

Sığır ve Koyunlarda Eş Zamanlı Brusella ve Şap Aşısı Uygulamalarının Antikor Düzeylerine Etkisi

İbrahim Hancı¹, İ. Safa Gürcan², Ahmet Sönmez³

¹Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Şap Enstitüsü, Ankara

²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyoistatistik ABD, Ankara

³TİGEM Altınova Tarım İşletmesi, Konya

Geliş Tarihi / Received: 09.02.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 30.05.2016

Özet: Buzağı ve kuzularda brusella ve şap aşılarının eş zamanlı, farklı noktalardan uygulanması ile farklı zamanlarda uygulanması arasında oluşan antikor titrelerinin karşılaştırmalı olarak araştırılması amaçlanmıştır. Parenteral brusella ve şap aşısı 23 adet buzağı ve 105 adet kuzuda çalışılmış ve 12 ay süre ile antikor titreleri izlenmiştir. Konjunktival brusella ve şap aşısı 91 adet buzağıda çalışılmış ve 2 ay süre ile antikor titreleri takip edilmiştir. Aşılama grupları, her çalışma grubunda hayvanlar üçe bölünerek elde edilmiş ve bu gruplara tek başına şap aşısı, tek başına brusella aşısı ve eş zamanlı 2 aşı uygulaması gerçekleştirilmiştir. Aşılamalardan önce ve aşılama sonrasında 14, 28, 60, 90, 180 ve 360. günlerde kan numunesi alınmıştır. Brusella antikor titresini serum aglütinasyon testi ile şap antikor titresini serum nötralizasyon testi ile saptanmıştır. Sonuç olarak brusella ve şap aşılarının simultane olarak uygulanmasında şap aşısı antikor titrelerinde düşme görülmezken brusella antikor titrelerinde genel olarak artış tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Antikor, aşı, beraber, brusella, şap hastalığı

The Effect of Simultaneous Application of Brucella and FMD Vaccines on Antibody Level in Cattle and Sheep

Abstract: The aim of this research was to investigate the antibody titers of brucellosis, foot and mouth disease (FMD) vaccines and compare differences of application site and application of different times in calves and lambs. Twenty three calves and 105 lambs were vaccinated by brucellosis and FMD vaccines and antibody titer was followed during 12 months. was 91 calves vaccinated by conjunctival brucellosis and FMD vaccines were examined antibody titers for 2 months. In vaccinated groups each group animals were divided 3 parts. First one was for FMD vaccination, second one was for brucellosis vaccination third one was for both vaccination. The blood samples were taken before vaccination and after vaccination in 14, 28, 60, 90, 180, 360 days. The antibody titers to brucellosis vaccine was determined by plate agglutination test. The antibody titers to FMD was determined with Serum Neutralization Test. Finally It was concluded that FMD antibody titers was not affected by simultaneous vaccination of Brucellosis and FMD.

Key words: Antibody, brucellosis, FMD, simultaneous, vaccine

Giriş

Şap hastalığı Picornaviridae familyasına bağlı *Aphthovirus genusuna* ait bir virus tarafından meydana getirilmektedir [12,15]. Virus zarsız olup tek zincirli RNA taşımaktadır [7,12,15].

Brusella, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (OIE) tarafından dünyada en yaygın zoonoz olarak kabul edilmektedir.

Brucellosis, campylobacteriosis, salmonellosis ve chlamydiosis koyunlarda en çok tespit edilen atık etkenlerindedir [14,20]. 2003-2007 yılları arasında Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsüne gönderilen 463 adet aborte koyun fetüsünden en fazla oranda (% 30,02) Brucella izole ve identifiye edilmiştir [20]. Brusella insanlarda klasik olarak titreme ile yükselen ateş, aşırı terleme, baş ağrısı, halsizlik, bel ve yaygın vücut ağrıları ile seyreden kronik zoonotik infeksiyonlara neden olmaktadır [3,14].

*Çalışma aynı zamanda TAGEM/HS/11/01/02/181 nolu TAGEM Projesidir.

**Çalışma için Etik Kurul onayı alınmıştır.

Şap aşısı inaktif, adjuvantlı bir aşı iken brusella aşısı attenüe bir aşıdır. Ülkemizde 2012 Ocak ayı itibari ile sığırlara konjunktival S19, koyunlara konjunktival Rev.1 aşısı uygulanmaktadır.

Aşıların beraber uygulanmasında 3 yol kullanılmaktadır. Aynı anda farklı noktalardan simultane aşılama şeklinde uygulanmaktadır. Ya da kombine aşılama ismi ile nitelendirilen ya 2 aşının uygulamadan hemen önce birleştirilip tek enjeksiyonla verilmesi şeklinde ya da üretim esnasında 2 farklı aşının birleştirilerek tek şişeye konulması şeklinde olmaktadır.

Ülkemizde halen koyun-keçi vebası aşısı ve şap aşısı simultane olarak uygulanmaktadır.

1970 yılından sonra Fransa'da şap ve inaktif brusella aşıları geniş çapta kombine aşı şeklinde uygulanmıştır. Çalışmalarda beklenen titreler elde edilmiştir [9].

Garcia-Carillo ve ark. (1978), Kathuria ve ark. (1976) simultane aşılama canlı attenüe aşıların şap aşısına olan immun yanıtı azalttığını ileri sürmüşlerdir. Daha sonra Ortadoğu ve Afrika'da sığır vebasının tekrar görülmesi ile Hedger ve arkadaşları 1986 yılında Umman Sultanlığı'nda şap ve sığır vebası için simultane aşılama çalışması yapmıştır. Hedger ve arkadaşları hayvanları 3'e ayrılıp sadece şap, sadece sığır vebası ve şap+sığır vebası simultane şekilde uygulamıştır. Aşılamaların yapıldığı gün, 21. gün ve 42. günde kan numuneleri alınıp her iki titre tayini için nötralizasyon testi uygulanmıştır. Gruplar arası fark istatistiki çalışmalar yapılarak ortaya konulmuştur. Hedger ve arkadaşları 1986 yılında simultane aşılamanın titre kaybı olmaksızın güvenle kullanılabileceği sonucunu bulmuşlardır. Afrika ve Ortadoğuda inaktif şap aşısı ve attenüe sığır vebası aşısı simultane olarak ülke hayvanlarına uygulanmıştır.

Mastan ve ark. [16] brusella ve şap hastalığına karşı kombine aşılamanın sonuçlarını görmek için bir çalışma yapmışlardır. Her grubun 5 adet kobaydan oluştuğu 8 grup oluşturmuşlardır. Gruplar; 1- Sadece canlı brusella S19 aşısı 2- Sadece şap aşısı 3- Canlı brusella S19 ve şap aşılması (simultane) 4- Canlı brusella S19 ve şap aşılması (kombine) 5- Sadece inaktif brusella S19 aşısı 6- İnaktif brusella S19 ve şap aşılması (simultane) 7- İnaktif brusella S19 ve şap aşılması (kombine) 8- Kontrol olarak

dizayn edilmiştir. Şap aşısı olarak formolle inaktive, alüminyum hidrokside adsorbe, saponinli trivalan aşı kullanılmıştır. Şap virusunun inaktivasyonunda kullanılan formolün canlı brusella aşısı üzerinde zararlı etkisi olup olmadığı ortaya konulmaya çalışılmıştır. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* deneylerde formolün kombine aşı içerisindeki brusella S19 üzerinde hiçbir zararlı etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Kobaylara aşılama sonrası epruvasyon çalışması uygulanmıştır. Canlı brusella S19 ve şap aşıları gerek simultane gerekse kombine olarak uygulandığında tek yapılan canlı brusella aşılmasına göre daha iyi epruvasyon sonuçları vermiştir. Canlı brusella S19 ile kombine şap aşılarının inaktif brusella S19 ile kombine şap aşılarına göre titre değerleri ve epruvasyon değerleri daha yüksek çıkmıştır. Bu durum canlı aşı ile inaktif aşığı kombine etmenin iki inaktif aşığı kombine etmeye göre daha iyi titre vereceği görüşüne katkı sunmuştur. Bu çalışmada dişi ve erkek kobaylar arasında herhangi bir fark tespit edilmemiştir.

İlk simultane aşılama çalışmalarından birini Castaneda ve ark. [6] yapmıştır. Şap aşısı ve canlı vesiculer stomatitis aşısı 4-6 aylık buzağılara simultane şekilde boynun iki yanından yapılmıştır. İlk aşılama 3-4 ay sonra aşılama tekrarlanmıştır. Sonuç olarak aşılar ayrı ayrı yapıldıklarında oluşan antikor titresini daha yüksek olmamıştır.

Ivanyi ve ark. [11] attenüe viral diare aşısı ile inaktif şap aşısını simultane uygulamışlardır. 18 sığır üç gruba ayrılarak bir gruba iki aşı beraber, bir gruba sadece attenüe viral diare aşısı, bir gruba sadece şap aşısı yapılmıştır. On haftalık sürede kan numunesi alınıp nötralizasyon testi yapılmış ve epruvasyon uygulanmıştır. Hem nötralizasyonda hem epruvasyon çalışmasında simultane aşılama yapılan grubun diğer gruplardan farkı bulunamamıştır.

Hedger ve ark. [10] 3 gruba ayrılan toplam 118 sığır üzerinde simultane aşılama çalışması yapmıştır. Bir gruba trivalan şap aşısı yapılmış, bir gruba attenüe doku kültürü sığır vebası aşısı yapılmış ve diğer gruba da her iki aşı simultane bir şekilde boynun farklı bölgelerinden yapılmıştır. Serolojik yanıt, virüs nötralizasyon testi ile gözlenmiştir. Simultane şekilde yapılan aşılama ayrı ayrı yapılanlara göre serolojik cevapta önemli derecede farklılık tespit edilmemiştir.

Domuz yavrularına De Clercq ve ark. [8] inaktif, adjuvantlı şap ve attenüe klasik domuz ateşi aşılarını simultane uygulamışlardır. Klasik domuz ateşi ile beraber şap aşısı yapılan domuzlarda yalnız şap aşısı yapılanlara göre antikor cevabında bir değişiklik olmaz iken simultane yapılan aşılamada klasik domuz ateşine karşı oluşan antikor titresi tek aşı yapılan gruba göre daha yüksek elde edilmiştir.

Farklı bir çalışmayı ise Srinivas ve ark. [17] şap ve sığır vebası aşısı saha koşulları altında simultane şekilde yapılarak aşıly hayvanlarda oluşan antikor üretiminin gelişmesinde interferens etkinin olup olmadığı araştırmıştır. Sonuç olarak aşılar yalnız veya simultane yapıldıklarında herhangi bir yan etki olmaksızın aynı serolojik cevabı oluşturmuştur.

Çalışmanın amacı 2 aşının aynı anda farklı noktalardan uygulanması ile oluşan antikor titresinin izlenerek, simultane aşılamaya zemin oluşturulmasıdır.

Materyal ve Metot

Aşı

Aşılamalarda Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından üretilen *Brucella abortus* S19 genç aşısı (buzağı için, deri altı ve konjuktival), *Brucella melitensis* Rev.1 genç aşısı (kuzu için, deri altı ve konjuktival) ve Şap Enstitüsü tarafından üretilen şap aşısı (sığır ve koyunlar için) kullanılmıştır. Şap aşısı olarak Turvac Oil Bivalan, 10/11 seri nolu aşı kullanılmıştır. *Brucella abortus* S19 aşısı olarak 2009/6 seri nolu aşı ve *Brucella melitensis* Rev.1 aşısı olarak 2010/1 seri nolu aşı kullanılmıştır.

Antijen

Brusella antikor titrelerini belirlemek için ticari olarak Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından üretilen *Brucella* tüp aglütinasyon antijeni; şap virus antikorları için BHK-21 An31 hücresi ve 100 TCID50 virus kullanılmıştır.

Hayvanlar

Parenteral brusella ve şap aşısı 23 buzağı ve 105 kuzuya uygulanmıştır. Konjuktival brusella ve şap aşılması 91 adet buzağıya uygulanmıştır. Parenteral çalışmaya alınan buzağılar 90-117 günlük, kuzular 3-6 aylıktır. Konjuktival çalışmaya alınan buzağılar 95-178 günlüktür. Çalışmada Montofon ırkı buza-

ğı ve Merinos ırkı kuzular kullanılmıştır. Gruplar oluşturulurken yaşlara göre dağılım yapılmıştır. Hayvanlar arasında bakım ve beslenme açısından fark bulunmamaktadır. Çalışmalar Konya'nın Kadınhanı İlçesi'nde bulunan TİGEM'e ait Altınova Tarım İşletmesi'nde yapılmıştır.

Serum

Aşılamalardan önce ve aşılama sonrasında 14, 28, 60, 90, 180 ve 360. günlerde alınan kan serumlarınındeki antikor titre düzeyleri belirlenmiştir.

Deneme ve kontrol gruplarının seçimi

105 kuzu, 23 buzağı ve 91 buzağıdan oluşan 3 grup halinde çalışmalar yapılmıştır. Belirli günlerde alınan kan numunelerinde antikor titre tayini için testler yapılmıştır. Şap antikor titresi için serum nötralizasyon testi, brusella antikor titresi için serum aglütinasyon testi uygulanmıştır.

Deneme grupları

- 1 Nolu deneme grubu: buzağı, parenteral brusella ve şap aşısı uygulaması
- 2 Nolu deneme grubu: buzağı, konjuktival brusella ve şap aşısı uygulaması
- 3 Nolu deneme grubu: kuzu, parenteral brusella ve şap aşısı uygulaması

Kontrol grupları

- 1 Nolu kontrol grubu: buzağı, parenteral brusella aşısı uygulaması
- 2 Nolu kontrol grubu: buzağı, konjuktival brusella aşısı uygulaması
- 3 Nolu kontrol grubu: buzağı, tek doz şap aşısı uygulaması
- 4 Nolu kontrol grubu: buzağı, 2 doz şap aşısı uygulaması
- 5 Nolu kontrol grubu: kuzu, parenteral brusella aşısı uygulaması
- 6 Nolu kontrol grubu: kuzu, tek doz şap aşısı uygulaması
- 7 Nolu kontrol grubu: kuzu, 2 doz şap aşısı uygulaması
- 8 Nolu kontrol grubu: kuzu, 3 doz şap aşısı uygulaması

Şap aşısı prospektüsüne göre ilk aşılamaı takiben 1 ay sonra ikinci doz aşı uygulanmıştır. İkinci aşılamadan 5 ay sonra 3. doz aşı uygulanmıştır.

Aşı ve aşılama takvimi

Tablo1. Aşılama takvimi

	Aşılamalar					
	0. Gün	28. Gün	2. Ay	3. Ay	6. Ay	12. Ay
Şap+Br.	Ş + B	Ş			Ş	Ş
Şap	Ş	Ş	B		Ş	Ş
Br.	B	Ş	Ş		Ş	Ş

Brucella abortus S19 genç aşısı, dişi danalara boyundan deri altı, *Brucella melitensis* Rev.1 genç aşısı dişi ve erkek kuzulara scapulanın gerisinden deri altı tatbik edilmiştir. Konjunktival aşı konjunktiva ya da konjunktival keseye damlatılmıştır. Bivalan yağ adjuvantlı şap aşısı ise deri altı yolla tatbik edilmiştir. Sıfırinci gün ve aşılamalardan sonraki antikor titresinin artışını gözlemek için 14, 28, 60, 90, 180 ve 360. günlerde kan alınmıştır. Bağışıklık brusella aşısında aşılamadan 21 gün sonra, şap aşısında aşılamadan 28 gün sonra şekillenmektedir.

Serolojik testler

Serum aglütinasyon testi

Brusella antikor titre tayini için kullanılmıştır. Doksan altı gözlü U tabanlı plate'in serum dilüsyonu için 6 gözü kullanılmıştır. Reaksiyonların okunmasında göz aldanmalarını önlemek ve hataya düşmemek için her testte bir kontrolle çalışılmıştır (Aslantaş, 2006).

Serum nötralizasyon testi

Şap antikor titre tayini için kullanılmıştır. 96 gözlü plate'lerde BHK-21 An31 hücresi %70-80 monolayer hale geldiğinde kullanılmıştır. Virusların 0,1 100 TCID50 olacak şekilde dilüsyonları yapılarak test protokolüne uygun şekilde titre tayini yapılmıştır (Şap Enstitüsü Protokolü).

İstatistik sonuçları

Önemlilik testlerine geçmeden önce veri setleri parametrik test varsayımlarından olan normallik ve varyansların homojenliği yönünden sırasıyla Shapiro Wilk ve Levene testi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ayrı ayrı her bir zamanda alınan ölçümler için gruplar arası farkın anlamlılığı parametrik test varsayımlarını sağlayan değişkenler için Student T testi ile sağlamayanlar için ise Mann Whitney U testi ile incelenmiştir. Sonuçlar minimum %5 hata payı ile değerlendirilmiştir. SPSS14.1 paket programından yararlanılmıştır.

Bulgular

Serum nötralizasyon testi sonuçları

Nötralizasyon testi ile şap antikor titresini belirlenmiştir. 1/22 ve üzeri titreye sahip hayvanlar hastalığa karşı bağışık kabul edilmektedir. Buzağılarda ve kuzularda 1/4 ve >1/44 arasında değişen maternal antikor titreleri bulunmaktadır. Gruplandırılmalar yaş göz önüne alınarak yapıldığından maternal antikorlu hayvanlar gruplara genelde homojen şekilde dağılım göstermiştir.

Tablo 2. Parenteral brusella ve şap aşısı uygulanan buzağılarda O tipi şap antikorlarının titre dağılımı

		<1/8	1/8	1/11	1/16	1/22	1/32	1/44	1/64	1/96	1/128	1/192	1/256	1/362	1/512	>1/512	n	
		Şap O tipi antikor	14. Gün	Ş+B	1		2	1	1	2	1							
Ş	1			1	4	1	1										8	
28. Gün	Ş+B				1		1	1	3	1	1							8
	Ş		1	1	1		1	3		1								8
2. Ay	Ş+B					1	1		1	2		2						7
	Ş				1			2	1	3	1							8
3. Ay	Ş+B						1		2	1	1				1	1		7
	Ş					1		3	2	1		1						8
6. Ay	Ş+B			3	2	1	1											7
	Ş		2	1	3				1		1							8

Açıklama: Nötralizasyon testinde 1/22 ve üzeri titreye sahip hayvanların hastalığa karşı korunduğu göz önüne alındığında 14. gün sonuçlarına göre simultane aşılama buzağuların 5/8'i bağışık iken sadece şap aşılması yapılan grupta buzağuların 2/8'i bağışıktır. 28. günde simultane grup 7/8 oranında bağışık iken sadece şap aşılması yapılan grup 5/8 oranında bağışıktır. 2. ayda simultane grup 6/7, şap grubu 7/8 oranında bağışık, 3. ayda simultane grup 7/7, şap grubu 7/8 oranında bağışık, 6. ayda simul-

tane grup 1/7, şap grubu 2/8 oranında bağışıktır. 6 ayda antikor titrelerindeki düşmeler O tipi virüs yapısından kaynaklanmakta olup genel bir durum olarak değerlendirilmektedir. Gruplardaki hayvanlarda korumayı sağlayan en düşük titre baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda simultane grubun daha iyi titre verdiği sonucuna ulaşılmaktadır. İstatistiki olarak yapılan karşılaştırmalarda eş zamanlı aşılama yapılan gruptaki buzağuların O tipi antikor titresini ile yalnız şap aşılması yapılan grup arasında istatistiki olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 3. Parenteral brusella ve şap aşısı uygulanan buzağularda A tipi şap antikorlarının titre dağılımı

		<1/8	1/8	1/11	1/16	1/22	1/32	1/44	1/64	1/96	1/128	1/192	1/256	1/362	1/512	>1/512	n		
Şap A tipi antikor	14. Gün	Ş+B		3	2	2		1										8	
		Ş		2	2	3	1											8	
	28. Gün	Ş+B		1		1	4	1	1										8
		Ş		1	2	1	2	1	1										8
	2. Ay	Ş+B									1		1		1	3	1	7	
		Ş										1			3	4		8	
	3. Ay	Ş+B								2	2	1			1	1		7	
		Ş					1		2		1	3						8	
	6. Ay	Ş+B				1	2	1	1		1		1					7	
		Ş						1	3		1	1	2					8	

Açıklama: 14. gün sonuçlarına göre simultane aşılama buzağuların 3/8'i bağışık iken sadece şap aşılama buzağuların 4/8'i bağışıktır. 28. günde simultane grup 6/8 oranında bağışık iken, sadece şap aşılması yapılan grup 4/8 oranında bağışıktır. 2. ve 3. ayda simultane grup 7/7, şap grubu 8/8 oranında bağışık, 6. ayda simultane grup 6/7, şap grubu 8/8 oranında bağışıktır. Gruplardaki hayvanlarda

korumayı sağlayan en düşük titre baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda grupların birbiri ile uyumlu sonuç gösterdiği düşünülmektedir. İstatistiki olarak yapılan karşılaştırmalarda eş zamanlı aşılama yapılan gruptaki hayvanlar ile yalnız şap aşılması yapılan grup arasında A tipi antikor titresini açısından istatistiki olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4. Parenteral brusella ve şap aşısı uygulanan kuzularda O tipi şap antikorlarının titre dağılımı

		<1/8	1/8	1/11	1/16	1/22	1/32	1/44	1/64	1/96	1/128	1/192	1/256	1/362	1/512	>1/512	n	
Şap O tipi antikor	14. Gün	Ş+B	5	1		1	3	9	5	7	1	3						35
		Ş		2	2	5	6	4	3	7	2	2	2					35
	28. Gün	Ş+B	6	2	4	3	4	6	2	8								35
		Ş	3	1	4	4	8	4	2	6	2	1						35
	2. Ay	Ş+B	1	5	6	4	5	3	4	4	2	1						35
		Ş		2	2		4	8	4	6	3	3	2					34
	3. Ay	Ş+B	3		3	3	6	5	3	2	4	2	1	3				35
		Ş	1	1	1	2	3	2	4	5	6	5	2		2			34
	6. Ay	Ş+B	5	1	2	6	3	4	4	2	2	1	2					32
		Ş	3	1	4	3	5	2	3	5	1	3	1	1				32

Açıklama: 14. gün sonuçlarına göre simultane aşılama kuzular 28/35 oranında bağışık iken sadece şap aşılama buzağuların 26/35 oranında bağışıktır. 28. günde simultane grup 20/35 oranında bağışık iken, sadece şap aşılama yapılan grup 23/35 oranında bağışıktır. 2. ayda simultane grup 19/35, şap grubu 30/34 oranında bağışık, 3. ayda simultane grup 26/35, şap grubu 29/34 oranında bağışık, 6. ayda simultane grup 18/32, şap grubu 21/32 oranında bağışıktır. Gruplardaki hayvanlarda korumayı sağlayan en düşük titre baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda genel olarak şap grubunun titrelerinin yüksek olduğu görülmektedir. Bunun

sebebi olarak simultane grupta maternal antikor gösteren hayvan 1/35 oranında iken şap grubunda 32/35 olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmadaki kuzuları yetiştiren işletme kayıtlarında kuzuların doğum tarihi bulunmadığından gruplandırılmada yaş esas alınamamıştır. Bu sebeple şap grubuna maternal antikor yüksek kuzular istegimiz dışında denk gelmiştir. 2. ayda eş zamanlı grubun O tipi antikor titresini yalnız şap aşılama yapılan grubun antikor titresinden istatistiki olarak düşük çıkmıştır ($p<0.05$). Bu durumda maternal antikor sebebi ile kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 5. Parenteral brusella ve şap aşısı uygulanan kuzularda A tipi şap antikorlarının titre dağılımı

		<1/8	1/8	1/11	1/16	1/22	1/32	1/44	1/64	1/96	1/128	1/192	1/256	1/362	1/512	>1/512	n	
Şap A tipi antikor	14. Gün	Ş+B	1		1	3	5	6	6	5	4	2	1				35	
		Ş	1	1	1	3	5	5	2	9	3	2	2				35	
	28. Gün	Ş+B	2	3		2	5	8	6	4	5						35	
		Ş	1	4	3	1	3	2	12	2	6		1				35	
	2. Ay	Ş+B						2	2		2	3	4	6	9	4	3	35
		Ş						1		2		2	5	6	7	9	2	34
	3. Ay	Ş+B		1		1	5	1	3	5	3	4	3	3	4	1	1	35
		Ş				1	1	1	6	6	6	3	1	4	1	4		34
	6. Ay	Ş+B	1		2		3	2	4	7	4	2	2	3	1		1	32
		Ş				2	1	1	4	3	6	4	7	2	1		1	32

Açıklama: 14. gün sonuçlarına göre simultane aşılama kuzuların 32/35'i bağışık iken sadece şap aşılama yapılan grupta kuzuların 31/35'i bağışıktır. Bu şekilde 28. günde simultane grup 28/35 oranında bağışık iken, sadece şap aşılama yapılan grup 26/35 oranında bağışıktır. 2. ayda simultane grup 35/35, şap grubu 34/34 oranında bağışık, 3. ayda simultane grup 33/35, şap grubu 33/34 oranında bağışık, 6. ayda simultane grup 29/32, şap grubu

30/32 oranında bağışıktır. Gruplardaki hayvanlarda korumayı sağlayan en düşük titre baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda genel olarak birbirine yakın koruma düzeylerinin sağlandığı görülmektedir. İstatistiki olarak yapılan karşılaştırmalarda eş zamanlı aşılama yapılan gruptaki hayvanlar ile yalnız şap aşılama yapılan grup arasında A tipi antikor titresini açısından istatistiki olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 6. Konjunktival brusella ve şap aşısı uygulanan buzağularda O tipi şap antikorlarının titre dağılımı

		<1/8	1/8	1/11	1/16	1/22	1/32	1/44	1/64	1/96	1/128	1/192	1/256	1/362	1/512	>1/512	n	
Şap O tipi antikor	14. Gün	Ş+B				1	1	2	3	1	3	4	5	3		8	31	
		Ş				1		1	1	2	2	3	3	4		12	29	
	28. Gün	Ş+B	4	3	5	6	2	3	1	3	2	1					30	
		Ş	7	3	3	4	3	2	5	1	1						29	
	2. Ay	Ş+B						1	2	3	2	9	5	5	1		2	30
		Ş				1	1	1	3	2	3	2	4	5			6	28

Açıklama: 14. gün sonuçlarına göre simultane aşılama buzağuların 31/31'i bağışık iken sadece şap aşılama buzağuların 29/29'u bağışıktır. 28. günde simultane grup 12/30 oranında bağışık iken, sadece şap aşılması yapılan grup 12/29 oranında bağışıktır. 28. günde şap aşısının rapeli yapılması ile 2. ayda simultane grup 30/30, şap grubu 27/28 oranında bağışık olmuştur. Gruplardaki hayvanlar-

da korumayı sağlayan en düşük titre baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda genel olarak birbirine yakın koruma düzeylerinin sağlandığı görülmektedir. İstatistiki olarak yapılan karşılaştırmalarda eş zamanlı aşılama yapılan gruptaki hayvanlar ile yalnız şap aşılması yapılan grup arasında O tipi antikor titresi açısından fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 7. Konjunktival brusella ve şap aşısı uygulanan buzağularda A tipi şap antikorlarının titre dağılımı

		<1/8	1/8	1/11	1/16	1/22	1/32	1/44	1/64	1/96	1/128	1/192	1/256	1/362	1/512	>1/512	n	
Şap A tipi antikor	14. Gün	Ş+B	3	3	4	2	5	3	1	2	3	1	1	1	1	1	31	
		Ş	4		4	3	2	6	2	1	2	1	3		1		29	
28. Gün		Ş+B		1	1	5	5	6	1	4		3	1	1			1	29
		Ş	2	1	1	3	5	5	5	1	3	3						29
2. Ay		Ş+B			1		1					3	2	10		14	31	
		Ş							1	2	1		6	5		14	29	

Açıklama: 14. gün sonuçlarına göre simultane aşılama buzağuların 21/31 oranında bağışık iken sadece şap aşılama buzağuların 18/29 oranında bağışıktır. 28. günde simultane grup 22/29 oranında bağışık iken, sadece şap aşılması yapılan grup 22/29 oranında bağışıktır. 2. ayda simultane grup 30/31 oranında şap grubu 29/29 oranında bağışıktır. Gruplardaki hayvanlarda korumayı sağlayan en düşük titre baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda genel olarak birbirine yakın koruma düzeylerinin sağlandığı görülmektedir. Eş zamanlı grubun antikor titresi ile yalnız şap aşılması yapılan grubun

antikor titresi arasında istatistiki olarak fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

Serum aglütinasyon testi sonuçları

Aglütinasyon testi ile brusella antikor titresi belirlenmiştir. Bu testte 1/10 antikor titresi humoral immün yanıtın kabul edildiği en küçük titre değeri olarak kabul edilmiştir. Parenteral çalışmada brusella maternal antikor bulunmazken, konjunktival çalışmada 3 hayvanda 1/10 titrede maternal antikor tespit edilmiştir. Bu hayvanlar gruplara homojen şekilde dağılmıştır.

Tablo 8. Parenteral brusella ve şap aşısı uygulanan buzağularda brusella antikor titre dağılımı

		<1/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	≥1/320	n sayısı
14. Gün	Ş+B				1	4	2	1	8
	B				1	1	2	3	7
28. Gün	Ş+B			2	2	3	1		8
	B			1	2	4			7
2. Ay	Ş+B	1	4	2					7
	B		1	6					7
3. Ay	Ş+B	1	5	1					7
	Ş	1	6						7
6. Ay	Ş+B	7							7
	B	6							6
12. Ay	Ş+B	5							5
	B	5							5

Açıklama: 14. gün ve 28. gün sonuçlarına göre hem simultane hem brusella aşısı yapılan gruptaki hayvanların tamamında immun yanıt şekillenmiştir. 2. ayda simultane grup 6/7, brusella grubu 7/7 oranında immun yanıt vermiştir. 3. ayda simultane grup ve brusella grubu 6/7 oranında immun yanıt vermiştir. 6 ve 12. Aylarda hayvanlarda immun yanıt belirlenememiştir. Bunun sebebi çalışmada kullanılan buzağuların 90-117 günlük olması ve brusella aşı-

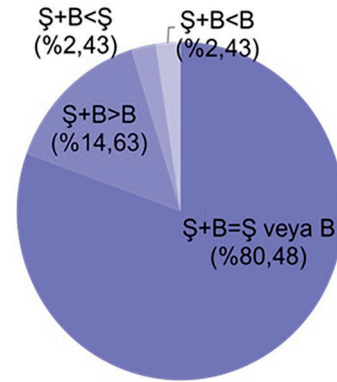
sında genç hayvanlardaki humoral immun yanıtın kısa sürmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Gruplardaki hayvanlarda korumayı sağlayan en düşük titre baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda genel olarak birbirine yakın koruma düzeylerinin sağlandığı görülmektedir. Sadece 2. ayda brusella grubu istatistiki olarak simultane gruptan daha yüksek titre değeri vermiştir ($p<0,05$).

Tablo 9. Parenteral brusella ve şap aşısı uygulanan kuzularda brusella antikor titre dağılımı

		<1/10	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	≥1/320	n sayısı
Brusella antikor	14. Gün	Ş+B	1	2	1	9	15	7	35
		B	1	1	1	12	15	4	34
	28. Gün	Ş+B			5	17	10	3	35
		B	2	2	3	16	9	2	34
	2. Ay	Ş+B	9	11	11	3			34
		B	11	10	9	3			33
	3. Ay	Ş+B	11	13	10				34
		B	18	11	2	1			32
	6. Ay	Ş+B	14	16	1				31
		B	21	9	1				31
	12. Ay	Ş+B	18	9					27
		B	17	6					23

Açıklama: 14. gün simultane grup 34/35 oranında, brusella grubu 33/34 oranında ve 28. gün sonuçlarına göre simultane grup 35/35 oranında brusella grubu 32/34 oranında, 2. ay simultane grup 25/34 oranında brusella grubu 22/33 oranında, brusella grubu 22/33 oranında, 3. ay simultane grup 23/34 oranında, brusella grubu 14/32 oranında, 6. ay simultane grup 17/31 oranında brusella grubu 10/31 oranında, 12. ay simultane grup 9/27, brusella grubu 6/23 oranında immun yanıt göstermiştir. İmmun yanıtın bu kadar uzun sürmesinin sebebi kuzuların 3-6 aylık olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Gruplardaki kuzularda immun yanıt baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda genel olarak simultane grupta daha yüksek immun yanıt alındığı görülmektedir. Tüm karşılaştırmalarda eş zamanlı gruptan istatistiki olarak daha yüksek antikor titresini elde edilmiştir (tüm gruplarda $p<0,005$).

Tablo 10. Konjunktival brusella ve şap aşısı uygulanan buzağularda brusella antikor titre dağılımı



Şekil 1. Grup karşılaştırmalarının yüzdesel değerleri.

Çalışmanın yapıldığı grupların 41 adet karşılaştırmasında istatistiksel olarak %80,48'inde (33 adet) simultane aşılama ile tek aşılama yapılan grup arasında farklılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Grupların %14,63'ünde (6 adet) Parenteral Brusella ve Şap aşısı uygulanan kuzularda 14. gün, 28. gün, 2. ay, 3. ay ve 12. ayın kan numunelerinde simultane grubun brusella antikor titresini sadece brusella aşısı yapılan grubun antikor titresine göre istatistiki

olarak yüksektir ($p<0.05$). Grupların %2,43'ünde (1 adet) Parenteral Brusella ve Şap aşısı uygulanan kuzularda 2. ayda O tipi şap antikor titresi simultane aşılana grubun antikor titresinden istatistiki olarak yüksektir ($p<0.05$). Bunun sebebi olarak simultane grupta maternal antikor gösteren hayvan 1/35 oranında iken şap grubunda 32/35 olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmadaki kuzuları yetiştiren işletme kayıtlarında kuzuların doğum tarihi bulunmadığından gruplandırma yaş esas alınama-

mıştır. Gruplardan %2,43'ünde (1 adet) Parenteral Brusella ve Şap aşısı uygulanan buzağılarda 2. ayda Brusella grubunun antikor titresi simultane aşılana grubun antikor titresinden istatistiki olarak yüksektir ($p<0.05$).

Karşılaştırmaların 33 adedinde $p>0.05$ bulunarak gruplar arası istatistiki fark bulunmamıştır. $p<0,05$ sonucu ile istatistiki fark olan 8 gruptaki istatistiki analiz sonuçları şu şekildedir:

Tablo 11. İstatistiki sonuçlar

Brusella ve şap aşı grupları	Grup	Arit. ort.	Standart sapma	p değeri	Sonuç
Parenteral brusella ve şap buzağı	Ş+B	1,0429	0,20702	0,033	(B >Ş+B)
2. Ay brusella antikor titresi karşılaştırma	B	1,2571	0,11339	0,039	
Parenteral brusella ve şap kuzu	Ş+B	1,3403	0,39855	0,002	(Ş >Ş+B)
2. Ay O tipi şap antikor titresi karşılaştırma	Ş	1,6321	0,36231	0,002	
Şap ve parenteral brusella kuzu	Ş+B	2,1074	0,49476	0,000	(Ş+B >B)
14. Gün brusella antikor titresi karşılaştırma	B	2,0688	0,42758	0,000	
Şap ve parenteral brusella kuzu	Ş+B	1,6943	0,24964	0,003	(Ş+B >B)
28. Gün brusella antikor titresi karşılaştırma	B	1,6000	0,35420	0,003	
Şap ve parenteral brusella kuzu	Ş+B	1,0176	0,26568	0,007	(Ş+B >B)
2. Ay brusella antikor titresi karşılaştırma	B	1,0455	0,31927	0,007	
Şap ve parenteral brusella kuzu	Ş+B	0,9912	0,23915	0,000	(Ş+B >B)
3. Ay brusella antikor titresi karşılaştırma	B	0,8688	0,22781	0,000	
Şap ve parenteral brusella kuzu	Ş+B	0,8742	0,16925	0,000	(Ş+B >B)
6. Ay brusella antikor titresi karşılaştırma	B	0,8065	0,16520	0,000	
Şap ve parenteral brusella kuzu	Ş+B	0,8000	0,14412	0,000	(Ş+B >B)
12. Ay brusella antikor titresi karşılaştırma	B	0,7783	0,13469	0,001	

Tartışma ve Sonuç

Serum nötralizasyon test sonuçlarına göre buzağılarda uygulanan şap ve parenteral brusella aşılama- larında 6. ay sonuçları O tipi antikor titreleri A tipine sonuçlarına göre nispeten daha düşük çıkmıştır. Bu durum O tipi virüs yapısından kaynaklanan genel olarak O tipinde bağışıklığın kısa sürmesinden kaynaklanmaktadır. Şap ve parenteral brusella aşıları uygulanan kuzulardaki O ve A tipi antikor titre- lerinin buzağılardaki antikor titrelerinden nispeten yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum kuzuların 3-6 aylık yaşta olması, buzağuların 90-117 günlük olması ile kuzuların yaşları sebebi ile immun sis- temlerinin daha gelişmiş olması ile izah edilebil- mektedir. Keza aynı sebepten konjunktival brusella çalışmasında kullanılan buzağuların 95-178 günlük

olması parenteral çalışmada kullanılan 90-117 gün- lük buzağılardan daha yüksek şap antikor titresi elde edilmesine yol açmıştır. Parenteral brusella ve şap aşısı uygulanan kuzuların 2. ayda O tipi şap an- tikor titresi sadece şap aşılması yapılan grubun an- tikor titresinden istatistiki olarak düşüktür. Bunun, simultane grupta maternal antikor gösteren hayvan 1/35 oranında iken şap grubunda 32/35 olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmadaki kuzu- ları yetiştiren işletme kayıtlarında kuzuların doğum tarihi bulunmadığından gruplandırma yaş esas alınmamıştır. İlk aşının yapıldığı gün aynı zaman- da 0. gün kanları alındığından şap grubuna maternal antikor olan kuzular tesadüfi olarak bir araya gel- miştir.

Serum aglütinasyon test sonuçlarına göre buzağılardaki parenteral aşılamada brusella antikorları 3. aydan sonra titre vermezken konjuktival aşılamada 28. günden sonra titre vermemiştir. Bu konjuktival aşı içerisindeki CFU (colony forming unit) ile ilgili beklenen bir durumdur. Kuzulardaki parenteral brusella antikorlarının 12. ayda dahi tespit edilmesi çalışmaya alınan kuzuların 3-6 aylık olması ve yaşları sebebi ile daha güçlü immun yanıt oluşturabilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Parenteral brusella ve şap aşısı uygulanan kuzularda 14. gün, 28. gün, 2. ay, 3. ay, 6. ay ve 12. ayın kan numunelerinde simultane grubun brusella antikor titresini sadece brusella aşısı yapılan grubun antikor titresine göre istatistiki olarak yüksektir. Bu durumun şap aşısının yağ adjuvantı sayesinde olduğu düşünülmektedir. Adjuvantlar aşılarda depo etkisi oluşturarak immun sistemi daha fazla uyarmak için kullanılmaktadırlar. Adjuvantlar makrofajları stimule ederek elde edilen immunglobulin miktarını arttırmaktadırlar. Boersma ve arkadaşlarının [5] yaptığı çalışmaya göre yağlı adjuvantların uygulanmasında IL-1 en ön plana çıkan sitokindir. İnterlökinler hem humoral hem hücrel immun yanıtın artmasında etkili olmaktadır. Allison ve ark. [1] yaptığı çalışmaya göre yağlı adjuvantlar interlökinler üzerindeki etkisi ile humoral yanıtta IgG1 cevabını arttırmaktadır. Brusella antikor titre tespiti için yapılan aglütinasyon testinde simultane aşılamada brusella antikor titresinin tek yapılan aşılamaya göre daha yüksek bulunmasının sebebi yağ adjuvantının interlökinler üzerindeki etkisi ile Ig oluşumunu arttırması olarak düşünülmektedir. Ayrıca Mastan ve arkadaşlarının [16] kobaylarda yaptığı çalışmaya göre canlı brucella S-19 ve şap aşıları gerek simultane gerekse kombine olarak uygulandığında tek yapılan canlı brusella aşılmasına göre daha iyi epruvasyon sonuçları vermiştir. Ayrıca canlı brusella S19 ile kombine şap aşılarının inaktif brusella S19 ile kombine şap aşılara göre titre değerleri ve epruvasyon değerleri daha yüksek çıkmıştır. Bu durum şap aşısı içerisindeki yağ adjuvantının interlökinler aracılığı ile hücrel immunite üzerindeki etkisini göstermekte ve çalışmamız ile aynı sonucu paylaşmaktadır. Başka bir çalışmada De Clercq ve ark. [8] domuz yavrularına inaktif, adjuvantlı şap ve attenüe klasik domuz ateşi aşılarını simultane uygulamışlardır. Simultane yapılan aşılamada klasik

domuz ateşine karşı oluşan antikor miktarı tek aşı yapılan gruba göre daha yüksek elde edilmiştir. Bu çalışma da bulduğumuz sonucu desteklemektedir.

Sonuç olarak çalışmada brusella ve şap aşılarının simultane olarak uygulanmasında şap aşısı açısından bir titre kaybı olmadığı belirlenmiştir. Brusella ve şap aşılarının eş zamanlı uygulanmasında brusellaya karşı oluşan humoral yanıt olumlu etkilenip daha yüksek antikor titresini vermiştir. Brusella aşısı attenüe bir aşı olduğundan hücrel immunite ile bağışıklık oluşturmaktadır. Humoral immunite de şekillenmektedir. Brucella aşısı ile elde edilen hücrel immunite günümüzde herhangi bir test ile tespit edilememektedir. Aynı zamanda yeterli olanaklar olmaması nedeni ile brusella aşısının epruvasyon çalışması yapılamamıştır.

Teşekkür

Değerli destekleri için Şap Enstitüsü İdaresi'ne, Şap Enstitüsü Epidemiyoloji Ünitesi ve Kalite Kontrol Bölümü çalışanlarına, TAGEM'e, TİGEM'e, Altınova Tarım İşletmesi Müdürlüğü'ne ve Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- 1-Allison AC., Byars NE., 1991. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. *Mol Immunol*, 28, 279-84.
- 2-Altay G., 2008. Kültür pozitif 70 bruselloz hastasının klinik ve laboratuvar verilerinin değerlendirilmesi, Antibiyotik duyarlılıklarının e-test yöntemi ile incelenmesi. http://www.istanbul saglik.gov.tr/w/tez/pdf/enfeksiyon/dr_gulustan_altay.pdf Erişim Tarihi: 17.01.2010.
- 3-Anonim, 2010. Şap Hastalığı. http://www.kkkgm.gov.tr/birim/hay_sagl/Hastaliklar/sapy.html Erişim Tarihi: 17.01.2010.
- 4-Aslantaş Ö., 2006. Sığır brusellozis'inin allerjik deri testleri ile teşhisi üzerinde çalışmalar. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 12, 57-61.
- 5-Boersma WJA., Bogaerts WJC, Bianchi ATJ., Claassen E., 1992. Adjuvant properties of stable water-in-oil emulsions: evaluation of the experience with Specol. *Res Immunol*, 143, 503-512.
- 6-Castaneda J., Espinoza M., Bernel C., Jimenez J., Aguirre L., 1976. Simultaneous vaccination of cattle with against foot and mouth disease and stomatitis live virus vaccines. *Dev Biol Stand*, 35, 429-36.
- 7-Davies G., 2002. Foot and mouth disease review. *Res Vet Sci*, 73, 195-199.
- 8-De Clercq K., Koenen F., Strobbe R., Debecq J., 1989. Simultaneous vaccination of piglets against foot-and-

- mouth disease and classical swine fever. *Vet Microbiol*, 20, 215-221.
- 9-Favre H., Valette L., Precausta P., Roulet C., Brun A., Terre J., Fontaine J., Stellmann C., 1976. Les vaccines antiaphteux associes a dautres vaccines bacteries ou viraux. *Dev Biol Stand*, 35, 409-428.
- 10-Hedger RS., Taylor WP., Barnett TR., Riek R., Harpham D., 1986. Simultaneous vaccination of cattle against rinder pest and FMD. *Trop Anim Hith Prod*, 21-25.
- 11-Ivanyi TS., Kucsera G., Tubaly S., Bognar K., Kiss S., Bernath Z., 1981. Immunogenicity of attenuated VD and inactivated FMD vaccines applied alone or simultaneously. *Magyar Allotorvosok Lapja*, 36, 369-373.
- 12-Kitching RP., 2002a. Clinical variation in foot and mouth disease: Cattle. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 21, 499-504.
- 13-Kitching RP., 2002b. Future resarch on foot and mouth disease. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 21, 885-889.
- 14-Küçükayan U., Dakman A., Ülker U., Müştak K., 2007. Koyun kan serumları ve fetusların bakteriyel atık etkenleri yönünden incelenmesi. *Etlik Vet Mik Derg*, 18, 11-16.
- 15-Mahy BWJ., 2005. Foot and mouth disease virus. Springer Limited, Berlin, s. 133-135.
- 16-Mastan MB., Amighi M., Ardelan A., Bandpay MR., Ebadi A., Farsi J., 1976. Preliminary study of the combination of anti-foot-and-mouth disease and anti-brucellosis vaccines. *Dev Biol Stand*, 35, 437-43.
- 17-Srinivas K., Babu N., Kant R., Rahasekhar M., Kumar M., 1996. Simultaneous vaccination against foot and mouth disease. *Indian Jour of Vir*, 12, 33-7.
- 18-Stevens MG., Hennager SG., Olsen SC., Cheville NF., 1993. Serologic respons in diagnostic tests for brucellosis in cattle vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *J Clinic Microbiol*, 1065-1066.
- 19-Şap Enstitüsü Protokolü p:D/9.1.
- 20-Ünver A., Erdoğan HM., Atabay Hİ., Şahin M., Güneş V., Çıtıl M., Gökçe Hİ., 2006. Sığır atıklarından izole edilen *Brucella* türlerinin RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 12, 121-127.