

A.Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüsü

Prof. Dr. Mustafa Arda

## TAVŞANLARDAN İZOLE EDİLEN PASTEURELLA MULTOCİDA SUŞLARININ SEROTİPLERİ VE ETKİLİ BİR AŞI HAZIRLANMASI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR\*

Nejat Aydın\*\*

**Recherches sur les types sérologiques des souches de Pasteurella multocida isolées chez le lapin et sur la préparation d'un vaccin efficace contre la pasteurellose de lapins**

**Résumé:** Dans notre laboratoire, nous avons examiné 137 matières obtenues de lapins malades dont 24 souches de Pasteurella multocida isolées et identifiées. Nous avons utilisé le test hémagglutination passive à la détermination des sérotypes pour l'identification sérologiques des souches isolées. A l'aide de ce test, nous avons observé sur 24 souches de Pasteurella multocida que 20 parmi elles étaient sérotypes-A, 2 sérotypes-D et 2 autres non typables. A la réalisation de ce test, on a utilisé des immun-sérums types spécifiques préparés des lapins. Les préparations des hématies sensibilisées ont été réalisées par l'adsorption à l'aide des antigènes spécifiques capsulaires préparés par chacune des souches isolées. Aux expériences des vaccinations, on a utilisé des vaccins au formaldéhyde, à l'hydroxide d'aluminium, à la bentonite et à la saponine. Dans les sérums prélevés à un mois d'intervalle des lapins vaccinés, nous avons constaté un titre d'anticorps suffisant par le test d'agglutination rapide et d'hémagglutination passive. A la suite des 4 mois, les lapins vaccinés ont été éprouvés, et ainsi on a constaté que ceux qui étaient vaccinés par le vaccin à l'hydroxide d'aluminium et à la bentonite présentaient une immunité satisfaisante (100 p. 100).

\* Doçentlik tezinden özetlenmiştir.

\*\* Doç. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüsü. Ankara/Türkiye

**Özet:** Hastalıklı tavşanlardan sağlanan 137 materyalin laboratuvarımızda yapılan bakteriyolojik muayene sonucu 24 *P. multocida* suşunun izolasyon ve identifikasyonu yapılmıştır. İzole edilen suşların serolojik identifikasyonu için serotiplerin tayin edilmesinde passif hemagglutinasyon testi kullanılmıştır.

Bu test ile 24 *P. multocida* suşundan 20 sinin serotip-A, 2 sinin ise serotip-D olduğu saptanmıştır. 2 suş ise bu me'odla tiplendirilememiştir. Testin yapılışında tavşanlarda hazırlanmış tip spesifik immün serumlar kullanılmış ve sensibilize eritrositler, izole suşların her birinden hazırlanan spesifik kapsüller antijenler ile adsorbe edilerek hazırlanmıştır. Aşı denemelerinde formüllü, alüminyum hidroksitli, saponinli ve bentonitli aşular kullanılmış ve tavşanlardan birer ay ara ile alınan kan serumlarından çabuk lâm agglutinasyonu ve passif hemagglutinasyonla antikor seviyeleri tespit edilmiştir. Aşılı tavşanlar 4 ay sonra eprüve edilmişler ve bentonitli aşı ile alüminyum hidroksitli aşuların tavşanlarda % 100 bir bağışıklık sağladıkları saptanmıştır.

## Giriş

*Pasteurella multocida*'nın tavuk, sığır, koyun, manda, tavşan ve diğ er hayvanlarda Pasteurellosis'e neden olduğu literatür kayıtlarından anlaşılmakta ve hastalığın hemen hemen dünyanın her yerinde görüldüğü bildirilmektedir (4, 5, 6, 22, 29, 30, 46).

Tavşan Pasteurellosis'inin diğ er hayvanlarda olduğu gibi ağır bir şekilde seyretmesi nedeniyle ekonomik kayıplara yol açan ölümler olmakta ve hastalığın tedavisinde çoğu zaman başarı sağlanamamaktadır. Bu bakımdan hastalıkla savaştan ziyade korunmayı amaçlayan çalışmalara önem verilmiştir.

*P. multocida* çeşitli hayvan nevillerinden izole ve identifiye edilmiştir. FLATT ve DUNGWORTH (18), mezbahada kasaplık olarak kesilen tavşanların pnömonik lezyonlarından *P. multocida* izole ettiklerini ve tavşanların enzootik pnömonisini oluşturan başlıca etkenin bu mikroorganizma olduğunu belirtmişlerdir. FLATT (16), Pasteurellosis'in tavşanlarda pnömoni, otitis media, konjonktivit, testis enfeksiyonu, burun çekme, pyometra ve subkutan apseler şeklinde görüldüğünü ve deneysel olarak ta enfeksiyonun oluşturulduğunu bildirmiştir. GREY ve THOMSON (21), trachea boşluğundan alınan nümunelerden *Pasteurella* grubuna dahil bakteriler izole ettiklerini belirtmişlerdir. PALIARGUES (40), tavşanların enzootik pnömonisinden sorumlu ajanın *P. multocida* olduğunu, pnömoni

olaylarından *P. multocida* yanında koliform bakteriler, Streptokok, Stafilokoklar ve *Alcaligenes bronchiseptica* izole edildiğini ve bunların patojen olmadıklarını belirtmiştir. Araştırmacı, Pasteurellosis'e tavşan, tavuk ve mandaların özellikle duyarlı olduklarını ve hastalığın tavşanlarda perakut, akut, ve subakut olarak seyrettiğini bildirmiştir. FLATT ve DUNGWORTH (17), mezbahada kesilen tavşanların % 20 sinde makroskopik olarak enzootik pnömoni tespit edildiğini ve histopatolojik bakışında akciğer üzerinde küçük grimsi nodüller bulunduğunu bildirmişlerdir. LANGENEGGER ve arkadaşları (26), tavşanların nazal turbinatları, akciğer ve diğer organlarından *P. multocida*'yı izole etmişlerdir.

Çeşitli hayvan nev'ilerinden izole edilen *P. multocida* suşlarının serotiplendirilmesinde bir çok serolojik ve immunolojik metoddan yararlanılmaktadır (8, 13, 15, 24, 33, 36, 47, 48, 49, 50). LITTLE ve LYON (28), hemolitik olmayan 30 Pasteurella suşunun 3 farklı grupta toplanabileceğini, bu suşların tip spesifikliğinin virulans ve konakçı orijinleri ile ilişkili olmadığını, serotiplendirmede çabuk lām agglutinasyonun kullanıldığını ve üç ayrı serotipten hazırlanan immun serumların fareleri virulant suşlara karşı koruduğunu bildirmişlerdir. DORSEY (15), çabuk agglutinasyon testini kullanarak immunize olma özellikleriyle biyoşimik gruplandırma arasındaki ilişkilerin incelenebileceğini belirtmiştir. CARTER (8), *P. multocida* serotiplerinin tayininde hemagglutinasyon testini bildirerek bu tekniğin çok yüksek spesifik reaksiyon verdiğini, diğer tiplendirme metodlarından daha avantajlı olduğunu ileri sürmüştür. Araştırmacı, spesifik kapsüler antijenin fizyolojik tuzlu su içinde ekstraktı yapıldıktan sonra hyaluronidazla muamele edildiğini ve daha sonra insan tipi "O" eritrositleri üzerine adsorbe edildiğini bildirmiştir. Bu işlenmiş hücrelerin uygun dilusyonlarda tip spesifik serumlarla reaksiyona sokulmasından sonra eritrositlerin çökmesinin pozitif olarak değerlendirildiğini ve denemeye sokulan *P. multocida* suşlarının A, B, C, D olarak tiplendirildiğini göstermiştir. PERREAU (41), *P. multocida*'nın tip tayininde passif hemagglutinasyon testinin olumlu sonuçlar verdiğini, CARTER'in testte kullandığı "O" grubu insan eritrositi yerine bazı hayvan eritrositlerinin de kullanılabilirliğini bildirmiştir. NAMİOKA ve BRUNER (36), NAMİOKA ve MURATA (37), somatik O antijenlerinin tiplendirilmesinde HCI ile muamele edilmiş antijen kullanarak agglutinasyon testini uygulamışlar ve passif hemagglutinasyonla tespit ettikleri kapsüler antijenlerle somatik antijen arasındaki ilişkileri incelemişlerdir. Araştırmacı

cılar somatik antijenleri rakamla ifade ederek grup adı altında ifade etmek suretiyle, 5:A, 8:A ve 9:A olan serotiplerin tavuk kolelerasından sorumlu olduklarını, 1:A, 3:A, 1:D, 2:D serotiplerinin domuz ve koyun pnömonisinden izole edildiğini ortaya koymuşlardır. CARTER (11), grup ve tip antijen bakımından önemi olmayan C tipinin terkedilmesini bildirmiştir. PALIARGUES (40), tavşanlardan izole ettikleri 26 P. multocida suşunu passif hemagglutinasyon testini kullanmak suretiyle tiplendirmiş ve bunlardan 14 ünün A tipi, 1 inin D tipi, 3 ünün A tipiyle birlikte zayıf olarak D tipi ve 8 inin tiplendirilemediğini bildirmiştir. PERREAU ve arkadaşları (45), Fransa'da tavşan ve tavuklardan izole ettikleri P. multocida'nın passif hemagglutinasyon ile serotiplendirilmesini yapmışlar ve 23 tavşan suşundan 21 inin Tip-A, 2 sinin Tip-D olduğunu, 7 tavuk suşundan 7 sinin de Tip-A olduğunu bildirmişlerdir. HENNING (25), Carter tekniğine göre indirekt hemagglutinasyon testi uygulayarak tavşan, kobay ve domuzlardan izole edilen P. multocida suşlarının Tip-D olduğunu, sığır ve danalardan izole edilen suşların ise Tip-B, D ve E olarak tespit edildiğini bildirmiştir. SATO ve arkadaşları (52), tavşanlardan izole ettikleri 7 suşu biyoşimik özellikleri yanında serolojik olarak tiplendirerek bunların serotip 1:A olduğunu bildirmişlerdir. HAGEN (23), evcil tavşanlardan izole ettiği P. multocida suşlarının agglutinasyon testi uygulayarak B ve C tipi somatik antijene sahip olduklarını bildirmiştir. NAMİOKA (32), kapsül antijenlerine göre P. multocida'nın 4 ana grup içinde (A, B, D, E) sınıflandığını ve kendi izole ettiği 130 suşun değerlendirmesini yaparak O ve K antijenlerine göre 18 serotipe ayırdıklarını belirterek tavşanlarda A ve D tipini tespit ettiğini bildirmiştir. CARTER (9, 12), Tip-A'nın mukoid olduğunu ve testiculer hyaluronidazla muamele edilmesiyle suşların agglutine olma özelliğini kazandığını bildirmiştir. NAMİOKA ve MURATA (34, 35), ile MURATA ve arkadaşları (31), dünyanın değişik yörelerinden izole edilen P. multocida suşlarının agglutinasyonla somatik O antijen analizlerini yapmışlar ve antijenleri N HCI ile muamele ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda O antijenlerinin etyolojik önemini de belirtmişlerdir. CARTER (14), Tip-A suşlarının identifikasyonunda stafilokokkal hyaluronidazın kullanılmasını önermiştir. REBERS ve HEDDLESTON (51), Westpal metoduna göre hazırlanan lipopolisakkarit ve serbest endotoksinin özelliklerini incelemişler ve bunların serolojik yönden kapsülsüz ve avirulant suşlarda dahi aktif olduğunu fakat serbest endotoksinin immunojenik özelliğinin daha fazla oldu-

ğunu göstermişlerdir. PERREAU (42), gerek serolojik testlerin gerekse fare koruma testinin uygulanmasında kullanılan immün serumların hazırlanışında tavşan, koyun ve keçilerden yararlanılabileceğini ve immunizasyon için seçilen hayvanların kanlarında tabii antikorların bulunabileceğini, monospesifik serumların heterolog suşlarla kros reaksiyonlar gösterebileceğini bildirmiştir. Araştırmacı, ayrıca epruvasyon için % 100 letal dozun veya  $DL_{50}$  nin tespit edilmesi lüzumunu belirterek A ve D tiplerinde fareler için letal dozun 0,1 cc.  $\times 10^{-6}$  veya  $10^{-7}$  B ve E tiplerinde fareler için letal dozun ise 0,1 cc.  $\times 10^{-9}$  olduğunu bildirmiştir.

BAİN (2, 3), Tayland'da hemorajik septisemi görülen mandalarda doğal olarak kazanılmış bağışıklığın basit agglutinasyon testi ile tespit edildiğini bildirmiştir. PERREAU (43), genç sığırların immunizasyonu üzerinde durarak passif hemagglutinasyonla muayene ettiği 108 dana serumunun 1/10 ile 1/2560 arasında titre verdiklerini ve bu hayvanlarda hastalığın latent olarak seyrettiğine işaret ederek 1 aşı dozunda bulunan 20 milyar bakterinin iyi bir bağışıklık verdiğini bildirmiştir.

Sığır, manda, domuz, koyun, kanatlı, ve tavşanların Pasteurella enfeksiyonlarına karşı hazırlanan çeşitli aşuların kullanıldığı literatür kayıtlarından anlaşılmaktadır. Araştırmacılar, aşılama monovalan ve polivalan bakterinlerin, otovaksenlerin, attenué canlı aşuların, saponinli aşuların, alüminyum hidroksitli aşuların, alün presipite aşuların, yağlı aşular ve serovaksinasyon'un kullanıldığını bildirmişlerdir (4, 5, 30, 44, 46). CAMERON ve SMİTH (7), *P. multocida* Tip-A ve Tip-D ile *P. haemolytica*'nın 4 ayrı serotipinden hazırlanan alün presipite polivalan aşının homolog suşlara karşı tavşan, koyun ve farelerde iyi bir bağışıklık verdiğini bildirmişlerdir. GALLO ve VALERİ (20), tavşan, fare ve sığırlar için patogen olduğu bilinen bir *P. multocida* suşu ile hazırlanan kalsiyum klorürle presipite edilmiş formollü aşından iyi sonuçlar sağladıklarını bildirmişlerdir. GALASSİ ve GIULIONİ (19), *P. multocida* suşundan hazırlanan inaktif polivalan aşının tavşanlarda ölüm oranını % 90 azalttığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar, aşının erişkin ve 4 haftalık tavşanlara subkutan olarak 1 cc. ve 2 cc. dozlarda verildiğini, dozların 2 hafta sonra tekrarlandığını bildirmişlerdir. OSTLER (39), tavşanların Pasteurellosis'inde kendi hazırladığı formolle öldürülmüş Pasteurella septica aşısını 6-8 haftalık tavşanlara 1 cc. miktarında subkutan olarak sıringa etmiş ve aşılu gruplardan aldığı kan serumlarının agg-

lutinasyonla olumlu sonuçlar verdiğini bildirmiştir. LISSOT (27), tavşanlardan izole edilen *P. multocida* ile hazırlanan bakterin'in subkutan olarak 8 gün ara ile 3 defa verilmesiyle 4 ay süreyle bağışıklık sağladığını bildirmiş ve aşı ile birlikte bir arsenik bileşiği olan asetilarsan verilmesinin tavşanları Pasteurellosis yanında koksidiyoz ve spiroketoz'a karşı da koruduğunu ortaya koymuştur.

### Materyal ve Metod

#### 1- Marazi madde sağlanması ve mikrop izolasyonu :

Suş izolasyonu için, 47'si kürsümüz deneme hayvanları ünitesindeki hastalıklı tavşanlardan, 45'i Tarım Bakanlığı Ankara Tavukçuluk Enstitüsü tavşanlarından, 12'si Ankara ve civarı, 7'si Balıkesir, 8'i Bursa, 5'i Kayseri, 3'ü Eskişehir illerinde tavşan yetiştiriciliği yapılan çiftliklerden olmak üzere toplam 137 marazi madde sağlanmıştır. Marazi maddeler laboratuvarımızda hazırlanan sıvı ve katı besiyerlerine ekilerek, üreyen mikroorganizmaların *P. multocida* yönünden morfoloji, boyanma, kültürel ve biyosimik karakterleri incelenmiştir. Suşların patogenite testleri farelerde uygulanmış ve buyyon kültürünün intra peritoneal olarak verilmesiyle 24-48 saat içinde ölümler gözlenmiştir.

#### 2- Denemelerde kullanılan suşlar :

*A- İzole edilen suşlar :* Gerek ölen tavşanların otopsisinden sonra alınan materyallerden, gerekse deri altı abseleri görülen tavşanlardan alınan 137 materyalin laboratuvarımızda yapılan bakteriyolojik yoklamaları sonucu 24 *P. multocida* suşunun izolasyon ve identifikasyonu yapılarak denemelerimizde kullanılmıştır.

*B- Aşı Suşu :* Aşı suşu olarak, morfoloji, boyanma, kültürel ve biyosimik karakterleri iyice incelenmiş ve passif hemagglutinasyonla serotipleri tayin edilmiş çoğunluğu teşkil eden A tipi suşlar arasından seçilen 18 nolu suş (Serotip-A.18) kullanılmıştır.

*C- Standart Suşlar :* Serolojik yoklamalarımızda gerekli olan tip spesifik serumların elde edilmesinde, 4 standart tip *P. multocida* suşu (*P. multocida* Tip-A.14, *P. multocida* Tip-B.853; *P. multocida* Tip-D. 706 ve *P. multocida* Tip-E. 12) Fransa'dan Dr. PERREAU'nun koleksiyonundan seçilmek suretiyle sağlanmıştır.

3- *Deneme hayvanları :*

İzole edilen suşların patogenite denemeleri ve suşların pasajında kürsümüz deneme tavşanları ve beyaz fındık farelerinden, aşılama denemelerinde ise Tavukçuluk Enstitüsüne ait 100 adet Yeni Zelanda ırkı tavşanlardan yararlanılmıştır. Tavşanların, aşılama önceden kanları alınarak Pasteurellosis yönünden serolojik yoklamaları yapılmıştır. Denemelerimizde klinikman sağlam oldukları saptanan hayvanlar kullanılmıştır.

4- *Hyaluronidaz :*

İzole edilen suşların çoğunun muköz karakterde olması nedeniyle Schering firmasının 1 cc. sinde 350 ünite hyaluronidaz ihtiva eden preparatı olan Kinaden (Boğa testislerinden elde edilmiş saf enzim), tip spesifik kapsüler antijenlerin ve çabuk agglutinasyon antijenlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

5- *Adjuvantlar :*

Aşı denemelerinde kullanılan bentonit ve saponin, Şap Enstitüsünden, alüminyum hidroksit ise Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir. Tip spesifik serumların elde edilmesinde kullanılan tam Freund adjuvantı ise Fransa'da Dr. Perreau'dan sağlanmıştır.

6- *Besi yerleri :*

Mikroorganizmin izolasyon, kültürel ve biyoşimik karakterlerinin incelenmesinde ve suşların saklanması laboratuvarımızda hazırlanan pH sı 7,2-7,4 olan tryptose buyyon, adi buyyon ve peptonlu su kullanılmıştır. Katı besi yeri olarak kanlı agar, tryptose agar, Mc. conkey agar ve jelatin'den yararlanılmıştır.

7- *Antibiyotik duyarlılık diskleri :*

İzole ve İdentifiye edilen 24 P. multocida suşunun antibiyotiklere karşı hassasiyet denemelerinde kullanılan diskler Askeri Biyoloji Enstitüsünden sağlanmıştır.

8- *Serumlar :*

Standart tip spesifik suşlarla tavşanlarda hazırlanan tip spesifik immün serumlar ve aşılama denemelerinden sonra tavşanlardan alınan serumlar serolojik testlerde kullanılmıştır.

### *Tip Spesifik İmmun Serumların Elde Edilmesi*

Standart tip spesifik *P. multocida* (A, B, D, ve E) suşlarının herbirine karşı tavşanlardan elde edilen immün serumlar kullanılmıştır. Tavşanların immunizasyonu iki basamakta yapılmış olup birinci kademede Brown-20 yoğunluğundaki antijenler eşit oranlarda tam Freund adjuvantı ile karıştırılarak deri altı şırınga edilmiştir. İkinci kademede ise; ilk şırıngadan 4 hafta sonra Brown-10 yoğunluğundaki antijenlerden 0,5 cc. den başlayıp 2 cc. ye kadar varan miktarlarda 5 hafta süreyle şırıngalara devam edilmiştir. Son enjeksiyondan bir hafta sonra hayvanlardan kan alınmış ve toplanan serumlar 2 cc. lik flakonlara bölünerek liyofilize edildikten sonra +4°C lik buz dolabında saklanmıştır. Daha sonra immün serumlar, homologu olan antijen ve heteralog antijenlerle passif hemagglutinasyon testine tabi tutularak kros reaksiyonlar kontrol edilmiştir. E ve A serotipleri kros reaksiyon gösterdiklerinden Tip-E immün serumu ile Tip-A karıştırılıp 37°C'de 2 saat bırakılmak suretiyle Tip-A antikorlarının elimine edilmesine kadar adsorbsiyon işlemine devam edilmiştir.

### *Passif Hemagglutinasyon Testi ve Uygulanışı*

Gerek immunize edilen tavşan serumlarının incelenmesinde gerekse aşılanan tavşanların serumlarının muayenesinde CARTER (8)'in bildirdiği passif hemagglutinasyon tekniği modifiye edilerek denemelerde kullanılmıştır. Testin uygulanışında, reaktif madde olarak A, B, D ve E tipine karşı hazırlanmış tip spesifik immün serumlar, aşılınmış tavşan serumları, koyun eritrositi, tip spesifik ve izole suşlardan hazırlanan kapsül antijenleri kullanılmıştır. Test uygulanırken bütün serumların eritrositlerle adsorpsiyonu yapılarak denemeye sokulmuştur. Sensibilize edilmiş eritrositlerin hazırlanışında kapsül antijenleri ile eritrosit karşılaştırılmış ve % 1 oranındaki sensibilize eritrosit reaksiyonda kullanılmıştır. Testin yapılışında serumun 1/5 den başlayarak 1/2560 a kadar katlı dilusyonları yapılmış ve sensibilize eritrositle muamele ederek sonuçlar değişik zaman aralıklarında okunarak değerlendirilmiştir.

### *Çabuk Agglutinasyon Testi*

Aşılama denemelerinde, aşıli tavşanlardan elde edilen serumların serolojik yönden yoklamalarında passif hemagglutinasyon testi yanında çabuk agglutinasyon testinden de yararlanılmıştır. Test için



aşı suşu olarak seçilen serotip-A 18'den agglutinasyon antijeni hazırlanmış, Mc. Ferland'in 50 misli yoğunlukta olacak şekilde ayarlanıp denemelerde kullanılmıştır.

#### *Aşılama Denemeleri*

Tavşanlarda Pasteurellosis'e karşı bağışıklık sağlamak amacıyla 4 çeşit aşı hazırlanarak 20 şerlik gruplara ayrılan 80 adet kulak numaralı Tavukçuluk Enstitüsüne ait Yeni Zelanda ırkı tavşanlarına tatbik edilmiştir. 20 tavşan kontrol olarak bırakılmıştır.

#### *Aşı suşunun rekoltesi :*

Morfoloji, kültürel ve biyosimik karakterleri yönünden iyice incelenmiş ve passif hemagglutinasyonla serotipi tayin edilmiş olan (Serotip A. 18) suş aşı denemelerinde kullanılmıştır. Aşı suşu tryptose agarda üretilerek 18 saatlik kültürler fizyolojik tuzlu su içinde toplanmış ve mikrop tortusu iki defa yıkandıktan sonra kesif bir emülsiyon halinde olacak şekilde erlenmayerlere konulup aşı hazırlanmasında kullanılmıştır.

#### *Formollü aşının hazırlanışı ve tatbiki :*

Yukarda hazırlanışı bildirilen mikrop emülsiyonu 60-65°C. de 15 dakika ısıtılmakla inaktive edilmiştir. Mikrop sayımı yapıldıktan sonra 1 cc. sinde 30 milyar mikrop olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra % 03 oranında ticari formaldehit katılarak ağzı kapaklı koyu bir şişe içinde buz dolabında +4°C de muhafaza edilmiştir. Hazırlanan aşı solüsyonundan 20 tavşanın boyun bölgesine subkutan olarak 1 cc. miktarında şırınga edilmiş ve birinci aşından 6 hafta sonra hayvanlar ikinci defa aşılanmışlardır. Tavşanlardan aralıklı olarak ayda bir defa olmak üzere 4 ay müddetle kan numuneleri alınarak serumları ile çabuk lâm agglutinasyonu ve passif hemagglutinasyon testi uygulanarak antikor seviyeleri tespit edilmiştir.

#### *Aluminyum hidroksitli aşının hazırlanışı ve tatbiki :*

Stok olarak hazırlanmış olan 1/5000 mertioletli mikrop emülsiyonu steril % 2,5 oranındaki pH sı 5,6 olan Al (OH)<sub>3</sub> ile eşit miktarda karıştırılmış ve hazırlanan aşı 1 cc. sinde 30 milyar mikrop bulunacak şekilde ayarlanmıştır. Aşı solüsyonu ağzı kapaklı koyu renkli bir şişeye konularak +4°C de buz dolabında saklanmıştır. Daha sonra 20 adet tavşan, boyun derisi altına 1 cc. miktarında şırınga

edilerek aşılmıştır. Aşılama prosedürü ve eprüvasyon işlemi formollü aşıda olduğu gibi tatbik edilmiştir.

*Bentonitli aşının hazırlanışı ve tatbiki :*

Şap Enstitüsünden temin edilen stok % 4 oranındaki bentonit solusyonu 121°C' de 15 dakika sterilize edilerek kullanılmıştır. Sterilize edilen % 4 lük solüsyondan % 2 lik solüsyon hazırlandıktan sonra eşit miktarda 1/5000 mertioletli bakteri suspansiyonu ile karıştırılmış ve 1 cc. sinde 30 milyar mikrop olacak şekilde ayarlanarak koyu renkli bir şişe içinde +4°C de buz dolabında saklanmıştır. Bu şekilde hazırlanan bentonitli aşidan 20 tavşana subkutan olarak 1 cc. şırınga edilerek aşılama yapılmıştır. Aşılama prosedürü eprüvasyon işlemi diğer aşılardaki gibi uygulanmıştır.

*Saponinli aşının hazırlanışı ve tatbiki :*

Şap Enstitüsünden temin edilen saponinin % 10 luk solüsyonu hazırlanmış ve Seitz filtresinden süzülerek sterilize edildikten sonra mertioletli mikrop emülsiyonunun 0,01 cc. sinde 1 mgr. olacak şekilde hesabedilerek katılmıştır. Daha sonra aşı 1 cc. sinde 30 milyar bakteri içerecek şekilde ayarlanarak diğer aşılarda olduğu gibi koyu renkli şişe içinde +4°C de buzdolabında saklanmıştır. Daha sonra aşılama prosedürü ve eprüvasyon diğer aşılarda bildirildiği şekilde uygulanmıştır.

*% 50 Fare letal dozunun tanımlanması :*

Aşılanan tavşanların eprüvasyonunda aşı suşu olarak seçilen 18 nolu suşun 18 saatlik buyyon kültüründen  $10^{-1}$  den  $10^{-10}$  a kadar steril buyyon içinde dilusyonları hazırlanarak Kaerber metoduna göre % 50 letal titrenin hesabı yapılmıştır (1). Bu dilusyonların her birinden 4 fareye intraperitoneal olarak 0,1 cc. miktarında inokulasyonlar yapılmış ve 4 gün müddetle fareler kontrol altında tutularak gözlenmiştir. Ölen farelerin kalp kanı, karaciğer ve dalaklarından boyama ve mikrop izolasyonu yapılmıştır. Aşı suşunun fareler için % 50 letal dozunun  $10^{-6}$ LD 50/0,1 cc. olduğu Kaerber metoduna göre tespit edilmiştir.

*Eprüvasyon :*

Tavşanlarda bağışıklık kontrolünü saptamada virulent P. multocida No 18'in 1000 LD 50/0,1 cc. lik dozu kullanılmıştır. Kontrol

tavşanlarda bu dozun öldürücü olduğu intra peritoneal olarak verilerek suretiyle saptanmıştır. % 50 lctal dozu  $10^{-6}$ LD 50/0,1 cc. olarak tespit edilen aşı suşunun  $10^3$ LD 50/0,1 cc. lik dozu ile formollü, alüminyum hidroksitli, bentonitli ve saponinli aşularla aşılınmış tavşanlar ve kontrol grubu tavşanlar aşılamadan 4 ay sonra eprüve edilmişlerdir. Kontrol tavşanlar 24-48 saat içinde ölmüşler, formollü ve saponinli aşı grubundaki tavşanlardan bir kısmı ise 24-72 saat içinde ölmüşlerdir. Ölen tavşanlardan bakteriyoskopi ve mikrop izolasyonu yapılmıştır.

### Sonuçlar

#### *İzole edilen Pasteurella multocida suşlarının özellikleri :*

Çeşitli kaynaklardan sağlanan 137 materyalden, hazırlanan katı ve sıvı besi yerlerine ekimler yapılarak 24 suşun izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan suşların 18 saatlik tryptose buyyon kültürleri  $-20^{\circ}\text{C}$  de saklanmış ve her ay fareden geçirilerek pasajları yapılmıştır. Biyoşimik karakterleri incelenen 24 suшта metil red, voges proskauer reaksiyonlarının menfi olduğu, jelatini eritmedikleri ve litmuslu sütte değişiklik yapmadıkları tespit edilmiştir. Yalnız iki suş hafif olarak  $\text{H}_2\text{S}$  meydana getirmiştir. Bütün suşların nitrat ve indol deneyinde pozitif sonuç verdikleri ve Mc. Conkey agar da üremedikleri saptanmıştır. İzole edilen suşların hemen hepsi glukoz, galaktoz, levüloz, sakkaroz, mannitol ve ksiloz'u fermente etmişlerdir. Bazı suşlar maltoz ve raffinöz'a vürmüşlardır. Laktoz, arabinoz, dulsitol, dekstrin, rhamnoz ve inulin'e tesir etmemişlerdir. Sonuçlar bir hafta içinde değerlendirilmiştir. Suşların patogeneite tayini için farelere intraperitoneal olarak verilen 18-24 saatlik buyyon kültürü, hayvanları 24-48 saat içinde öldürmüş ve ölen hayvanlardan otopsi yapılarak alınan iç organlardan besi yerlerine ekim yapılmak suretiyle etken üretilmiştir. Aynı zamanda kandan yapılan frotilerde de bipolar bakteriler görülmüştür.

#### *Serotiplendirme ve Aşılama denemeleri sonuçları :*

Tavşanlardan elde edilen tip spesifik immun serumlar ile, hazırlanışı bildirilen bir homolog ve 3 heterolog antijenle pasif hemagglutinasyon testi uygulanmış ve antikor titreleri tayin edilmiştir. Tablo I.

Bu şekilde yapılan passif hemagglutinasyon testinde E serotipine karşı hazırlanan tip spesifik immun serum serotip-A antijeni

ile düşük bir titrede reaksiyon göstermiştir. Tip spesifik E immün serumu içinde bulunan Tip-A antikorlarını elimine etmek gerekmiştir. Bu bakımdan Tip-spesifik E immün serumunun Tip-A antijeni ile adsorpsiyonu yapılarak spesifik hale gelmesi sağlanmıştır. Tip-A antikorlarının elimine edilmesi ancak 3 adsorpsiyondan sonra mümkün olmuş ve bundan sonra tip spesifik E immün serumu, Tip-E antijeni ile spesifik olarak reaksiyon göstermiştir. Başlangıçta 1/2560 olan tip spesifik E immün serumunun titresi 3 adsorpsiyon sonucu 1/640'a düşmüştür. Bu durum yaygın olan Tip-A P. multocida suşlarının tavşanlarda spontan olarak bulunabileceği kanısını uyandırmıştır.

Tablo 1. Tavşanlardan Elde Edilen Tip Spesifik İmmün Serumların Passif Hemagglutinasyon Titreleri

Tip spesifik kapüşler antijen		Tip spesifik tavşan İmmün serumları		A	B	D	E
		Serum No					
A	Serum No	1		1/2560	—	—	—
	" "	2		1/2560	—	—	—
	" "	3		1/1280	—	—	—
B	Serum No	1		—	1/640	—	—
	" "	2		—	1/640	—	—
	" "	3		—	1/640	—	—
D	Serum No	1		—	—	1/1280	—
	" "	2		—	—	1/1280	—
	" "	3		—	—	1/640	—
E	Serum No	1		—	—	—	1/640
	" "	2		—	—	—	1/640
	" "	3		—	—	—	1/640

İzolasyonu yapılan 24 P. multocida suşundan hazırlanan spesifik kapsüller antijenin tiplendirilmesinde tavşanlarda hazırlanan tip spesifik immün serumlar kullanılmış ve passif hemagglutinasyon metodu uygulanarak serotipleri tayin edilmiştir. Passif hemagglutinasyonla serotiplendirmeye sokulan 24 suştan 20'si P. multocida Tip-A olarak tespit edilmiştir. 16 ve 22 nolu 2 suş ise P. multocida Tip-D olarak saptanmıştır. 23 ve 24 nolu iki suş ise passif hemagglutinasyonla serotipi yapılamamıştır. Passif hemagglutinasyon testinin uygulanışında, her antijen anti-A, anti-B, anti-D ve anti-E tip spesifik immün serumlar ile reaksiyona sokulmuştur. Tablo II.



Aşı ile yapılan bağışıklık denemeleri 4 ay müddetle izlenmiş ve birer ay ara ile tavşanlardan alınan kan numunelerinden serumlar elde edilerek serolojik reaksiyonlar uygulanmıştır. Tavşanlardan alınan serumlarla önce lâm üzerinde çabuk agglutinasyon testi yapılmış ve bütün serumların 2-4 dakika içinde bariz bir agglutinasyon verdikleri saptanmıştır. Kontrol tavşan serumlarıyla lâm üzerinde hiç bir reaksiyon görülmemiştir. Daha sonra aynı serumlarla passif hemagglutinasyon testi uygulanarak bağışıklık antikorlarının titresi tespit edilmiştir. Tablo III.

Passif hemagglutinasyon sonuçlarına göre aşılardan bir ay sonra hemagglutinasyon titreleri bağışıklık verecek seviyede bulunmuştur. Bentonitli ve alüminyum hidroksitli aşı uygulanan tavşan serumları passif hemagglutinasyonla 1/160 a kadar titre gösterdikleri halde formollü ve saponinli aşılar 1/80 ile 1/160 arasında bir titre göstermişlerdir. Kontrol hayvanlarının serumlarında hiç bir reaksiyon tesbit edilememiştir.

Aşılardan 2 ay sonra muayene edilen serumlarda azda olsa bir titre yükselmesi olmuştur. Alüminyum hidroksitli ve bentonitli aşı uygulanan tavşan serumları çoğunlukla 1/320 ile 1/160, saponinli ve formollü aşı tatbik edilen hayvanların serumları ise çoğunlukla 1/160 ile 1/320 arasında titre vermişlerdir.

Birinci aşılardan 6 hafta sonra tatbik edilen ikinci aşılardan 15 gün sonra yani üçüncü ay içinde alınan serumlarda titre en yüksek seviyede bulunmuştur. Bentonitli ve alüminyum hidroksitli aşı ile aşılardan tavşan serumlarının çoğunlukla 1/640, saponin ve formollü aşılar ile aşılardan tavşan serumlarının ise 1/320 ile 1/160 arasında bir titreye sahip oldukları görülmüştür.

Dördüncü ayda alınan kan serumlarının muayenesinde antikor titrelerinin bir iki titre düştüğü saptanmıştır. Bentonit ve alüminyum hidroksitli aşı tatbik edilen tavşan serumlarının titresi genellikle 1/640 tan 1/320 ye ve 1/320 den 1/160 a kadar düşüş göstermiştir. Saponinli ve formollü aşı uygulanan tavşan serumlarının titresi ise 1/320 den 1/160 a ve 1/160 dan 1/80 e düşmüştür.

Aşılı tavşanlardan elde edilen bu sonuçlarla bentonitli ve alüminyum hidroksitli aşılardan diğer aşılara oranla daha iyi bir bağışıklık sağladıkları kanısına varılmıştır.

Tablo III. Aşılardan Tavşanların Serumlarıyla Yapılan Passif Hemagglutinasyon Sonuçları

Aşı nevi	Tavşan ku- lak No:	Passif Hemagglutinasyon Titreleri			
		I. Ay	II. Ay	III. Ay	IV. Ay
Bentonitli Aşı	118	1/160	1/320	1/640	1/320
	138	"	"	"	"
	139	"	"	"	"
	135	"	"	"	"
	136	"	"	"	"
	146	"	"	"	"
	147	"	"	"	"
	155	"	"	"	"
	161	"	"	"	"
	162	"	"	"	"
	167	"	"	"	"
	181	"	"	"	"
	192	"	"	"	"
	187	"	"	"	"
	126	"	"	1/320	1/160
	133	"	"	"	"
145	"	"	"	"	
144	"	"	"	"	
140	1/80	"	"	"	
156	"	1/160	"	"	
Aluminyum hidroksitli Aşı	068	1/160	1/320	1/640	1/320
	076	"	"	"	"
	094	"	"	"	"
	058	"	"	"	"
	036	"	"	"	"
	033	"	"	"	"
	029	"	"	"	"
	041	"	"	"	"
	043	"	"	"	"
	044	"	"	"	"
	028	"	"	"	"
	018	"	"	"	1/160
	016	"	1/160	1/320	"
	075	"	"	"	"
	082	"	"	"	"
	084	"	"	"	"
083	"	"	"	"	
066	1/80	"	"	"	
047	"	"	"	"	
048	"	"	"	"	
Formollü Aşı	200	1/160	1/320	1/320	1/320
	201	"	"	"	"
	207	"	"	"	"
	211	"	"	"	"
	287	"	"	"	"
	293	"	"	"	1/160
	285	"	"	"	"
	260	"	1/160	"	"
	219	"	"	"	"
	220	"	"	"	"
	222	1/80	"	"	"

	229	“	“	“	“
	218	h	“	“	“
	212	“	“	“	“
	246	“	“	“	“
	209	“	“	“	“
	215	“	“	1/160	“
	206	“	“	“	“
	204	“	“	“	“
	287	“	“	“	“
Saponinli Aşı	328	1/80	1/160	1/320	1/160
	364	“	“	“	“
	361	“	“	“	“
	360	“	“	“	“
	386	“	“	“	“
	355	“	“	“	“
	355	“	“	“	“
	376	“	“	“	“
	343	“	“	“	1/80
	351	“	“	“	“
	356	“	“	1/160	“
	334	“	“	“	“
	338	“	“	“	“
	340	“	“	“	“
	370	“	“	“	“
	332	“	“	“	“
	335	“	“	“	“
306	“	1/80	“	“	
325	“	“	“	“	
397	“	“	“	“	
Kontroller 20 adet		—	—	—	—

Aşıların tatbikinde, inokulasyon yerinde teşekkül eden lezyonlar gözlenmiştir. Aluminyum hidroksitli, bentonitli ve saponinli aşı tatbik edilen tavşanlarda, inokulasyon yerinde az da olsa lokal bir nodül meydana gelmiştir. Saponinli aşı tatbik edilen tavşanlarda teşekkül eden bu lokal lezyonların daha bariz olarak ortaya çıktığı gözlenmiştir.

Aşılanan tavşanların epruvasyonunda, aşı suşu olarak seçilen serotip A-18. nolu suş kullanılmıştır. Farelerde letal dozun  $10^{-6}$ LD<sub>50/0,1</sub> cc. olduğu Kacber metoduna göre hesab edilerek saptanmıştır. Aşılı tavşanlar 1000 fare letal dozu olan  $10^3$ LD<sub>50/0,1</sub> cc. ile epruve edilmişlerdir. Aşılamadan 4 ay sonra 1000 fare letal dozu ( $10^3$ LD<sub>50/0,1</sub> cc.) ile epruve edilen hayvanların bentonitli ve aluminyum hidroksitli aşılarla % 100 korundukları tespit edilmiştir. Formollü aşıya karşı korunma ise % 90 olmuştur. Zira bu gruptaki 20 hayvandan 2 si ölmüştür. Ölen hayvanlardan mikrop izolasyonu yapılmıştır. Saponinli aşıya karşı korunma % 75 bulunmuştur. Çün-



ki bu grupta bulunan 20 tavşandan 5 tanesi ölmüştür. Kontrol grubundaki 20 tavşanın hepsi ölmüştür. Ölen tavşanlardan otopsi yapılarak mikrop izolasyonu yapılmıştır. Tablo IV.

Tablo IV. Aşılı ve Aşısız Kontrol Tavşanlarda Epruvasyon Sonuçları ve Bağışıklık Değerleri

Aşılar	Tavşan sayısı	Canlı	Ölen	Ölüm % si	Bağışıklık Değeri
I Aluminyum hidrok sitli aşı	20	20	0	0	100
II Bentonitli aşı	20	20	0	0	100
III Formollü aşı	20	18	2	10	90
IV Saponinli aşı	20	15	5	25	75
Kontrol (Aşısız)	20	0	20	100	0

Dört aşı ile kontrol tavşanlara ait bağışıklık sonuçları arasındaki farklılıkların istatistik bakımdan önemliliği kontrol edilmiş ve yapılan istatistik işlemler sonunda 4 aşı ile kontrol grubu arasındaki bağışıklık farklılıkları 0,01 eşliğinde önemli bulunmuştur. Alüminyum hidroksitli ve bentonitli aşı ile formollü aşı arasındaki bağışıklık farklılıkları istatistik bakımından önemli bulunmamıştır ( $P > 0,05$ ). Alüminyum hidroksitli ve bentonitli aşı ile saponinli aşı arasında mevcut 0,25 lik bağışıklık farklılığı istatistik önem taşımaktadır ( $P < 0,02$ ). Formollü aşı ile saponinli aşı arasında saptanan bağışıklık farklılığı ise istatistik bakımından önemli bulunmamıştır ( $P > 0,05$ ).

Denemelerimizde ayrıca izole edilen suşların antibiyotiklere karşı duyarlılıkları da incelenmiştir. Suşların hemen hepsi Tetracyclin, Erythromycin, Chloromycetin, Penicillin ve Aureomycin gibi antibiyotiklere karşı duyarlı bulunmuş ve Novobiocin, Kanamycin, Streptomycin, Bacitracin ve Polymoxin-B gibi antibiyotiklere de rezistans oldukları görülmüştür. Tablo V.

Tablo V. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları

Antibi- yotikler Suş No:	Chloromycetin	Neomycin	Erythromycin	Kanamycin	Penicilin	Streptomycin	Tetracyclin	Novobiocin	Bacitracin	Aureomycin	Polymixin-B
1	++++	++	++++	++	++++		++++			++++	
2	++++	-	+++	++	++		++++			++++	
3	+++	++	++		++		+++			+++	
4	++++	++	+		++++	+	++++			+++	
5	+++	++	++	+	+++		+++		+	+++	
6	+++		+++		+++		++++			+++	+
7	++++		++++	+	+++	+	++++	+		+++	
8	++++		+++		++	+	++++			+++	
9	++++	+	++++	+	+++	+	++++			+++	
10	++++		+++	++	++		+++	+		+++	
11	++++	++	++++		+++		+++		+	+++	
12	+++		+++		+++		+++			+++	
13	+++		++++		++		+++			+++	+
14	++++		++++	+	+++		+++			+++	+
15	++++		+++		+++		+++			+++	
16	+++	+	+++		+++	+	+++			+++	
17	++	++	++++		+++	+	+++			+++	+
18	+++		+++		+++		+++			++	
19	+++		+++		+++		+++			+++	
20	+++		++		++		+++			+++	
21	++++		+++		+++		++			+++	
22	+++		+++		++		++				
23	+++		+++		+++		+++			+++	
24	++	-	++++		++		+++			++	

++++: Çok kuvvetli duyarlılık zonu  
 +++: Kuvvetli duyarlılık zonu  
 ++: Orta duyarlılık zonu  
 +: Hafif duyarlılık zonu  
 -: Dirençli olma hali

### Tartışma

*Pasteurella multocida*'nın yer yüzünde yaygın olduğu ve birçok hayvan türünde enfeksiyonlara neden olduğu literatür kayıtlarından anlaşılmaktadır (4, 5, 6, 29, 30, 46, 52).

Denemelerimizde, kürsümüz deneme hayvanları ünitesi, tavşanları ve çeşitli müesseselerden sağlanan 137 materyalden 24 suş izole edilerek morfoloji ve kültürel karakterleri incelenmiştir.

Literatürlerde bildirildiği gibi tavşan *Pasteurelloz*'u bir kaç saat içinde hemorajik septisemi ile ağır ölümler yapan per akut, bir kaç gün içinde bronko-pleuro pnömoni ve enteritis ile seyreden akut ve *Pasteurellik coryza* ve deri altı abselerinin teşekkülüyle karakterize olarak ta sub akut ve kronik tarzda bir seyir takibetmektedir (16, 17, 18, 21, 22, 26, 40).

İzolasyon çalışmalarımızda elde edilen materyaller gerek solunum yolu enfeksiyonu gösteren tavşanlar, gerekse vücudun muhtelif bölgelerinde teşekkül etmiş soğuk abseler bulunan tavşanlardan sağlanmıştır.

*P. multocida*'nın antijenik yapısı tam manasiyle aydınlatılmış değildir. Bununla beraber fareler için toksik ve bağışıklık doğuran bir "O" antijeni ile hapten karakterinde ve "O" antijenini maskeleyen bir kapsüler antijene sahip olduğu bilinmektedir (46). Evcil hayvanlardan izole edilen *P. multocida* suşlarının serotip tayininin yapılarak identifiye edilmesinde çeşitli serolojik reaksiyonların uygulandığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. BAİN (2, 3) agglutinasyon, CARTER (8, 13) indirekt hemagglutinasyon ve agglutinasyon, DORSEY (15) ve PRODJOHARJONO ve arkadaşları (50) çabuk agglutinasyon, PALIARGUES (40) ve PERRAU (41) passif hemagglutinasyon, HEDDLESTON ve arkadaşları (24) agar-jel diffuzyon, LITTLE ve LYON (28) çabuk agglutinasyon, NAMİOKA ve MURATA (33, 34, 37) NAMİOKA ve BRUNER (36) agglutinasyon ve hemagglutinasyon MURATA ve arkadaşları (31), agglutinasyon testlerinin serotip tayininde kullandığını bildirmişlerdir. BAİN (4) *P. multocida* Tip-I in glikolipidik olan antijenik strüktürlerinin kromatografi ile kimyasal analizini yaparak passif hemagglutinasyondaki önemlerini ve toksitelerini göstermiştir. NAMİOKA ve MURATA (35), hidroklorik asitle muamele etmek suretiyle elde edilen tüm bakteriyi teşkil eden bir antijeni kullanarak agglutinasyon testi vasıtasıyla A ve B grubu-

buna sokulan suşlarda bazı somatik "O" antijenlerin identifiye edilebileceğini bildirmişlerdir. Daha sonraları PRİNCE ve SMITH (47, 48, 49), immunodiffuzyonla *P. multocida*'nın eriyebilen antijenlere sahip olduklarını ve gram negatif bakteriler ile *P. multocida* arasında filogenetik bir bağlılığın bulunduğunu ortaya atmışlardır. Bu gün için, PERREAU (41), CARTER (8)'in passif hemagglutinasyon testi yardımıyla kapsüler antijenlere göre tiplendirilen 4 serotip (A, B, D, E) geçerli bir klasifikasyon olarak değerini korumaktadır. CARTER (8, 11) insan tipi "O" eritrositlerini kullanmak suretiyle *P. multocida*'yı kapsüler antijenik özelliklerine göre önceleri serotip (A, B, C, D) olarak sınıflandırmış fakat sonradan grup ve antijenik tip bakımından önemi olmayan C tipinin terkedilmesini önererek serotipleri (A, B, D, E) olarak belirtmiştir.

Bakteriyolojik açıdan *P. multocida*'nın morfolojik ve biyoşimik özellikleri bütün detayı ile incelenip fikir birliğine varıldığı halde, serolojik ve immunolojik açıdan bu birlik mevcut değildir. Fakat hiç olmazsa 4 serotip üzerinde bir fikir birliğine varılmıştır. Denemelerimizde, tip tayin yöntemi olarak CARTER (8)'in bildirdiği metod kullanılmış ve "O" grubu insan eritrositleri yerine alsever solüsyonu içine alınmış koyun eritrositlerinden passif hemagglutinasyonda yararlanılarak olumlu sonuçlar alınmıştır.

PERREAU (42) serotiplendirme konusunda monospesifik serumların hazırlanmasında hayvanların tabii antikoru taşıyabileceklerini, bu bakımdan elde edilecek serumların heterolog antijenlerle reaksiyon vereceği için adsorbe edilmesi gerektiğini bildirmiş ve böylece serumların titresinde düşme olabileceğini belirtmiştir.

Nitekim denemelerimizde tavşanlardan elde ettiğimiz tip spesifik immün serumlardan anti-E serumu Tip-A antijeni ile düşük bir reaksiyon göstermiştir. A antikoru 3 adsorbsiyondan sonra elimine edilmiş fakat başlangıçta 1/2560 olan titre 1/640 a düşmüştür.

CARTER (8, 10) ve PERREAU (41) A serotipinin sığır, koyun, keçi, domuz, kanatlı hayvanlar ve tavşanlarda dünyanın her yerinde yaygın olarak bulunduğunu, B serotipinin doğu Afrika, Yakın doğu ve Asya sığırlarında, D serotipinin sığır, koyun, keçi, tavşan, domuz ve kanatlı hayvanlarda yaygın olduğunu, E serotipinin ise Orta ve Batı Afrika sığırlarında tespit edildiğini bildirmişlerdir.

PERREAU ve arkadaşları (45) ve CARTER (8) tavşanlarda A ve B serotipinin HENNING (25) D serotipinin, HAGEN (23)

B ve C serotipinin, PALIARGUES (40) A ve D serotipinin ve NAMIOKA (32) A ve D serotiplerinin hakim olduğunu bildirmişlerdir.

Denemelerimizde, passif hemagglutinasyon testine göre yaptığımız tip tayini yoklamalarında; izole ettiğimiz 24 tavşan susundan 20 si P. multocida Tip-A ve 2 si P. multocida Tip-D olarak saptanmıştır. İki suş ise tiplendirilememiştir.

PERREAU (41) ve CARTER (9, 12), REBERS ve HEDDLESTON (51) CARTER ve RUNDELL (14) bakterinin yüzeyindeki lipopolyozid'le birlikte bulunan hyaluronik asit ihtiva eden mukoid tarzda bir üreme gösteren A ve D serotiplerinin hyaluronidazla muamele edilmesinin gerektiğini bildirmişler ve böylece antijenin serolojik yönden aktif hale getirildiğini belirtmişlerdir.

Denemelerimizde, ekseriya mukoid tarzda üreme gösteren P. multocida suşları Schering firmasının testikuler saf hyaluronidaz preparatı olan Kinaden ile muamele edildikten sonra passif hemagglutinasyonda kullanılmıştır.

CAMERON ve SMITH (7), P. multocida Tip-A ve -D ile P. haemolytica karışımından hazırlanan alun presipite polivalan aşının tavşanlarda iyi sonuçlar verdiğini göstermişlerdir. GALASSI ve GIULIONI (19) inaktif polivalan bir aşı ile tavşanlarda ölüm oranının % 90 azaldığını bildirmişlerdir. OSTLER (39), formollü aşının tavşanlarda bağışıklık verdiğini ve LISSOT (27), tavşanlardan izole edilen P. multocida bakterininin aralıklı olarak 3 defa şiringa edilmesiyle 4 ay bağışıklık sağlandığını bildirmişlerdir.

Denemelerimizde, tip tayini yapılmış suşlar arasından seçilen serotip-A 18 Nolu P. multocida susundan formollü ile alüminyum hidroksit, saponin ve bentonit gibi değişik adjuvantlar içinde hazırlanan aşılar tavşanlara subkutan olarak tatbik edilmiş ve ikinci aşılama ilk aşıdan 6 hafta sonra uygulanmıştır. Hayvanlar 4 ay sürcyle izlenmiş ve alınan kan numuneleriyle antikor titreleri tesbit edilmiştir.

PERREAU (41, 43, 44), bağışıklık denemelerinde eprüvasyon dozunun ayarlanması için % 50 letal dozun tanımlanması gerektiğini belirtmiştir.

Biz de denemelerimizde, fareler üzerinde eprüve suşumuzun % 50 letal dozunu  $10^{-6}LD_{50}/0,1$  cc. olarak tespit ettik. Eprüvasyon denemelerinde 1000 fare letal dozuna karşı ( $10^3LD_{50}/0,1$  cc.) alüminyum hidroksitli ve bentonitli aşılarla aşılanmış tavşanların %

100 korunduklarını, formollü aşının % 90 ve saponinli aşının ise % 75 bir bağışıklık değerine sahip olduğunu tespit ettik. Aynı zamanda tavşanların aşılmasında kullanılan 4 aşı ile kontrol tavşanlara ait bağışıklık sonuçları arasındaki farklılıkların istatistik bakımdan önemliliği kontrol edilmiştir.

Sonuç olarak serotiplendirmede passif hemagglutinasyon testinin pratik ve kısa zaman içinde sonuç vermesi bu metodun bakteriyolojik açıdan daha elverişli olduğunu göstermektedir. Hastalıklı tavşanlardan izole edilen *P. multocida*'nın serolojik etüdü yurdu-muzda tavşan yetiştiriciliği yapılan bölgelerde tip dağılımını ortaya çıkartmakta ve serotiplendirme yapılarak hastalığa karşı etkili bir aşı ve hiperimmün serum hazırlanmasında kolaylıklar sağlayacağı gerçeğini ortaya çıkarmaktadır.

### Literatür

- 1- **Arda, M.** (1971): *Hastalık etkenlerinin titrasyon ve nötralizasyon testlerinde uygulanan laboratuvar metodları.* A.Ü. Vet. Fak. Yay. NO: 273.
- 2- **Bain, R. V. S.** (1954): *Studies on haemorrhagic septicaemia of cattle. I. Naturally acquired immunity in siamese buffaloes.* Brit. Vet. J. 110, 481-484.
- 3- **Bain, R. V. S.** (1954): *Studies on haemorrhagic septicaemia of cattle. II. The detection of naturally acquired immunity.* Brit. Vet. J. 110, 519-524.
- 4- **Bain, R. V. S.** (1963): *Hemorrhagic septicaemia.* Food and Agr. Org. Un. Nat. F.A.O. Agr. Std No: 62.
- 5- **Başkaya, H., Ertürk, Ö., Beşe, M. ve Arda, M.** (1972): *Evcil Hayvanların Enfeksiyöz Hastalıkları.* Cilt I. A.Ü. Vet. Fak. Yay. No: 283. Ankara Üniversitesi Basımevi. Ankara.
- 6- **Bruner, D. W. and Gillespie, J. H.** (1966): *Hagan's Infectious Diseases of Domestic Animals. With special reference to etiology, diagnosis and biologic therapy. Fifth edition, Comstock Publishing Associates.* A division of Cornell University Press Ithaca, New York.
- 7- **Cameron, C. M., and Smith, G.** (1970): *Immune response of rabbits, mice and sheep to polyvalent Pasteurella vaccine.* Onderstepoort J. Vet. Res. 37, 217-224.

- 8- **Carter, G. R.** (1955): *Studies on Pasteurella multocida. I. A hemagglutination test for the identification of serological types.* Am. J. Vet. Res. 16, 481-484.
- 9- **Carter, G. R.** (1958): *Some characteristics of type A strains of Pasteurella multocida.* Brit. Vet. J. 114, 356-357.
- 10- **Carter, G. R.** (1961): *A New serological type of Pasteurella multocida from central Africa.* Vet. Rec. 73, 1052.
- 11- **Carter, G. R.** (1963): *Proposed modification of the serological classification of Pasteurella multocida.* Vet. Res. 75, 1264-1265.
- 12- **Carter, G. R.** (1972): *Agglutinability of Pasteurella multocida after treatment with Hyaluronidase.* Vet. Rec. 91, 150-151
- 13- **Carter, G. R.** (1972): *Simplified identification of somatic varieties of Pasteurella multocida causing fowl cholera.* Avian Dis. 4, 1109-1114.
- 14- **Carter, G. R. and Rundell, S. W.** (1975): *Identification of type A strains of Pasteurella multocida using staphylococcal hyaluronidase.* Vet. Rec. 96, 343.
- 15- **Dorsey, T. A.** (1963): *Studies of fowl cholera. II. The correlation between biochemic classification and the serologic and immunologic nature of avian Pasteurella multocida strains.* Avian Dis. 3, 393-402.
- 16- **Flatt, R. E.** (1974): *Pasteurellosis in Rabbits.* Vet. Rec., 95, 129.
- 17- **Flatt, R. E. and Dungworth, D. L.** (1971): *Enzootic pneumonia in rabbits: Naturally occurring lesions in lungs of apparently healthy young rabbits.* Am. J. Vet. Res. 32, 621-626.
- 18- **Flatt, R. E. and Dungworth, D. L.** (1971): *Enzootic pneumonia in rabbits: Microbiology and comparison with lesions experimentally produced by Pasteurella multocida and a chlamydial organism.* Am. J. Vet. Res. 32, 627-637.
- 19- **Galassi, D. and Giulioni, A.** (1971): *Profilassi vaccinale della pasteurellosi nel coniglio.* Veterinaria (Milano). 20, 239-248.
- 20- **Gallo, P. et Valari, U.** (1960): *Vaccin contre la septicemie hémorragique.* Bull. Off. int. Epiz. 53, 186-191.
- 21- **Grey, C. L. and Thomson, R. G.** (1971): *Pasteurella haemolytica in the tracheal air of calves.* Can. J. Comp. Med. 35, 121-128. Citein: Vet. Bull. Vol. 42, (1972): 1172.
- 22- **Hagen, K. W.** (1958): *Enzootic Pasteurellosis in domestic Rabbits. I. Pathology and Bacteriology.* J.A.W.M.A. 133, 77-80.

- 23- **Hagen, K. W.** (1966): *Enzootic Pasteurellosis in Domestic Rabbits. II. Strains types and methods of control.* Lab. Anim. Care. 16, 487-491.
- 24- **Heddleston, K. L., Gallagher, G. E. and Rebers, P. A.** (1972): *Fowl cholera: Gel diffusion precipitin test for serotyping Pasteurella multocida from avian species.* Avian Disease. 16, 925-936.
- 25- **Henning, G.** (1971): *Typisierung von Pasteurella multocida mit Hilfe des indirekten Hemagglutinationstestes.* Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 216, 414-417.
- 26- **Langenegger, G., Marques, L. M. Q. et Coelho, M.** (1973): *Pasteurellose enzootica de coelgo.* Pesq. Agropec. Bras, Ser. Vet. 8, 69-72.
- 27- **Lissot, M.** (1962): *Traitement efficient des maladies des lapins.* Bull. Acad. Vet. Fr. 35, 163-165.
- 28- **Little, P. A. and Lyon, B. M.** (1943): *Demonstration of serological types within the non hemolytic Pasteurella.* Am. J. Vet. Res. 4, 110-112.
- 29- **Merchant, I. A. and Packer, R. A.** (1967): *Veterinary Bacteriology and Virology.* 7th Edition. The Iowa State University Press, Ames Iowa. A.S.A.
- 30- **Minbay, A.** (1976): *Tavşan hastalıkları.* Vet. Hek. Dern. Derg. 46, 5-18.
- 31- **Murata, M., Horiuchi, T. and Namioka, S.** (1974): *Studies on the pathogenicity of Pasteurella multocida for mice and chickens on the basis of O-groups.* Cornell. Vet. 54, 292-307.
- 32- **Namioka, S.** (1970): *Antigenic analysis of Pasteurella multocida.* Nat. Inst. Anim. Hlth. Tokyo. 10, Supplement, 97-108.
- 33- **Namioka, S. and Murata, M.** (1971): *Serological Studies on Pasteurella multocida I. A simplified method for capsule typing of the organism.* Cornell Vet. 51, 498-507.
- 34- **Namioka, S. and Murata, M.** (1961): *Serological studies on Pasteurella multocida. II. Characteristics of the organism.* Cornell. Vet. 51, 507-521.
- 35- **Namioka, S. and Murata, M.** (1961): *Serological studies on Pasteurella multocida. III. O antigenic analysis of cultures isolated from various animals.* Cornell. Vet. 51, 522-535.



- 36- **Namioka, S. and Bruner, D. W.** (1963): *Serological studies on Pasteurella multocida. IV. Type distribution of the organisms on the basis of their capsule and O groups.* Cornell. Vet. 53, 41-53.
- 37- **Namioka, S. and Murata, M.** (1964): *Serological studies on Pasteurella multocida V. Some epizootiologic findings resulting from O antigenic analysis.* Conell. Vet. 54. 520-534.
- 38- **Ose, E. E. and Muenster, B. S.** (1968): *A Method for Evaluation of vaccines containing Pasteurella multocida.* Am. J. Vet. Rec. 29, 1863-1866.
- 39- **Ostler, D. C.** (1961): *The diseases of broiler rabbits.* Vet. Rec. 73, 1237-1252.
- 40- **Paliargues, M. P. g.** (1957): *Affections respiratoires chez le lapin.* These pour le Doct. Vet. Ec. Nat. Vet. Toulouse. No: 68.
- 41- **Perreau, P.** (1967): *La sérotypie de Pasteurella multocida.* Bull. Ass. Fr. Vet. Microbiol. Immunol. et Spec. Mal. Inf. I, 25-37.
- 42- **Perreau, P.** (1970): *Préparation de sérums Anti-Pasteurella multocida Monospécifiques de Type.* Bull. Acad. Vet. Fr. 43, 283-291.
- 43- **Perreau, B.** (1974): *Reaction immunitaire des jeunes bovins vis à vis des infections à Pasteurella. Problèmes d'immunisations.* Bull. Ass. Fr. Vet. Microbiol. Immunol spec. Mal. Inf. 15, 87-91.
- 44- **Perreau, P.** (1976): *Cours de microbiologie systématique 1974-1975. (Bactériologie) 66<sup>ème</sup> le, on.* Institut Pasteur. Paris.
- 45- **Perreau, P., Renault, L. et Vallee, A.** (1962): *Types sérologiques de Pasteurella multocida rencontrés en France chez le lapin et la poule.* Bull. Acad. Vet. Fr. 35, 295-298.
- 46- **Pilet, Ch., Bourdon, J. L., Toma, B. et Marchal, N.** (1975): *Bactériologie Médicale et Vétérinaire. Systématique Bactérienne.* Doin Editeurs. 8, Place de l' Odeon, PARIS.
- 47- **Prince, H. G. and Smith, J. E.** (1966): *Antigenic studies on Pasteurella multocida using immunodiffusion techniques. I. Identification and nomenclature of the soluble antigens of bovine haemorrhagic septicaemia strain.* J. Comp. Path. 76, 303-314.
- 48- **Prince, G. H. and Smith, J. E.** (1966): *Antigenic studies on Pasteurella multocida using immunodiffusions techniques. II. Relationships with other Gram-negative species.* J. Comp Path. 76, 315-320.
- 49- **Prince, G. H. and Smith, J. E.** (1966): *Antigenic Studies on Pasteurella multocida using immunodiffusion Techniques. III. Relationships*

*Between Strains of Pasteurella multocida.* J. Comp. Path. 76. 321-335.

- 50- **Prodjoharjono, S., Carter, G. R. and Conner, G. H.** (1974): *Serologic Study of bovine strains of Pasteurella multocida.* Am. J. Vet. Res. 35, 111-114.
- 51- **Rebers, P. A. and Heddleston, K. L.** (1974): *Immunologic Comparison of Westphal-Type Lipopolysaccharides and Free Endotoxins from an Encapsulated and a Nonencapsulated Avian strain of Pasteurella multocida.* Am. J. Vet. Res. 35, 555-560.
- 52- **Sato, G., Sato, A. and Namioka, S.** (1967): *Pasteurella multocida Serotype 1:A. Associated with Respiratory infection of Domestic Rabbits in a Holding Colony.* Jap. J. Vet. Res. 15, 159-164.

Yazı 29. 4. 1980 günü alınmıştır.