

## ENFEKSİYÖZ NEKROZAN HEPATİT AŞISI UYGULANAN KOYUNLARDA AŞININ OLUŞTURDUĞU BAĞIŞIKLIK DÜZEYİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşe KILIÇ Ünal KILINÇ

Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 20.11.2003 Kabul Tarihi: 13.05.2005

### ÖZET

Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde üretilen Enfeksiyöz Nekrozan Hepatit aşısı hiç aşı yapılmamış 10 baş koyuna 21 gün ara ile 2 ml uygulandı. Bu uygulamadan 10 gün ile 2, 4, 8, 10, 12 ve 15 ay sonra koyun kanları alınıp serumları çıkarıldıktan sonra bir tüpte karıştırılarak grup kan serumu elde edildi. İkinci aşılamadan sonraki 10.günde 8 IU/ml olan antitoksin düzeyi, 10 ay sonra 1 IU/ml'ye, 2. yıl 20 IU/ml olan antitoksin düzeyi 12 ay sonra 1 IU /ml sınırına düştüğü gözlemlendi.

Sonuç olarak, koyunların birinci aşılamadan 10 ay sonra Enfeksiyöz Nekrozan Hepatit aşısı ile tekrar aşılanmasına, bundan sonraki yıllarda bu uygulamanın yılda bir tekrarlanmasının yararlı olacağı kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Aşı, Enfeksiyöz nekrozan hepatit.

### ABSTRACT

#### Detection of Immunity Level in Sheep After Administration of Infectious Necrotic Hepatitis Vaccine

A vaccine against Infectious Necrotic Hepatitis produced in Elazığ Veterinary Control and Research Institute was tested in a group of sheep. Ten sheep that have not been previously vaccinated were inoculated 2 ml vaccine twice at 21 day interval. Blood was collected 10 days, 2, 4, 8, 12 and 15 months following the second vaccination and pooled. Antitoxin level was 8 IU/ml on day ten and decreased to 1 IU/ml 10 months later. At the end of the second year antitoxin level was 20 IU/ml and decreased to 1 IU/ml one year later.

Based on the results of the present study it could be suggested that vaccination against infectious necrotic hepatitis of sheep should be repeated 10 months following first vaccination and then repeated yearly.

**Key Words:** Infectious necrotic hepatitis, Vaccine

### GİRİŞ

Enfeksiyöz Nekrozan Hepatit lezyonlu karaciğer dokusunda bulunan, *Clostridium oedematiens* toksinleriyle meydana getirilen özellikle koyunların ve bazen de sığırların akut toksemik bir hastalığıdır. Saha şartlarında genellikle karaciğer parazitleri ile ilgili olduğundan bu parazitlerin biyolojilerine uygun olarak mevsimsel bir seyir takip eder. Bu nedenle hastalık bilhassa yaz ve sonbahar aylarında çok fazla görülür. Hastalığın etkeni sindirim sisteminde daima mevcuttur. Jermilerin bağırsaktan karaciğere geçişi genç parazitlerin hareketleri ile olmaktadır (1, 6).

Hastalık ilk olarak Tasmania'da Gilrut (1910) tarafından bildirilmiş, daha sonra Dodd (1918-1921), Albiston (1927), Turner ve Davasne (1927), Zeissler ve Rassfeld (1929), Yeni Zellanda'da Hopkirk (1927), Almanya'da Miessner ve arkadaşları (1931), Romanya'da Carnaianu ve Mihailescu (1935), İskoçya'da Jamieson ve arkadaşları (1948), Orta Gal'de Williams (1962) tarafından incelenmiştir (2, 3). İyigören ve ark. ilk defa 1965 yılında hastalığın

yurdumuzda Ankara, Eskişehir ve Yozgat illerinde mevcut olduğunu tespit etmişlerdir (3).

Hasdemir ve ark. ise Erzurum'da hastalığın varlığını bir daha ortaya koyan çalışmaları olmuştur (7).

Bilinen tüm klinik olguların %20'si ve tüm akut hastalıkların %70'ini mikroplu hastalıklar oluşturur. Bugün büyük aşamalar kaydetmiş olan kemoterapiye rağmen enfeksiyon hastalıklardan korunmada ve sağaltımda aşılar ve bağışık serumlar hala yerlerini korumaktadır. Özellikle viruslara karşı uygun kemoterapötik bulma güçlüğü, primer toksik hastalıklarda mikrop ekzotoksinlerine karşı bir savaşım aracının bulunmaması ve ilaçlara karşı bakterilerin her gün gelişen dirençleri günümüzde aşı ve serumların değerini ayakta tutmakta hatta arttırmaktadır (8).

Aşıların oluşturdukları bağışık cevap, humoral ve hücresele bağışık cevap niteliğindedir (8, 9, 10, 11). Aşı olarak kullanılan maddeler doğrudan hastalık etkenlerinin ölü ya da attenüe şekilleri, bu

mikropların özel antijenik maddeleri ya da bunların hücre dışına saldıkları anatoksinler olabilir (5, 8, 10).

Türkiye’de hayvan hastalık ve zararlıları ile mücadelede en yaygın yöntem koruyucu aşılamalardır. Hayvan aşılarının üretiminde kullanılan kimyasal ve biyolojik maddelerin çoğunun ithal edilmesi ve üretimin genellikle insan emeğine dayalı olması nedeniyle aşı üretimleri hem pahalı hem de çok zahmetlidir (12,13).

Enstitümüzde 1987 yılında üretimine başlanan Enfeksiyöz Nekrozan Hepatit aşısı *Cl.oedematiens* tip A (UK) suşu ile ana kültür şeklinde hazırlanan Alun de potaslı Alfa-Gamma toksin içeren toksoid bir aşıdır (14, 17).

Dünyanın bir çok ülkesinde bu yöntem ile hazırlana aşılar kullanılmaktadır. Ancak hangi yöntemle hazırlanırsa hazırlansın esas olan antijenik değerinin yüksek olmasıdır. Araştırmalar göstermiştir ki yüksek virülensli suşlar kullanılması ile antijenik değeri yüksek aşılar elde edilmektedir. Bu durum diğer ülkelerde de aşağı yukarı aynı sonuçları vermektedir (12, 18).

Bu çalışmada Enfeksiyöz Nekrozan Hepatit aşısı uygulanan koyunlardan alınan kan serumlarındaki antitoksin miktarı ve aşının verdiği bağışıklık düzeyi araştırıldı.

### GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırma materyali olarak 10 adet Akkaraman cinsi koyun, 300 adet 18-20 gram ağırlığında beyaz fare ve Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü’nde üretilen “Enfeksiyöz Nekrozan Hepatit” aşısı kullanıldı. Normal olarak +4°C’de saklanmış Enfeksiyöz Nekrozan Hepatit aşısı ile aşılanmış 10 adet koyundan belirli aralıklarla alınan koyun kan serumları elde edildi. Standart Toksin olarak Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü’nden temin edilen *Cl. oedematiens* A (UK) Alfa-Gamma toksini kullanıldı. Enfeksiyöz Nekrozan Hepatit aşısının bağışıklık gücünü ölçmede koyun kan serumlarında mevcut antitoksinlerin tespiti için toksin + antitoksin nötralizasyon (L+) test uygulandı (11, 19). Toksin + Antitoksin nötralizasyon testi Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından kabul edilen kurumlarca hazırlanan standart materyaller kullanılarak uluslararası antitoksin birimi (IU/ml) üzerinden değerlendirilmektedir (8, 20). Serumlardaki antitoksin düzeyi standart toksine karşı titre edilerek bulunmaktadır. Toksin önce bir ünite standart antitoksin ile karıştırıldığında deney hayvanını öldüren en küçük miktarı olan L+ dozu hesaplanarak titre edildi (6, 15, 17).

Serum + toksin karışımları hazırlanırken Danyz reaksiyonu nedeni ile toksin seruma değil, serum toksine ilave edildi (6, 14).

Antitoksin gücü, toksin ile karıştırıldıktan sonra hayvanlara şırınga edilerek toksini nötralize edip etmediği ya da invitro olarak toksini presipite etmesine göre tayin edildi (11, 13, 19).

Daha önce hiç aşılanmamış 10 adet Akkaraman koyundan deneme öncesi kan alınarak serumları çıkarıldı. Bu koyunlardan alınan 0,3 ml kan serumu 0,3 ml *Cl.oedematiens* Alfa-Gamma standart toksini ile bir tüp içinde karıştırıldı. Toksin + antitoksin nötralizasyonu için 30 dakika 37 C° de bırakıldıktan sonra, iki beyaz farenin arka bacak kası içine 0,2 ml enjekte edildi ve fareler 72 saat kontrol altında tutuldu.72 saatlik bu kontrol süresinde bütün fareler öldü. Böylece koyun kan serumlarının 0,5 Uluslar arası ünite Alfa-Gamma toksini içermedikleri tespit edildi. Bu koyunların denemeye alınmasına karar verildi.

Denemeye alınan koyunlar, 21 gün ara ile iki defa 2 ml olarak Enfeksiyöz Nekrozan Hepatit aşısı ile aşılandı. İkinci aşılamadan 10 gün, 2, 4, 6, 8, 12 ve 15 ay sonra kanları alınarak serumları ayrıldı. Serumlardan eşit miktarlar alınarak bir tüpte karıştırıldı ve grup kan serumları elde edildi. Serumlar fizyolojik tuzlu su ile 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/20, 1/32, 1/40, 1/60 oranlarında sulandırıldı. Bu sulandırılmış grup serumları ile saf serumdan 0,3 ml alınarak ayrı ayrı tüplere konuldu ve 0,3 ml *Cl. oedematiens* Tip A Alfa-Gamma standart toksini ile tüplerde karıştırıldı.Örnekler toksin nötralizasyonu için 30 dakika 37°C’de bırakıldıktan sonra, 18-20 gram ağırlığında beyaz farelerde Toksin + Antitoksin Nötralizasyon Testi uygulandı. Her karışımdan 2’şer beyaz farenin arka bacak kasına 0,2 ml enjekte edildikten sonra, fareler 72 saat gözlemlendi ve sonuçlar kaydedildi.

İlk aşı uygulamasından 12 ay sonra koyunlar iki gruba ayrıldı. Birinci gruptan 15. ayda testler için tekrar kan alındı. İkinci grup ise 21 gün ara ile iki defa 2 ml aşılandı. Bu aşılamadan 10 gün, 2, 4, 8, 12 ve 15 ay sonra kanları alındı ve yukarıda açıklandığı şekilde farelere Toksin + Antitoksin Nötralizasyon Testi uygulandı.

### BULGULAR

Araştırmaya başlarken hiç aşı yapılmamış koyunlardan kan serumları ile yapılan L+ testi neticesinde 0,5 IU/ml den daha az bir antitoksin varlığı bulunan hayvanlar denemeye alındı. 21 gün arayla yapılan ilk aşılamadan 10 gün sonra alınan kan serumları ile yapılan L+ testinde antitoksin düzeyinin

8 IU/ml'ye çıktığı, iki ay sonra bu 8 IU/ml'lik düzeyin devam ettiği gözlemlendi.

Kan serumlarındaki antitoksin miktarları 4 ay sonra 4 IU/ml, 6 ay sonra 2 IU/ml, 8 ay sonra 1 IU/ml, 10 ay sonra 1 IU/ml olarak, 12. ayda ve 15. ayda yapılan testlerde ise 0,5 IU/ml'nin altında belirlendi.

İlk aşılardan 12 ay sonra 5 adet koyuna 21 gün arayla 2 ml aşı uygulamaları yapıldıktan 10 gün sonra L+ testi uygulandığında antitoksin miktarının 20 IU/ml'ye, 2 ay sonra 16 IU/ml'ye, 4 ay sonra ise 8 IU/ml olarak ilk aşılardaki en yüksek seviye ile eşitlendiği görüldü.

Diğer yandan antitoksin miktarının 8 ay sonra 4 IU/ml, 12 ay sonra 1 IU/ml ve 15 ay sonra ise 0,5 IU/ml'ye düştüğü gözlemlendi. Sonuçlar Tablo1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Koyun Kan serumları karışımlarında *Cl.oedematiens* Alfa-Gamma antitoksin düzeyleri.

Kan alma zamanı		Antikor titresi (IU / ml)	
1.Aşılama	Rapel aşılama	1.Aşılama	Rapel aşılama
10. gün	10. gün	8	20
2.ay	2.ay	8	16
4.ay	4.ay	4	8
8.ay	8.ay	1	4
12.ay	12.ay	<0.5	1
15.ay	15.ay	<0.5	0.5

### TARTIŞMA

Hayvanlarda infeksiyöz hastalıklarla mücadelede temel noktayı koruma oluşturur. Hastalıklardan korunmada aşılamanın ucuz ve etkili olması nedeni ile özel bir önemi vardır. Tek başına aşılama tam bir koruma sağlayamaz. Diğer önlemlerle birlikte uygulandığında daha etkili olur.

Aşı ile bağışıklama yöntemleri ilk kez çiçek aşılması ile başlamış, daha sonra bir çok hastalığa karşı uygulanmıştır. Günümüzde her aşından olumlu sonuç alınmasa bile hemen her hastalığın aşısının üretilmesi için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. İlerleyen teknik ve moleküler düzeydeki çalışmalar sonunda ileride hemen her hastalığa karşı etkin bir aşı elde edilebileceği olasıdır (9).

Aşılar aranan özellikler birkaç madde halinde toplanabilir. Bunlar; aşı kolay hazırlanmalı, ucuza mal edilmeli, dozu küçük ve uygulanması kolay olmalı, uygulandıkları hayvanlarda kuvvetli ve uzun zaman devam eden bir bağışıklık vermelidir (12).

Bağışıklığı etkileyen faktörler ise; aşının hazırlanması ve titre edilmesi, liyofilize edilmesi, muhafazası, dozu, aşılama yolları, aşılama adedi, hayvanın yaşı, bireysel faktörler, hayvanın ırkı, adjuvantlar, beslenme ve parazitler, antibiyotikler ve vitaminler şeklinde toplanabilir (8, 9, 20, 21).

Toksin meydana getiren bakterilere karşı bağışıklanma toksine karşı bağışıklık sağlamakla olasıdır. Bakteri sıvı besi yerinde üretildiğinde toksin oluşturur (9, 14, 17).

Ana kültürler veteriner aşıları içinde önemli bir yere sahiptirler. Antijenik yapılarının sabit, bağışıklık verme güçlerinin oldukça yüksek olması nedeniyle anaerobik gram pozitif bakteriler, gram negatiflerin tersine koruyucu mücadelede büyük bir yardımcı olup çok iyi sonuçlar alınmasına olanak vermektedirler (9).

Yaptığımız araştırmada hiç aşı yapılmamış Akkaraman koyunlardan alınan kan serumu ile yapılan L+ testi sonucu antitoksin düzeyi 0,5 IU/ml'den az iken, 21 gün arayla yapılan iki uygulamadan 10 gün sonra 8 IU/ml'ye, diğer yandan ilk aşılamalardan 12 ay sonra aşılama takiben 10.günde bu miktar 20 IU/ml'ye yükselmiştir. Bu nedenle bir defa aşılama hayvan ikinci yıl tekrar aşılandığında antikor seviyesi çok yükseldiği ve bağışıklık düzeyinin arttığı kanaatine varıldı. Bu durum enterotoksemi aşısı ile yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir (12, 22).

Aşılardan 10 gün sonra ikişer aylık periyotlar halinde yapılan kontrollerde antitoksin miktarlarında önemli düşüşler gözlenmiş, 10 ay sonra bu oran 1 IU/ml düzeyine düşmüş ve 12. ayda ise hiç aşı yapılmamış hayvanlardaki seviyede olmuş ve hayvanlar hastalanma yönünden riskli bir duruma gelmiştir (Tablo 1). Birinci yılın sonunda tekrar aşılanan koyunlardaki antitoksin seviyesi 20 IU/ml iken, bu 12 ay sonra 1 IU/ml seviyesine gelmiştir (Tablo 1). Araştırmamız sonucunda koyunlarda 21 gün arayla yapılan iki aşılardan 10 ay sonra *Cl.oedematiens* Alfa-Gamma antitoksin bağışıklık verme düzeyinin en alt seviyede olduğu ortaya çıkmıştır. İkinci aşılardan 10 ay sonra tekrar aşı uygulanması gereği ortaya konulmuştur.

Saha uygulamalarında aşının sık aralıklarla uygulanması bazı zorluklar nedeniyle meslektaşlarımız tarafından benimsenmemektedir. Fakat şimdiye kadar hemen hiçbir ülkede bu durum çözümlenmiş değildir. Dolayısıyla toksoid esasına dayanan ve adjuvantlı aşılar bir tek doz ile gerekli bağışıklığı sağlayamamaktadırlar. Bu nedenle iki defada aşılama ve 10 ay sonra aşılamanın tekrarını bütün güçlüklerine rağmen uygulamak gerekir.

Anaerob aşılarda sadece bir doz uygulanması ile hayvanı tam olarak koruyabilecek bir aşı yoktur. Tek doz uygulanması ile hayvanlar hastalığa karşı korunmamış olurlar (4).

Bu sonuçlara dayanılarak ve anaerob hastalıklardan her biri için ayrı ayrı tekrarlanan enjeksiyonlarla sürülerin hırpalanmasından kaçınmak, zaman kaybına engel olmak, veteriner hekimlerin yükünü azaltmak için bir çok anaerob enfeksiyona karşı toksoidlerle hazırlanmış polivalan aşilar kullanma gereği vardır.

Bazı ülkelerde bir çok anaerob enfeksiyona karşı polivalan aşilar kullanılmaya başlanmış ve bundan iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Ülkemizde de bu yönde çalışmalar yapılmakta olup bazı olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir (9, 12, 16, 20, 22).

### KAYNAKLAR

1. Arda M, Minbay A, Leloğlu N, ve ark. Bakteriyel İnfeksiyöz Hastalıklar. Özel Mikrobiyoloji, Ed: Aydın N. No.26, Medisan Yayın Serisi, Ankara, 1999.
2. Bağadı HO. Infectious Necrotic Hepatitis (Black Disease) of Sheep The Veterinary Bulletin 1974; 44(7): 385-388.
3. İyigören B, Durukan Ş, Kılıçoğlu G. Enfeksiyöz Nekrozan Hepatit. Ankara, Eskişehir ve Yozgat İllerinde Görülen Vakalar Üzerindeki Denemeler. Vet Mikrob Derg 1966; 1(1): 14-16.
4. Koyun Hastalıkları. Pendik Vet Mikrob Derg 1971; 3: 123-134.
5. Roberts RS, Güven S, Worrall EE. *Cl.oedematiens*, in the Livers of Healthy Sheep. Vet Rec 1970; 86: 628.
6. Tekbıyık, A. Koyunların Anaerob Enfeksiyonları Hakkında Genel Bilgi ve Laboratuvar Teşhis Metotları. Bornova Vet Mikrob Derg 1968;17:88.
7. Hasdemir F, Günel G. Erzurum'da Dadaş Köyünde Tespit Edilen Enfeksiyöz Nekrozan Hepatit. Türk Vet Hek Derg 1968; 3: 1-2.
8. Bilgehan H. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Barış Yay. Fakülteler Kitabevi, 1989.
9. Aydın N. Veteriner Hekimlikte Aşilar ve Aşı Uygulamalarında Dikkat Edilecek Hususlar. Etlik Hayv Hast Merk Araşt Enst Derg 1990; 7(1): 59-84.
10. Arda M, Minbay A, Aydın N, ve ark. İmmunoloji (Bağışıklık Bilimi). Medisan yayın serisi, Ankara, 1994.
11. Ayhan H. Normal ve Hücresel Bağışıklığın Ölçülmesinde Kullanılan Testler ve Özellikleri. Etlik Vet Mikrob Derg 1988; 6(3):173-216.
12. Kurtkaya M, Nadas UG. Alun de Potaslı Enterotoksemi Aşısının Bağışıklık Süresi Üzerinde Bir Çalışma. Pendik Vet Mikrob Derg 1972; 36-42.
13. Özyer M, İnal U. Deneysel Olarak Dondurulmuş ve 37°C'de Bekletilmiş Alun de Potaslı Enterotoksemi Aşısının Tavşanlarda Kıyaslamalı Bağışıklık Çalışmaları. Pendik Vet Mikrob Derg 1989; 20(1): 41-50.
14. Ardehali M, Darakshan H, Moosavi M. Mass Production and Standardization of *Clostridium oedematiens* Vaccine Against Black Disease (Infectious Necrotic Hepatitis) of Sheep. Develop Bio Standard 1986; 64: 137-140.
15. Güven S. Anaerob Mikroorganizmalar ve Bakteriyolojik Muayene Metotları. Pendik Vet Mikrob Derg 1972; 4.
16. İyigören B, Unlu M, Alpar S. Enfeksiyöz Nekrozan Hepatit Aşısı Üzerinde Denemeler. Vet Mikrob Derg. 1967: 1(1): 14-16.
17. Koyunların Enfeksiyöz Nekrozan Hepatit Aşı Hazırlama Protokolü (Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma Ve Kont. Gen. Müd.'nün 07.10.2002 tarih ve 10392 sayılı onayları gereği kullanılmakta olan protokol).
18. Roberts RS, Güven S, Erdoğan I, Boran S, Worrall EE. Clostridial Enfeksiyonlara Karşı Kombine Aşilar. Pendik Vet Mikrob Derg 1968; 1(3): 49-56.
19. Akman M, Gülmezoğlu E. "Toksine-Antitoksin Reaksiyonları". Tıbbi Mikrobiyoloji II Baskı, 1976; 243-245.
20. Ertürk O, Beşe M. Kombine Aşiların Bağışıklık Etkisi Üzerinde Bir Araştırma. A Ü Vet Fak Derg 1961; 7(2): 188-196.

21. Özgen H. Beslenmenin Rezistans ve İmmunité Üzerine Etkisi. A Ü Vet Fak Derg 1968; 15(3-4): 416-427.
22. Roberts RS, Güven S, Worrall EE. Türkiye Koyun Irklarının Clostridial Antijenlere Karşı Gösterdiği İmmun Reaksiyonlar. Pendik Vet Mikrob Derg. 1969; 2(2): 44-48.

---

Yazışma Adresi: Ayşe KILIÇ, Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü, 23200 Elazığ- TÜRKİYE  
Tel: 0 424 218 18 34-104 e-posta: aykiliç23@hotmail.com

---