri her serotip için 3'er adet tavşana verilerek antiserum hazırlandı. Bu amaçla tavşanlara 0,2 ml'den başlayarak haftada 2 kere olmak üzere 4 hafta süreyle ve artan dozlarda intravenöz yolla enjekte edilerek hiperimmünizasyon sağlandı. Son enjeksiyondan 10 gün sonra tavşanlardan kan alınarak serumları çıkarıldı. Somatik "O" antiserumları, küçük porsiyonlar halinde -20 °C 'de saklandı ve serolojik testlerde pozitif kontrol olarak kullanıldı. (1,5).

Mikropletyte serumun katlı dilusyonlarına (1/5, 1/10, 1/20.....) eşit miktarlarda (50'şer µl) mSAA ilave edildi. Bir gece 37 °C'de inkübe edildikten sonra aglutinasyon titreleri ölçüldü. Tavşanların herbirinin antiserum titreleri belirlendi.

Patojenite Denemeleri: *E. coli* O1, O2 ve O78 suşlarından ayrı ayrı Tryptic Soy Buyyon (TSB)'da 37 °C'de

24 saat inkübe edilerek üretilmiş taze kültürlerden (3×10^9 bakteri/ml) 7 günlük 3'er civcive intraperitoneal yolla enjekte edildi. Bir hafta süreyle gözlenerek patojeniteleri belirlendi. Daha sonra her serotip ayrı ayrı olmak üzere 10'ar civcivde 2 farklı zamanda denenerek epruvasyonda kullanılacak konsantrasyonları belirlendi.

Aşıların Hazırlanması

Trivalan *E. coli* Aşısı (TECA) : *E. coli* O1, O2 ve O78 suşları Blood Agar Base'de ayrı ayrı ekilerek, 37 °C'de 24 saat inkübe edildiler. Üreyen kültürler PBS ile toplandı ve 3 kez yıkandı. Her serotipten eşit miktarda alınarak ve son konsantrasyonu 6×10^9 bakteri/ml olarak ayarlandı. Son konsantrasyonu % 0,3 olacak şekilde formol ilave edilerek inaktive edildi. Bir kısım aşı materyali + 1 kısım mineral yağlı adjuvant* ile homojenize edilerek Trivalan *E. coli* Aşısı (TECA) hazırlandı (29).

Kombine (Newcastle + *E. coli*) Aşısı: Bir kısım yağlı adjuvantlı inaktif Newcastle aşısı ile bir kısım trivalan *E. coli* aşı antijeni çift enjektörle homojenize edilerek hazırlandı.

Aşıların Sterilite Testleri: Hazırlanan aşıların, inaktivasyon ve kontaminasyon kontrolleri kanlı agar ve Mac Conkey agarda yapıldı.

Aşıların Zararsızlık Testleri: Hazırlanan aşılar 5'er civcive ve 5'er beyaz fareye 1'er ml deri altı yolla enjekte edilerek bir hafta süreyle zararsızlık yönünden gözlemlendi.

Deneme Gruplarının Aşılması

Civciv ve Piliçlerin Aşılması: Civcivler 15 günlük yaşta iken 40 civcivlik bir grup oluşturuldu ve 0,2 ml trivalan *E. coli* aşısı ile enseden derialtı yolla aşılandı. Diğerleri kontrol olarak bırakıldı. Aşılı piliçler, 71. günde ikiye bölündü ve yarısı 2. kez 0,5 ml trivalan *E. coli* aşısı ile enseden derialtı yolla aşılandı.

Damızlık Tavukların Aşılması: On yedinci haftada aşısız tavuklardan 3 grup oluşturuldu; 1. gruba Trivalan *E. coli* aşısı, 2. gruba kombine aşı uygulandı. Üçüncü grup kontrol olarak bırakıldı.

Aşılamaların Serolojik İzlenmesi

Mikro Serum Aglutinasyon Testi (mSAT): Aşılama sonrası her 15-21 günlük dönemlerde 6-8 adet aşılı ve aşısız civciv, piliç ve tavuklardan kan alınarak serumları

* özel formülasyon

çıkartıldı. Her serumun 1/5 sulandırması tüplerde (0,2 ml serum + 0.8 ml FTS ile) yapıldı. Mikropleyitin ilk çukuru dışındakilere 50'şer µl serum fizyolojik kondu. İlk çukura serumun 1/5'lik sulandırmasından 100 µl konduktan sonra 50 µl'si alınarak 2. çukura aktarıldı. Bu işlem son çukura kadar tekrarlandı. Böylece her serumun 1/640' a kadar sulandırması yapıldı. Her serum örneğinin üzerine 50'şer mcl mSAA ilave edildikten sonra 37 °C'de bir gece inkube edildi. mSAT (22) titreleri (1/10=0, 1/20=1, 1/40=2, 1/80=3,...olarak) normal rakamlara çevrildi.

Lam Aglutinasyon Testi (LAT): Bu testle serum örneklerindeki Tip-1 pilus antikorları ölçüldü. Aglutinasyon skoru , - (0), + (1), ++ (2) , ve +++ (3) olarak değerlendirildi (5).

Hemaglutinasyon İnhibisyon Testi: Newcastle antikorları mikro hemaglutinasyon-inhibisyon testi (mHI) ile ölçüldü (30). Aşılı ve aşısız damızlık tavuklardan elde edilen civcivlerinin maternal antikor titreleri 1 ve 7. günlerde ölçüldü.

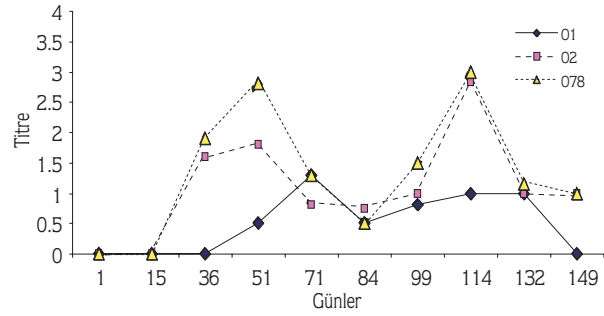
Epruvasyon Denemeleri: Aşılı ve aşısız piliçler aşılamadan 30 gün sonra ve damızlık tavukların 24. haftadan itibaren toplanan yumurtalarından kuluçka ile elde edilen 7 günlük civcivlerine *E. coli* O1, O2 ve O78 serotipleri ayrı ayrı intraperitoneal yolla enjekte edilerek epruvasyon denemeleri yapıldı. Aşılı damızlıklarda çalışmanın yeterli sayıda hayvanla sürdürülebilmesi için epruvasyon yapılmadı.

Bulgular

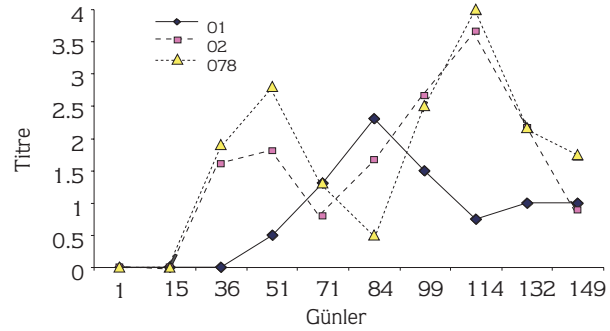
Aşı-Epruvasyon Suşlarının Patojenik Özellikleri: Civcivlerdeki patojenite testlerinde *E. coli* O78 serotipinin daha patojen olduğu belirlendi (Tablo 1).

On beş günlük yaşta 0,2 ml dozunda trivalan *E. coli* aşısı ile aşılanan gruptaki civcivlerde aşının oluşturduğu antikor titrelerinin geometrik ortalamaları Şekil 1'de verilmiştir. Yüksek titreli antikorlar yönünden aşılamadan sonrası; O1 için 3. örneklemede (56. gün), O2 ve O78 için

36. günde ulaşıırken, bu sürelerden sonraki dönemlerde titrelerde düşüş ve yine 1'er aylık dönemler sonrasında ortalama aynı titrelerle çıkışla karşılaştırıldı (Şekil 1). Aşılı gruplardaki civcivlerin yarısına 71. günde 2. kez aşı (0,5 ml) uygulamasını takiben *E. coli* O1, O2 ve O78 serotiplerine karşı antikor titrelerinde belirgin seviyelerde yükseliş görüldü (Şekil 2).



Şekil 1. Trivalan *E. coli* Aşısı ile 1 Kez Aşılı Piliçlerin Antikor Titreleleri.



Şekil 2. Trivalan *E. coli* Aşısı ile 2 Kere Aşılı Piliçlerin Antikor Titreleleri.

Aşılamadan 30 gün sonra yapılan epruvasyon sonucunda aşı grubundaki piliçlerin % 22,2'si ölüerken, kontrol grubunun % 53,3'ü öldü. Daha patojen olan O78 serotipi, aşısız piliçlerin % 90'ını öldürürken, aşılı piliçlerin sadece % 37,5'ini öldürebilmiştir (Tablo 2).

Yumurtlama döneminde damızlık tavuklarda; aşı uygulamasından sonraki 5. haftadan başlayarak yapılan ve ortalama 4 hafta aralıklarla alınan 8 örnekleme

Patojenite	<i>E. coli</i> serotipi		
Patojenite testi için uygun bulunan bakteri sayısı	O1 (5x10 ⁹ bakteri/ml)	O2 (1x10 ¹¹ bakteri/ml)	O78 (3x10 ⁸ bakteri/ml)*
Ölen / test edilen	4/9	3/10	7/10

*IP yolla enjekte edilen bakteri sayısı

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

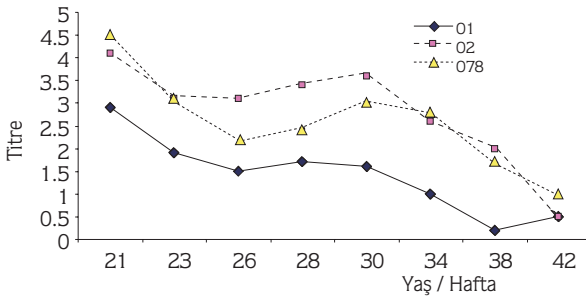
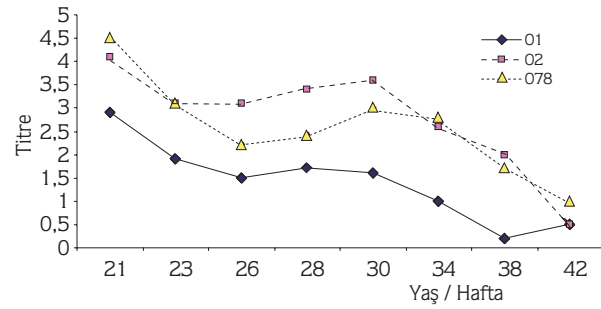
Grup	O1 (5×10^{10} bak/ml)	O2 (1×10^{10} bak/ml)	O78 (4.2×10^{10} bak/ml)*	Genel
Aşı	1/5	0/5	3/8	4/18
Kontrol	4/10	3/10	9/10	16/30**

Tablo 2. Trivalan *E. coli* Aşısı ile Aşılanmış Piliçlerde Epruvasyon Sonuçları.

* Epruvasyon için IP yolla enjekte edilen bakteri sayısı,

** Ölen/Test edilen sayısı

sonucunda; Trivalan *E. coli* aşısı grubunda, antikor titreleri sırasıyla; O1 serotipi için 3,6, 3,3, 1,9, 2,0, 1,2, 1,0, 1,0 ve 1,3; O2 serotipi için 4,2, 4,3, 3,5, 3,2, 3,2, 2,4, 2,1 ve 1,0; O78 serotipi için 4,8, 4,2, 2,8, 3,3, 2,9, 2,8, 2,1 ve 1,5 olarak bulundu (Şekil 3). Kombine aşısı grubunda, antikor titreleri sırasıyla; O1 serotipi için 2,9, 1,9, 1,5, 1,7, 1,6, 1,0, 0,2 ve 0,5; O2 serotipi için 4,1, 3,1, 3,1, 3,4, 3,6, 2,6, 2,0 ve 0,5; O78 serotipi için ise 4,5, 3,1, 2,2, 2,4, 3,0, 2,8, 1,7 ve 1,0 olarak bulundu (Şekil 4). Kontrol grubu tavuklarda örneklem dönemlerinde *E. coli* O1, O2 ve O78 serotiplerine karşı oluşan antikor titreleri genellikle 0 – 0,2 arasında idi.

Şekil 3. Trivalan *E. coli* Aşısı ile Aşılanmış Tavuklardaki Antikor Titreleri.

Şekil 4. Kombine (TECA+ND) Aşısı ile Aşılanmış Tavuklardaki Antikor Titreleri.

Tablo 3. TECA ve Kombine Aşılı Tavuklarda *E. coli* O1, O2 ve O78 Serotiplerine Karşı RAT ile Pilus Antikorlarının Durumu (*).

Tavuk Yaşı ...Hafta	O1		O2		O78	
	Trivalan	Kombine	Trivalan	Kombine	Trivalan	Kombine
21	**4/5 (4)	3/5 (4)	4/5 (4)	2/5 (2)	2/5 (2)	2/5 (3)
23	3/5 (4)	4/5 (5)	4/5 (9)	5/5 (8)	5/5 (9)	5/5 (9)
26	4/5 (4)	3/5 (5)	4/5 (5)	5/5 (6)	5/5 (9)	5/5 (14)
28	4/5 (5)	3/5 (5)	4/5 (5)	5/5 (7)	4/5 (8)	5/5 (10)
30	4/5 (6)	5/5 (8)	4/5 (5)	5/5 (10)	5/5 (14)	5/5 (9)
34	3/5 (3)	3/5 (3)	4/5 (7)	5/5 (7)	4/5 (4)	5/5 (11)***

* Kontrol grubunda çoğu örnekte 0/5 idi.

** Pozitif/ test edilen serum sayısı. Test skoruna bakılmaksızın 5 serumda kaçının aglutinasyon verdiği.

*** 5 serumdaki aglutinasyon skorları toplamı (Aglütinasyon skorları 1+, 2+ ve 3+ olarak değerlendirildi. Pilus antikorları yönünden yapılan lam aglutinasyon testinde 5 serumun 5'inde +++ vermişse (15) skoru ile değerlendirildi)

Tablo 4. Aşılanmış Tavukların 1 Günlük Civcivlerinde mSAT ile Maternal Antikor Titreleri.

Civcivlerin Anaçlarının Yaşı (Hafta)	O1		O2		O78	
	Trivalan	Kombine	Trivalan	Kombine	Trivalan	Kombine
27	1,29±0,18	0,86±0,28	1,14±0,26	1,00±0,37	1,43±0,42	1,29±0,28
31	0,15±0,24	0,71±0,36	1,29±0,36	1,43±0,36	1,00±0,26	0,71±0,45
34	0,80±0,40	0,66±0,30	1,16±0,30	1,16±0,30	0,83±0,47	1,00±0,30
37	1,00±0,26	0,83±0,40	0,71±0,36	0,83±0,40	0,86±0,40	1,17±0,25
40	0,28±0,20	1,00±0,25	0,28±0,18	0,33±0,21	0,43±0,21	1,16±0,30

* Kontrol grubundaki civcivlerde antikor titreleri çok düşük olduğundan değerleri alınmadı

Tablo 5. Aşılanmış Tavukların 7 Günlük Civcivlerindeki Maternal Antikor Titreleri.

Damızlık Yaşı ...hafta	O1		O2		O78	
	Trivalan X+-SD	Kombine X+-SD	Trivalan X+-SD	Kombine X+-SD	Trivalan X+-SD	Kombine X+-SD
27	0±0,00	0,29±0,18	0,57±0,22	0,71±0,28	0,14±0,14	0,29±0,29
31	0±0,00	0±0,00	0,38±0,18	0,83±0,31	0,63±0,31	0,83±0,47
34	0±0,00	0,57±0,20	0,33±0,33	0,43±0,20	0,33±0,21	0,40±0,20
37	0,14±0,14	0,71±0,36	0,28±0,20	0,43±0,20	0,57±0,29	0,20±0,14
40	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0,33±0,21	0,33±0,21

Farklı zamanlarda kuluçka edilerek elde edilen aşı (TECA ve Kombine Aşı grupları) ve aşısız tavukların civcivlerinin eprüvasyon sonuçları karşılaştırıldığında; O1 serotipi ile eprüvasyonda, aşı 60 civcivin 5'i (% 8,3) ölürken, aşısız 24 civcivin 10'u (% 41,6); O2 serotipi ile eprüvasyonda, aşı 60 civcivin 5'i (% 8,3) ölürken, aşısız

18 civcivin 8'i (% 44,4); O78 serotipi ile eprüvasyonda, aşı 60 civcivin 9'u (% 15) ölürken, aşısız 18 civcivin 14'ü (% 77,7) ölmüştür (Tablo 6). Genel olarak aşı 180 civcivin 19'u (% 10,5) ölürken, aşısız 60 civcivin 32'si (% 50,3) ölmüştür.

Tablo 6. Aşı 180 Tavukların 7 Günlük Civcivlerindeki Eprüvasyon Sonuçları.

Damızlık Yaşı (hafta)	Eprüve edilen E.coli serotipleri, bakteri sayıları ve gruplarda ölen/test edilen civciv miktarı								
	O1 (1.6-3.2x10 ⁹ bakteri/ml)			O2 (0.5-1.2x10 ¹¹ bakteri/ml)			O78 (1.2-3.0x10 ⁷ bakteri/ml)		
	Trivalan	Kombine	Kontrol	Trivalan	Kombine	Kontrol	Trivalan	Kombine	Kontrol
31	0/10	1/10	5/8	0/10	0/10	2/6	1/10	2/10	6/6*
33	1/10	1/10	2/10	1/10	1/10	4/6	2/10	2/10	4/6
37	1/10	1/10	3/6	1/10	2/10	2/6	3/10	2/10	4/6
Genel	2/30	3/30	10/24	2/30	3/30	8/18	3/30	6/30	14/18

*Ölen / Test edilen civciv sayıları

Tablo 7. Kombine Aşılı Tavuklardaki Newcastle Antikor Titreleleri (log2...).

Hafta yaşı	20	21	24	26	29	31	33	37	41
HI (2log..)	7, 8±0,23	10,6±0,31	11,1±0,28	11,1±0,28	10,8±0,30	10,4±0,27	10,0±0,26	9,8±0,25	9,0±0,26

İnaktif Newcastle aşısının trivalan *E. coli* aşısı antijeni ile kombine hale getirilmesinin, çalışma boyunca tavukların Newcastle hastalığına karşı koruyucu seviyede antikor titrelerinin belirlenmesi ile aşının koruyuculuğunu etkilemediği görüldü (Tablo 7).

Tartışma

Tavukçuluk sektörünün en önemli bakteriyel hastalığı *E. coli*'lerin sebep oldukları kolibasiloz'dur (1,2). Enfeksiyon, genellikle bir çok hastalıkla birlikte de seyrettiğinden, tavuk işletmelerinde korunma ve tedavi amacıyla yoğun antibiyotik kullanımına sebep olmaktadır (2).

E. coli O1, O2 ve O78 serotiplerindeki suşların piluslarının değişik moleküler ağırlıklarda olduğu, *E. coli* O78 serotipinde tip-1 pilusların *E. coli* O1 ve O2 serotiplerinden antijenik olarak farklı olduğu, bununla birlikte, *E. coli* O1 ve O2 serotiplerinde ortak epitopların varlığı bildirilmektedir (31). Ayrıca, Türkiye'de septisemili tavuklarda kolibasilozu sebep olan *E. coli*'lerde tip-1 A ve tip 1-like pilusların yanısıra (5), K99 ve F 41 piluslarının da varlığı (28) rapor edilmiştir.

Deb ve Harry (10), kolibasilozda bağışıklığın "O ve K" aglutininler ile ilgili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Melamed ve ark (17) O2:K1 ile O78:K80 serotiplerinden hazırlanan *E. coli* polivalan aşısının, O2 ve O78 serotipleri için yeterli koruma sağlamasını, O2 serotipinin heterolog eprüvasyona karşı koruma sağlarken, O78 serotipinin heterolog eprüvasyona karşı korumadığını, bu durumu O2 serotipindeki suşun O78 serotipinden daha fazla *E. coli*'nin antijenik özelliklerini oluşturan determinantlara sahip olması ile açıklamaktadır. *E. coli* O78:K80 serotipinden hazırlanan inaktif aşı ile aşılanan 2-3 haftalık piliçlerde homolog suşa karşı koruma elde edildiği bildirilmektedir (10). Aynı şekilde, *E. coli* O1 serotipinden hazırlanan bakterin (13) ve pilus (12) aşıları ile aşılanan 4 haftalık yumurtacı piliçlerde, eprüvasyon denemelerinde O1 serotipine karşı bir koruma sağlanırken, O2 ve O78 serotiplerine karşı yeterli bir koruma sağlanmadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, *E. coli* O1, O2 ve O78

serotiplerinden hazırlanan trivalan pilus aşısının 4 haftalık piliçleri patojen *E. coli* suşları ile eprüvasyona karşı koruduğu, aşılanmamış piliçlerde ise % 8-26 oranında ölüm olduğunu rapor edilmiştir (14). Patojenite ve eprüvasyon denemelerinde kullanılan *E. coli* suşları arasında O78 serotipindeki suşun daha patojen bulunması Rosenberger ve ark (22)'in çalışmalarını doğrulamaktadır.

Bu çalışmada, yumurtacı piliçlerde, aşılamadan 30 gün sonra yapılan eprüvasyon sonucunda TECA grubunun % 22'si ölüirken, kontrol grubunda % 53,3'ünün öldüğü belirlendi. Daha patojen olan O78 serotipi aşısız piliçlerin % 90'ını öldürürken aşılı piliçlerden % 37,5'ini öldürebilmiştir. Doğal *E. coli* enfeksiyonlarında bu kadar yoğun bakteri ile karşılaşma şansının az olacağı düşünüldüğünde, damızlıklarda aşının kullanılmasının civcivlerin ilk hafta ölümlerinin önlenmesinde etkili olmasıyla açıklanabilir. Böylelikle sektörde, daha ilk günden başlayan antibiyotik kullanımı azalacağından, daha dengeli bağırsak florası oluşumu ile yemden yararlanma artabilecek ve daha sağlıklı tavuk ve tavuk ürünleri yetiştirilebilecektir.

On günlükten küçük civcivlerin immün sistemleri *E. coli* antijenlerine karşı immün cevap oluşturmadıkları (15), onbeşinci günden sonra da intratracheal yoldan invaze olabilen *E. coli* suşlarına karşı zamanla artan doğal bir direnç gelişmeye başladığı bildirilmektedir (18). Bu nedenle, civcivlerin kolibasilozu duyarlı oldukları ilk haftalarda *E. coli*'lerden korunmalarında maternal antikorların önemi fazladır (15). Heller ve ark (15), Freund'un komple adjuvantı ile hazırlanmış *E. coli* aşısının parentlerde 160. güne kadar yüksek titrede antikor oluşumunu sağladığını, bu yüzden, maternal antikorlara sahip civcivlerin ilk birkaç hafta kolibasilozdan korunabileceklerini belirtmektedirler. Rosenberger ve ark (22) *E. coli* O2, O78 ve O35 suşlarından ibaret yağlı adjuvantlı trivalan bakterin aşısı ile 20 haftalık broyler damızlıkları 2 kez (20. ve 25. haftalarda) aşılamışlardır. Araştırmacılar, maternal antikorların civcivleri 15. güne kadar koruduğunu, aşısız damızlıkların 1 günlük civcivlerin %80'inde ölüm şekillendiğini, 1 kez aşılı

damızlıkların civcivlerinde ise % 37,5 oranında ölüm görüldüğünü bildirmişlerdir. Melamed ve ark (17), 10. günde aşılanan broyler civcivlerin eprüvasyondan % 77-85'inin korunduğunu, aşısız civcivlerde ise % 60-80'inde lezyon ve/veya ölüm şekillendiğini bildirmektedirler. Bu çalışmada, kontrol grubuna göre aşıli damızlıklarda yaklaşık 20 hafta süre ile yüksek titrelerde antikor tespit edilmiş ve 24. haftadan itibaren kuluçka edilerek elde edilen civcivlerde düşük titrelerde de olsa maternal antikorlar belirlenmiştir. Bu veriler, Heller ve ark (15)'inin bulgularını doğrular niteliktedir. Bu çalışmada, maternal antikorların geçiş oranları, inaktif viral aşılarla (Newcastle, Gumboro) göre düşük olmakla beraber, aşıli damızlık tavukların 7 günlük civcivlerinin % 89,5'inin eprüvasyondan korunması, Rosenberger ve ark (22)'nin aşıli ve aşısız civcivlerden elde ettikleri sonuçlardan daha iyi olduğunu gösterir.

Hem somatik (Şekil 1-4) hem de pilus (Tablo 3) antijenlerine karşı oluşan antikorlar yönünden bakıldığında, diğer serotiplere oranla O78 serotipinin daha iyi antijenite gösterdiği ve daha yüksek titrelerde antikor oluşturduğu tespit edilmiştir (Tablo 3) .

Kaynaklar

1. Baysal, T., Erganiş, O., Güler, L.: Konya bölgesindeki kanatlılardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının bazı biyokimyasal ve serolojik özellikleri ile antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi. Veterinarium, 1990; 2 (1): 8-14.
2. Demirözü, K., Ergün, A., Akman, A.: Son 10 yılda Türkiye'de saptanan tavuk hastalıkları. I. Uluslararası Tavukçuluk ve Tavuk Hastalıkları Sempozyumu Tebliğleri, 3-5 Ekim 1988, Manisa, 94-98.
3. Erganiş, O.: Tavuk Hastalıkları Ders Notları. S. Ü. Veteriner Fakültesi, Konya, 1988.
4. Erganiş, O.: Hindilerin fekal florasından izole edilen *Escherichia coli* suşlarının bazı patojenite özellikleri üzerinde incelemeler. Veterinarium, 1991; 2 (3-4): 2-12.
5. Erganiş, O., Orhan, G., Kaya, O., Uçan, S., Kuyucuoğlu, Y.: Kolibasilozlu tavuklardan izole edilen *Escherichia coli*'lerde Tip 1 Pilus tiplendirilmesi. Veterinarium, 1992; 3 (2): 7-12.
6. Erganiş, O., Zöğ, M.Z.: Bir kombine aşı önerisi: İnaktif Newcastle+*Escherichia coli*. II. Uluslararası Tavukçuluk ve Tavuk Hastalıkları Sempozyumu, 20-21 Eylül 1990, Manisa.
7. Cloud, S.S., Rosenberger, J.K., Fries, P.A., Wilson, R. A., Odor, E.M.: In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. I. Serotypes, metabolic activity and antibiotic sensitivity. Avian Dis., 1985; 29: 1084-1093.
8. Acet, A., Ateş, M., Erganiş, O.: Hayvansal dokularda antibiyotik kalıntılarının agar diffüzyon tekniği ile tayini. S. Ü. Vet. Fak. Derg., 1987; 3: 197-205.
9. Abdel-Nasser, M., Acet, A., Erganiş, O., Tıraş, B.: A disk assay for the detection of chloromphenicol residues in eggs. Assuit Vet. Med. J., 1990; 24 (47): 201-207.
10. Deb, J.R., Harry, E.G.: Laboratory trials with inactivated vaccines against *Escherichia coli* (O78:K80) infection in fowls. Res. Vet. Sci., 1976; 20: 131-138.
11. Frommer, A., Book, R.R., Heller, E.D., Freidlin, P.J., Drabkin, N., Samberg, A.: Experimental vaccination of young chicks with a nonpathogenic strain of *Escherichia coli*, IXth Int. Congr., World Vet. Poultry Association, 13-17 August 1989, Brighton-Great Britain.
12. Gyimah, J.E., Panigrahy, B.: Immunogenicity of an *Escherichia coli* (serotype O1) pili vaccine in chickens. Avian Dis. 1985; 29 (4): 1078-1083.
13. Gyimah, J.E., Panigrahy, B., Hall, C.F., Williams, D.J.: Immunogenicity of an oil emulsified *Escherichia coli* bacterin against heterologous challenge. Avian Dis. 1984; 29 (2): 540-545.
14. Gyimah, J.E., Panigrahy, B., Williams, D.J.: Immunogenicity of an *Escherichia coli* multivalent pilus vaccine in chickens. Avian Dis., 1986; 30 (4): 687-689.

Sonuç olarak, *E. coli* aşısının inaktif bir bakteriyel aşı olmakla birlikte (serotipi ve antijenik varyantları az olan virus aşıları kadar koruma sağlayamayacağı göz ardı edilmemeli), doğada özellikle de kanatlıların kümes ortamlarında ve bağırsak floralarında kommensal olarak bulunmaları, yol açtığı verim (% 15-20) ve ölüm (~% 20) kayıplarının tek başına sebep oldukları zararların yanısıra sekonder olarak katıldıkları CRD kompleks ve viral enfeksiyonlarda, *M. gallisepticum* ve viral etkenlerin daha fazla zarar vermesi, bu enfeksiyonla mücadelede yoğun olarak kullanılan antibiyotiklerin ithali ile önemli miktarda ekonomik kaybın olması ve halk sağlığı açısından antibiyotikli et ve yumurta kullanımı gibi zararlar göz önüne alındığında *E. coli* aşısının yoğun olarak üretilmesi ve kullanımının yaygınlaştırılmasının önemli olacağı muhakkaktır.

Teşekkür

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

15. Heller, E.D., Leitner, G., Drabkin, N., Melamed, D.: Passive immunisation of chicks against *Escherichia coli*. Avian Pathol., 1990; 19: 345-354.
16. Heller, E.D., Leitner, G., Freidman, A., Uni, Z., Gutman, M., Cahaner, A.: Immunological parameters in meat-type chicken lines divergently selected by antibody response to *Escherichia coli* vaccination. Vet. Immun. Immunopathol., 1992; 34: 159-172.
17. Melamed, D., Leitner, G., Heller, E.D.: A vaccine against avian colibacillosis based on ultrasonic inactivation of *Escherichia coli*. Avian Dis., 1991; 35: 17-22.
18. Rosenberger, J.K., Fries, P.A., Cloud, S.S., Wilson, R.A.: In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. II. Factors associated with pathogenicity. Avian Dis., 1985; 29: 1094-1107.
19. Sandhu, T.S., Layton, H.W.: Laboratory and field trials with formalin inactivated *Escherichia coli* (O78)-Pasteurella anatipestifer bacterin in white Pekin Ducks. Avian Dis., 1985; 29 (1): 128-135.
20. Trampel, D.W., Griffith, R.W.: Efficacy of aluminium hydroxide-adjuvanted *Escherichia coli* bacterin in turkey poults. Avian Dis., 1997; 41: 263-268.
21. Panigrahy, B., Gyimah, J.E., Hall, C.F., Williams, D.J.: Immunogenic potency of an oil-emulsified *Escherichia coli* bacterin. Avian Dis., 1984; 28 (2): 475-481.
22. Rosenberger, J.K., Fries, P.A., Cloud, S.S.: In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. III. Immunisation. Avian Dis., 1985; 29: 1108-1117.
23. Gross, W.B.: Colibacillosis. In: Disease of Poultry. 8th Ed. (Edited by Hofstad et al.), Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 1988.
24. Dhomoulin, M., Bosch van den, J.F., Girardeau, J.P., Bree, A., Barat, T., Lafont, H.: Surface antigens from *Escherichia coli* O2 and O78 strains of avian origin. Infect. Immun., 1990; 58: 740-745.
25. Erganiş, O., Kaya, O., Çorlu, M., İstanbulluoğlu, E.: Hemagglutination, hydrophobicity, enterotoxigenicity and drug-resistance characteristics of avian *Escherichia coli*. Avian Dis., 1989; 33: 631-635.
26. Nagaraja, K.V., Emerey, D.A., Newman, J.A., Pomeroy, B.S.: Identification and isolation of somatic pili from pathogenic *Escherichia coli* O2 and O78 strains of avian origin. Infect. Immun., 1983; 58: 740-745.
27. Suwanichkul, A., Panigrahy, B.: Biological and immunological characterisation of *Escherichia coli* serotypes O1, O2, and O78 pathogenic to poultry. Avian Dis., 1986; 30: 781-787.
28. Aksın, M.: İshalli buzağular ve septisemili tavuklardan izole edilen *Escherichia coli*'lerin adhezinleri (K99, K88, F41, 987 P ve tip 1 fimbria) ve enterotoksinleri (STa ve VT) üzerinde çalışmalar. (Doktora Tezi), S. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 1994.
29. Vanselov, B.A.: The application of adjuvants to veterinary medicine. Vet. Bull., 1987; 57: 881-896.
30. Erganiş, O., İstanbulluoğlu, E.: İmmünoloji. Mimoza Basım Yayıncılık ve Dağıtım A.Ş. Yay. No 14. Kuzucular Ofset, Konya, 1993.
31. Suwanichkul, A., Panigrahy, B.: Diversity of pilus subunits of *Escherichia coli* isolated from avian species. Avian Dis., 1988; 32: 822-825.