RESEARCH ARTICLE

Farelerde sığır immünglobulin G'sinin *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı etkinliği

Hasan Hüseyin Hadimli^{1*}, Gökçenur Sanioğlu Gölen², Zafer Sayın¹

¹Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Alaaddin Keykubat, Yerleşkesi, 42075, Konya, Türkiye,

²Aksaray Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 68100, Aksaray, Türkiye

Geliş: 26.12.2016, Kabul: 06.02.2017

*hhadimli@selcuk.edu.tr

Effectiveness of bovine immunoglobulin G against *Salmonella* infections in mice

Eurasian J Vet Sci, 2017, 33, 2, 81-88

DOI:10.15312/EurasianJvetSci.2017.141

Öz

Amaç: Bu çalışmada, farelerde *Salmonella Dublin*, *S. Typhimurium*, *S. Kentucky* veya *S. Anatum* tarafından oluşturulan *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı sığır immünglobulin G'sinin (IgG) etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Sığırlar inaktif monovalan, bivalan ve kombine *Salmonella* aşılı ile 21 gün arayla 3 kez aşılandılar. Son aşılamadan 10 gün sonra, aşılanan sığırlardan kan örnekleri toplandı ve *Salmonella* antijenlerine karşı şekillenmiş antikor titreleri mikro Serum Aglutinasyon testi ile belirlendi. Toplam 100 fareye (toplam 10 grup ve her grupta 10 fare) *Salmonella* türleri ile oral yolla çelinç yapıldı. Çelinç sonrası, farelere oral yolla IgG verildi. Fareler 20 gün boyunca hastalık oluşumu ve ölüm yönünden gözlemlendi. Aynı zamanda, dışkı ile *Salmonella* türlerinin saçılımı üzerine IgG'nin etkisini belirlemek için dışkı örnekleri analiz edildi.

Bulgular: Sığır kanlarında aşılama sonrası oluşan antikor titrelerinin aşılama öncesi ve kontrollere göre yüksek olduğu bulundu. Aşı gruplarında hastalık oluşumu ve ölüm sayıları kombine aşı grubunda 9 (6 *S. Dublin*, 2 *S. Typhimurium* ve 1 *S. Kentucky*), bivalan aşı grubunda 3 (3 *S. Typhimurium*) ve monovalan aşı grubunda 2 (1'er *S. Anatum* ve *S. Kentucky*) olarak belirlendi. Bütün aşı gruplarında farelerin iç organlarından ve dışkı örneklerinden *Salmonella* türlerinin geri izolasyon sayıları düşük bulundu.

Öneri: Sonuç olarak, *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı sığır IgG'sinin koruyucu olarak faydalı ancak sınırlı bir etkinliği olduğu gözlemlendi.

Anahtar kelime; Pasif bağışıklık, *Salmonella*, IgG, fare

Abstract

Aim: This study was aimed to determination of effectiveness of the bovine Immunoglobuline G (IgG) against *Salmonella* infections caused by *Salmonella Dublin*, *S. Typhimurium*, *S. Kentucky* or *S. Anatum*.

Materials and Methods: Cattle were immunized with inactive monovalent, bivalent and combined *Salmonella* vaccines, three times at 21 days intervals. Immunized cattle blood samples were collected at 10 days after last vaccination and titres of IgG to *Salmonella* antigens were measured micro Serum Agglutination Test. A total of 100 mice (total 10 vaccine groups and each group included 10 mice) were challenged with *Salmonella* strains by oral route. After challenge, IgG to mice were administrated by oral route. Mice were observed for occurrence of morbidity and mortality for 20 days. Also, fecal samples were analyzed to determination influence of IgG on spread of *Salmonella* species by faeces.

Results: The antibodies titres in blood of immunized cattle were found to be high than before vaccination and controls. The numbers of morbidity and mortality in groups of vaccine were determined as 9 in combined vaccine (6 in *S. Dublin*, 2 in *S. Typhimurium* and 1 in *S. Kentucky*), 3 in bivalent vaccine (in *S. Typhimurium*), and 2 in monovalent (1 in *S. Anatum* and *S. Kentucky*). The re-isolation number of *Salmonella* strains were lower from internal organs and fecal samples of mice in all groups.

Conclusion: In conclusion, it was observed that IgG of immunized cattle is can be useful for protection against *Salmonella* infections, but limited.

Key words; Passive immunity, *Salmonella*, IgG, mice,

Giriş

Pasif bağışıklık, bir başka bireyde oluşan bağışıklığın ihtiyaç duyulan canlıya aktarılmasıdır. Özellikle yeni doğan canlıları immün sistemi gelişinceye kadar geçen sürede çevresel patojen etkenlere karşı korumaktadır (Keller 2000, Chiwerge ve Tyler 2010). Yeni ortaya çıkan hastalıklar ve antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalar, ilaç tedavisine cevap vermeyen hastalıklar ve bireysel olarak immün sistemi baskılanmış hastalarda aşılardan istenilen immün cevabın alınamadığı durumlarında pasif bağışıklık önemli olmaktadır (Besser ve ark 1988, Gupta ve ark 2001, Figuerido ve ark 2004, Zarcula ve ark 2008, Ahmad ve ark 2011, Barman ve ark 2014). Bununla birlikte, pasif olarak verilen antikorlar hızlı bir koruma sağlamaktadır. Damızlıklarda ve dirençli mikroorganizmaların bulunması durumunda, antibiyotik kullanımının azaltılmasında, tedavisi güç olan enfeksiyonlar, hayvanlardan insanlara geçebilen hastalıkların veya biyolojik teröre sebep olan mikroorganizmalardan korunmada spesifik etkenlere karşı hazırlanmış hiperimmün serumlar sıklıkla uygulanmaktadır (Bock ve Milcke-Ungehever 1988, Casadevall 2002).

Maternal bağışıklığın serum yada kolostrum ile aktarılması ruminantlarda önemlidir. Çünkü, gebelik döneminde anneden yavrusuna antikor geçişi olmamaktadır. Yeni doğan hayvanların immün sistemleri gelişmediğinden ve agammaglobulinemik doğmalarından dolayı annelerinde oluşan maternal bağışıklığın aktarılması gerekmektedir.

Süt ineklerinde oluşan bağışıklık kolostrum veya serum ile buzağılara aktarılmaktadır (Toye ve ark 2013). Agammaglobulinemik yeni doğan hayvanlara immüoglobulinlerin parenteral verilmesi özellikle septisemi ile seyreden etkenlere karşı koruma sağlayabilir (Keller ve Stiehm 2000). Diğer yandan, genç hayvanlara oral olarak verilen spesifik kolostrum, süt veya serum Ig'lerinin emilimi ile patojen mikroorganizmalar nötralize edilebilir ve enteritise seyreden enfeksiyonlar durdurulabilir (Zarcula ve ark 2008, Toye ve ark 2013).

Salmonella enterica subsp. *enterica* türleri birçok klinik belirti ile seyreden enfeksiyonlar yanı sıra asemptomatik taşıyıcılık, ishal ve septisemi ile seyreden sistemik enfeksiyonlar ve şiddetli vakalarda ölüme sebep olabilmektedir (Smith-Palmer ve 2003, Assia ve ark 2007). Bütün yaşlardaki sığırlarda hastalık gözlenmekle birlikte daha çok 2 haftalıktan 3 aya kadar olan buzağıları klinik olarak etkilemektedir (Rice ve ark 1997, Berge ve ark 2008). *Salmonella* enfeksiyonları gençlerde akut olarak ve yetişkin sığırlarda subklinik seyretilmektedir. *Salmonella* türleri hücre içi mikroorganizmalar olmasından dolayı antibiyotiklerle tedaviden çoğunlukla istenilen sonuçlar alınamamaktadır. Bu nedenle, *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı koruyucu tedbirlerin alınması gerekmektedir (Jones ve ark 1988).

Bu çalışmada, farelerde *S. Dublin*, *S. Typhimurium*, *S. Kentucky* veya *S. Anatum* tarafından oluşturulan *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı sığır immüoglobulin G'sinin (IgG) etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Salmonella aşılı

Türkiye'de farklı bölgelerden süt işletmelerinde bulunan süt inekleri ve buzağı dışkılarından izole edilen *Salmonella* izolatlarından inaktif *Salmonella* monovalan (*S. Dublin*, *S. Typhimurium*, *S. Anatum* ve *S. Kentucky*), bivalan (*S. Dublin*, *S. Typhimurium*) ve kombine (*S. Dublin*, *S. Typhimurium*, *S. Anatum* ve *S. Kentucky*) aşılı TÜBİTAK-TOVAG 1120324 nolu proje kapsamında tarafımızdan hazırlandı (Erganiş ve ark, 2003, Hadimli ve ark, 2011).

Sığırların immünize edilmesi ve IgG üretimi

Salmonella antijenlerine karşı yüksek titrede antikor elde etmek için toplamda 12 sığır (monovalan aşı 4x2=8, bivalan aşı 2, kombine aşı 2) 21 gün ara ile 3 kez *Salmonella* monovalan, bivalan ve kombine aşılı ile deri yolla aşılandılar. Son aşılamadan 10 gün sonra kan örnekleri alındı ve mSAT ile antikor titreleri ölçüldü. Ayrıca, aşısız 2 hayvandan da kan örnekleri alındı (Erganiş ve ark 2003).

IgG titrelerinin mSAT ile belirlenmesi

Salmonella suşları (*Dublin*, *Typhimurium*, *Anatum* ve *Kentucky*) her biri ayrı ayrı Brain-Heart Infusion Broth'a (Oxoid) ekildi ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 4500 rpm'de 30 dak santrifüjle toplandı ve supernatant atıldı. Bakteriler tamponlu fosfatlı su ile (PBS) ile 3 kez yıkandı. Mikroorganizma konsantrasyonları 1x10⁷ bakteri/ml ayarlandı ve %0.5 formalin ile inaktive edildi. Mikroorganizma süspansiyonları serum aglütinasyon test antijeni olarak kullanıldı.

Salmonella aşılı (kombine, bivalan ve monovalan) ile aşılanan sığırlarda IgG titrelerini belirlemek için; her bir *Salmonella* aşısı ve antijeni için ayrı ayrı antikor titreleri ölçüldü. mSAT 96 gözlü mikropleytlerde yapıldı. Önce, 1. çukurcuklara 80 l, diğerlerine 50 l fizyolojik tuzlu su kondu. Birinci çukurcuğa test edilecek serumdan 20 l ilave edildi, karıştırıldı ve 2. çukurcuğa 50 l aktarıldı. Serum sulandırması (1/10, 1/20, 1/40, ..., 1/20480) son tüpe kadar yapıldı. Daha sonra tüm çukurcuklara 50 l SAT antijeni ilave edildi ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Serum sulandırmaları 1/10=1, 1/20=2, 1/40=3..., şeklinde numerik rakamlara çevrildi ve geometrik ortalamaları değerlendirildi (Erganiş ve ark, 2003).

Aşısız farelerde IgG'nin koruma testleri

Farelere (10x10=100), LD50 değerinde canlı *S. Dublin*, *S. Typhimurium*, *S. Kentucky*, ve *S. Anatum* suşları oral olarak verildi ve daha sonra 10'ar fareye 2, 6, 12, 24 ve 48 saat sonra Salmonella aşılı ile immunize edilen sığırların serumları (IgG) belirli titrelerde olarak verildi. Canlı Salmonella antijenleri verilen 10 fare negatif kontrol olarak tutuldu. Fareler 20 gün boyunca gözlemlendi. Ölen yada uyutulan farelerin iç organlarından (dalak, kalp, karaciğer, akciğer ve böbrek) mikrobiyolojik ekimler yapıldı (Hadimli ve ark 2007, Hadimli ve ark 2014).

Farelerde dışkı ile etkenin saçılımının belirlenmesi

Canlı Salmonella antijenleri ve IgG verilen ve verilmeyen farelerin dışkı örnekleri 2 gün aralıkla toplandı ve Salmonella türlerinin geri izolasyonu yapıldı. Dışkı örnekleri ön zenginleştirme için tamponlanmış peptonlu suya ekildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra, zenginleştirmek için 1 ml örnek Rappaport Vasilliadis Mediuma (Lab M Limited) geçildi ve 24 saat 42°C'de inkübe edildi. Son olarak, örnekler XLT-4 (Lab M Limited) agara pasajlandı ve 37°C'de 24-48 saat kültüre edildi (Kalender 2002, Maddoks ve ark 2002).

İstatistiksel analizler

Gruplar arasındaki farklılıklar x2 ve varyans analiz testleri ile yapıldı. Aynı zamanda, gruplar arasındaki farklılıkların önemi SPSS 22.00 programında Kruskal Wallis ve Duncan testleri ile analize edildi.

Bulgular

Kombine *Salmonella* aşısı ile immunize edilen sığırların IgG'leri verilen farelerde; *S. Dublin* antijeni ile çelinde 6 farede, *S. Typhimurium* antijeni ile çelinde 2 ve *S. Kentucky* antijeni ile çelinde 1 farede hastalık oluşumu ve ölüm vakaları gözlemlendi. Bununla birlikte, *S. Anatum* antijeni ile çelinde hastalık oluşumu ve ölüm tespit edilmedi (Tablo 2).

Bivalan *Salmonella* aşısı ile immunize edilen sığırların IgG'leri verilen farelerde; *S. Typhimurium* antijeni ile çelinde 3 farede hastalık oluşumu ve ölüm gözlenirken, *S. Typhimurium* antijeni ile çelinde herhangi bir hastalık ve ölüm belirlenmedi (Tablo 2).

Monovalan *Salmonella* aşılı ile aşıl原因an sığırların IgG'leri verilen farelerde; *S. Anatum* ve *S. Kentucky* antijenleri ile çelinde 1'er farede hastalık oluşumu ve ölüm gözlenirken *S. Dublin* ve *S. Typhimurium* antijenleri ile çelinde herhangi bir hastalık oluşumu ve ölüm gözlenmedi (Tablo 2).

Salmonella antijenleri ile çelince yapılan ve kombine *Salmonella* aşısı ile immunize edilen sığırların IgG'lerinin verildiği farelerin iç organlarında; en fazla *S. Dublin* izolatının geri izo-

Tablo 1. *Salmonella* aşılı ile aşıl原因an sığırlarda antikor titreleri (mSAT)

Aşı	Antijen	Antikor titresi
Kombine	Dublin	6 ^a
	Typhimurium	4 ^b
	Anatum	7,5 ^a
	Kentucky	4,5 ^b
Bivalan	Dublin	6 ^a
	Typhimurium	5 ^a
Monovalan	Dublin	7,5 ^a
	Typhimurium	7,5 ^a
	Anatum	8 ^a
	Kentucky	8 ^a
Monovalan	Dublin	0 ^c
	Typhimurium	0 ^c
Kontrol	Anatum	0 ^c
	Kentucky	0 ^c

*a,b,c; aynı sütunda farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki farklılıklar önemli idi ($p<0.05$). Kontrol grubu ile karşılaştırılınca, *Salmonella* aşılı ile aşıl原因an sığırların kan serumlarında *Salmonella* antijenlerine karşı yüksek titrede antikorların varlığı belirlendi. Bununla birlikte, en yüksek antikor titresi monovalan *Salmonella* aşılı ile elde edildi (Tablo 1).

lasyonu yapıldı. Bununla birlikte, *S. Typhimurium* ve *S. Kentucky* izolatlarında da geri izolasyon gerçekleştirildi (Tablo 3).

Bivalan *Salmonella* aşısı ile immunize edilen sığırların IgG'si verilen farelerde ise en fazla *S. Typhimurium* izolatının geri izolasyonu gerçekleştirildi (Tablo 3).

Monovalan *Salmonella* aşılı ile immunize edilen sığırların IgG'leri verilen farelerde ise en fazla *S. Kentucky* geri izole edilirken, 1'er farede *S. Dublin* ve *S. Anatum* geri izolasyonu gerçekleştirildi (Tablo 3).

Salmonella canlı antijenleri ve *Salmonella* aşılı ile immunize edilen sığırların IgG'lerinin verilmesi sonrası 20. güne kadar alınan dışkı örneklerinde; hemen hemen tüm gruplarda *Salmonella* izolatlarının saçılımı tespit edildi. Dışkı ile en fazla saçılımın *S. Dublin* izolatında olduğu ve en az saçılımın ise *S. Anatum* izolatında olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında IgG uygulanan farelerin dışkı örneklerinden *Salmonella* türlerinin geri izolasyon oranlarının daha düşük olduğu belirlendi (Tablo 4).

Tartışma

Antikorlar, hastalıkların tedavisi ve önlenmesi için uzun bir süredir kullanılmaktadır. Bakteriyel hastalıklarda antikorlar toksinleri nötralize eder, opsonizasyon kabiliyeti vardır ve komplement ile birlikte bakteriyolizis oluştururlar.

Tablo 2. *Salmonella* suşları ile çelinc yapılan ve IgG verilen farelerde hastalık ve ölüm sonuçları*

Aşı	Antijen	n	Hastalık Koruma %	n	Ölüm Koruma %
Kombine	Dublin	6/10*	40	6/10**	40
	Typhimurium	2/10	80	2/10	80
	Anatum	0/10	100	0/10	100
	Kentucky	1/10	90	1/10	90
Bivalan	Dublin	0/10	100	0/10	100
	Typhimurium	3/10	70	3/10	70
Monovalan	Dublin	0/10	100	0/10	100
Monovalan	Typhimurium	0/10	100	0/10	100
Monovalan	Anatum	1/10	90	1/10	90
Monovalan	Kentucky	1/10	90	1/10	90
Kontrol	Dublin	6/10	40	6/10	40
	Typhimurium	5/10	50	5/10	50
	Anatum	5/10	50	4/10	60
	Kentucky	5/10	50	4/10	60
	Dublin	$X^2=16,71$ $P<0,001$		$X^2=16,71$ $P<0,001$	
	Typhimurium	$X^2=6,76$ $P>0,05$		$X^2=6,76$ $P>0,05$	
	Anatum	$X^2=8,46$ $P<0,01$		$X^2=6,03$ $P<0,05$	
	Kentucky	$X^2=5,76$ $P<0,005$		$X^2=3,63$ $P>0,05$	

*hastalanan sayısı/toplam sayı; **ölen sayısı/toplam sayı

Antibiyotiklerin kullanılmasından önce antikorlar belirli hastalıkların tedavisi için tek seçeneklerdi. Antibiyotiklerin yaygın kullanılmasına rağmen antikorların bu kritik rolleri devam etmiştir (Ikemori ve ark 2007, Toye ve ark 2013). Bununla birlikte, biyoterörizme sebep olabilecek patojenlere (antraks, çiçek, botulinum toksini, tularemi, veba) karşı spesifik antikorlar aktiftir ve bu tür saldırılarda korunmak için kullanılabilirler (Casadevall 2002). Antikorlar insan veya hayvan plazması veya serum olarak canlılara verilmektedir. Dolayısıyla, geçmiş dönemde olduğu gibi günümüzde de pasif bağışıklık hastalıklarla mücadelede hala geçerliliğini koruyan bir uygulamadır. Annelerin immünizasyonu yeni doğan buzağılarda pasif koruma sağlayabilmektedir. Yeni doğan buzağılara aktarılan IgG'ler bakterilerin kolonizasyonunu bloke ederek hastalığın oluşumunu önleyebilmektedir (Jayappa ve ark 2008).

Salmonella türlerinin oluşturduğu yeni doğanların ishalleri önemlidir (Hadimli ve ark 2011). Annelerinin aşılınması ve buzağılara pasif bağışıklığın aktarılması ile ishallerin önlenmesi açısından bazı başarıları gösterilmiştir (Jones

ve ark 1988). Özellikle doğuma 3 hafta kala *S. Dublin* inaktif aşı ile süt ineklerinin aşılandığı ve kolostrumları verilen buzağıların kan serumlarında kontrollere göre yüksek titrede antikorlar belirlendiği bildirilmiştir. Sonuç olarak, *S. Dublin* aşısı ile aşılanan süt ineklerinden kolostrum alan buzağılarda *S. Dublin* spesifik antikorların *Salmonella* ishallerini önlediği bildirilmiştir (Smith ve ark 2015).

Çeşitli hastalıklara karşı koruma amaçlı bağışıklık 2 şekilde oluşturulabilir; Birincisi, aşılama ile aktif bağışıklama ve ikincisi aşı hayvanlarda şekillenen bağışıklığın hiperimmün serum yada kolostrumla birlikte aktarılması ile pasif bağışıklama. Pasif bağışıklık, özellikle botulismus, tetanoz, difteri, kuduz, yılan ısırması ve akrep sokmalarına karşı sıklıkla kullanılmaktadır. Bock ve Milcke-Ungehever (1988), kuduz vakalarında hiper immün serumlar ve aşının birlikte kullanıldığını belirtmişlerdir. Tek başına hiper immün serum verilen farelerde hayatta kalma oranının %29,3, aşı ile birlikte hiper immün uygulanan farelerde %40,7 ve aşı uygulanan farelerde %84 olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak, hiper immün serum ve aşı uygulama zamanının önemli olduğu ve

Tablo 3. *Salmonella* suşları ile çelinc yapılan ve IgG verilen farelerin iç organlarından *Salmonella* türlerinin geri izolasyonu

Aşı	Antijen	Karaciğer		Dalak		Böbrek		Kalp		Akciğer		Barsak	
		n**	%*	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Kombine	Dublin	6/10	40	7/10	30	6/10	40	6/10	40	6/10	40	6/10	40
	Typhimurium	2/10	80	2/10	80	2/10	80	2/10	80	2/10	80	2/10	80
	Anatum	0/10	100	0/10	100	0/10	100	0/10	100	0/10	100	0/10	100
	Kentucky	1/10	90	2/10	80	1/10	90	1/10	90	2/10	80	2/10	80
Bivalan	Dublin	0/10	100	0/10	100	0/10	100	0/10	100	0/10	100	0/10	100
	Typhimurium	4/10	60	6/10	40	4/10	60	3/10	70	4/10	60	5/10	50
Monovalan	Dublin	0/10	100	0/10	100	0/10	100	1/10	90	0/10	100	2/10	80
Monovalan	Typhimurium	0/10	100	0/10	100	0/10	100	0/10	100	0/10	100	0/10	100
Monovalan	Anatum	1/10	90	1/10	90	1/10	90	1/10	90	1/10	90	1/10	90
Monovalan	Kentucky	1/10	90	3/10	70	1/10	90	2/10	80	1/10	90	3/10	70
Kontrol	Dublin	7/10	30	7/10	30	7/10	30	7/10	30	7/10	30	8/10	20
	Typhimurium	9/10	10	7/10	30	9/10	10	9/10	10	7/10	30	10/10	0
	Anatum	5/10	50	5/10	50	5/10	50	5/10	50	5/10	50	6/10	40
	Kentucky	5/10	50	4/10	60	5/10	50	5/10	50	5/10	50	7/10	30
	Dublin	$X^2=19,00$; $P<0,001$		$X^2=21,00$; $P<0,001$		$X^2=19,00$; $P<0,001$		$X^2=15,86$; $P<0,001$		$X^2=19,00$; $P<0,001$		$X^2=16,25$; $P<0,001$	
	Typhimurium	$X^2=18,62$; $P<0,001$		$X^2=13,62$; $P<0,001$		$X^2=18,62$; $P<0,001$		$X^2=19,29$; $P<0,001$		$X^2=15,00$; $P<0,001$		$X^2=22,64$; $P<0,001$	
	Anatum	$X^2=8,46$; $P<0,01$		$X^2=8,46$; $P<0,01$		$X^2=8,46$; $P<0,01$		$X^2=8,46$; $P<0,01$		$X^2=8,46$; $P<0,01$		$X^2=11,17$; $P<0,001$	
	Kentucky	$X^2=5,76$; $P<0,05$		$X^2=0,33$; $P>0,05$		$X^2=5,76$; $P<0,05$		$X^2=4,28$; $P>0,05$		$X^2=4,28$; $P>0,05$		$X^2=5,63$; $P>0,05$	

*Koruma Oranı: Geri izolasyonun % olarak önlenmesi (% 100 üzerinden pozitif çıkan örneklerin %'lerinin çıkarılması ile hesaplanmaktadır)

**geri izole edilen/toplan örnek sayısı

optimal dozda sonuç alındığı ifade edilmiştir. Bu çalışmada, monovalan, bivalan ve kombine aşılar ile aşılanan sıgırların kan serumlarında yüksek titrede antikorlar belirlendi. En yüksek antikor titreleri monovalan aşılar ile elde edildi. Aşısız sıgırlara ve aşılama öncesine göre aşılanan sıgırlarda şekillenen antikor titreleri istatistiksel olarak önemli bulundu. Hem insanlarda hem de hayvanlarda çeşitli mikroorganizmalara karşı hazırlanan hiperimmün serumların koruyucu etkisi deney hayvanlarında belirlenmiştir. Besser ve ark (1988), annede hazırlanan spesifik ve yüksek titrede Ig'lerin yavruya aktarılmasının, yeni doğan hayvanlarda morbidite ve mortalite ile seyreden ishaller hastalıkların görülmesini ve klinik belirtilerin şiddetinin azaltılmasını sağlayabileceğini bildirmiştir. Lewis ve ark (1999), BHV-1'e karşı hazırlanan hiper immün serum verilmesi sonrası bir adjuvant ile kombine edilen rekombinant IgD'nin aşısı ile immünize edilen 6-8 haftalık farelerin %50'sinin serumlarında antikorların daha belirgin hale geldiğini belirtmişlerdir. Wang ve ark (1998), kuduz virusunun bir glikoproteini olan pSGrab.gp antijenini maternal bağışıklığı olan veya pasif olarak hiper

immün serum ile antikorların aktarıldığı genç yada yeni doğan farelerde test etmişlerdir. Maternal bağışıklığın veya pasif bağışıklığın varlığında aşılanan yeni doğan farelerin kuduz virusuna immün cevaplarında etkilenme şekillenmiştir. Gupta ve ark (2001), Ebola virus enfeksiyonuna karşı poliklonal immün serumun koruyucu etkisini hayvan modeli olarak farelerde çalışmışlardır. Çelinc öncesi immün serum verilen farelerde Ebola virusuna karşı %100 koruma sağlandığı belirtilmiştir. Anti-Ebola virus IgG titresi ile koruma, yüksek titreli serum ile pasif tedavi ile viral replikasyonun geciktirilmesinde bir ilişki olduğu ifade edilmiştir. Sonuçta, antikorların viral üremeyi durdurduğu veya geciktirdiği, letal Ebola virus enfeksiyonuna karşı koruma sağladığını rapor etmişlerdir. Herrmann ve ark (2006), hastalarda antibiyotik tedavisi cevap vermediğinden terapötik antikorlar ile pasif immünizasyon gibi alternatif tedavilere ihtiyaç olduğunu belirtmektedir. Bu amaçla, *Bacillus anthracis* koruyucu antijen ile immünize edilen tavşanlarda anti-antraks antikorlarını ürettiklerini ve *B. anthracis* sporlarının solunum yolu ile çelinc yapılan fareleri koruduğunu

bildirmişlerdir. Farelerde koruma antiserumun çelincin 1 saat önce ve 1 saat sonra verildiğinde alındığını ifade etmişlerdir. Sonuç olarak, antraksli insanların yaşama şanslarının artırılması için antibiyotik tedavisine ilave olarak antiserum uygulamasının faydalı olduklarını rapor etmişlerdir. Muhamudana ve ark (2007), hayvan modelleri kullanarak kuduza karşı pasif immünizasyonda kuduz anti monoklonal antikorların etkinliğini farelerde belirlemişlerdir. Monoklonal antikorların nötralizasyon titresi ve etkin protein konsantrasyonunu karşılaştırmışlardır. Sonuçta, monoklonal antikorların 2000 kat daha potent olduğunu bildirmişlerdir. Chigerwe ve Tyler (2010), pasif transferde başarısız olan yeni doğan buzağılarda süt ineklerinin serum IgG'sini intravenöz olarak buzağılara verdiklerini ve hem kontrol hemde serum tranfüze edilen buzağılarda 0-72 saatleri arasında serum protein konsantrasyonunun belirgin bir şekilde arttığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte, dozunda serum uygulamasının kolostral IgG'lerin transferinde başarısız olan buzağılarda yeterli serum IgG konsantrasyonu sağlamadığını bildirmişlerdir. Ahmad ve ark (2011), *Pasteurella multocida* ile aşılaman tavsanların serumunun *P. multocida* enfekte tavsanlara damar içi verdiklerinde %100, kas içi uyguladıklarında %66,6 oranlarında koruma sağladıklarını belirtmişlerdir. Bununla birlikte, serum verilmeyen enfekte hayvanların hepsinin öldüğünü ifade etmişlerdir. Sonuç olarak, hiperimmün serumun terapötik olarak *P. multocida*'ya karşı enfeksiyonların önlenmesi için kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Navarro ve ark (2016), farelerde septisemi ve pulmoner enfeksiyonların önlenmesinde *Klebsiella pneumonia* karşı hazırlanan spesifik monoklonal antikorların koruyucu etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Mousavi ve ark (2016), yanık yarası olan farelere periton içi verilen tavsan anti-Pseudomonas aeruginosa tip II (anti-rekombinant tip II) antikorların etkinliğini araştırmışlardır. Yanık ve enfeksiyon sonrası, deride ve iç organlarda bakteri sayısı sistemik enfeksiyonun seviyesini belirlemek için ölçülmüştür. Sonuçta, *P. aeruginosa* ile enfekte edilen ve pasif immunot tedavi yapılan yanık farelerde koruma gözlediklerini belirtmişlerdir. Ayrıca, sistemik bakteriyel yayılma azalarak pasif immünize edilen farelerin hayatta kalma oranı artmıştır. Zhan ve ark (2017), Middle East Respiratory Syndrome (MERS) virus-like partikülleri (VLPs) (MERS-CoV S, M ve E) ile atları immünize ettiklerini belirtmişlerdir. Hem IgG hemde F(ab')₂ doku kültüründe MERS-CoV'unun replikasyonunu etkin bir şekilde nötralize ettiğini bildirmişlerdir. At immün antikorların farelere pasif transferinin MERS-CoV farelerde virus titresini belirgin şekilde azalttığını ve akciğerlerinden hızlı bir şekilde virusun temizlendiğini rapor etmişlerdir. Sonuçta, atlarda hazırlanan hiper immün serumun MERS-CoV ile enfekte hastalarda terapötik veya koruyucu olarak kullanılmasının faydalı olabileceğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada, Salmonella aşılı ile aşılaman sığırın serumları (IgG) verilen ve Salmonella antijenleri ile çelinc yapılan farelerde; en yüksek koruma monovalan aşılı sığırın serumu verilen farelerde görüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gruplar

arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulundu. Kombine aşı ile aşılaman sığırın serumu verilen farelerde *S. Anatum*, *S. Kentucky* ve *S. Typhimurium* ile çelinc karşı yüksek oranda koruma gözlendi. Ancak, kombine aşı ile aşılaman sığırın IgG'si verilen ve Salmonella antijenleri ile çelinc yapılan farelerde; kontrol ve *S. Dublin* grupları arasında morbidite ve mortalite arasında farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulunurken, diğer Salmonella antijenleri gruplar ile aralarındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli idi. Bivalan aşı ile aşılaman sığırın serumu verilen farelerde *S. Dublin*'e karşı tam koruma gözlendi ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulundu. Bununla birlikte, *S. Typhimurium*'a karşı %70 oranında bir korumanın kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemsiz olduğu gözlemlendi. Diğer araştırmacılar (Besser ve ark 1988; Gupta ve ark 2001; Hermann ve ark 2006; Ahmad ve ark 2011; Navarro ve ark 2016; Zhan ve ark 2017) farklı mikroorganizmalara karşı hazırlanan hiper immün serumların verilmesi ile oldukça yüksek koruma sağladıklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada, kombine Salmonella aşısı ile aşılaman sığırın serumu (IgG) verilen ve Salmonella antijenleri ile çelinc yapılan farelerin iç organlarından en fazla *S. Dublin*'in geri izolasyonu yapıldı. Diğer Salmonella türlerinin (*S. Typhimurium* ve *S. Kentucky*) geri izolasyonu yapılmakla birlikte düşük sayıda olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu ile *S. Dublin* gruplarında geri izolasyon sayıları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulunurken, diğer Salmonella antijenlerinin geri izolasyonu arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi. Bivalan aşı ile aşılaman sığırın IgG'si verilen ve *S. Dublin* ile çelinc yapılan farelerin iç organlarından geri izolasyon yapılmadı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise geri izolasyon sayıları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulundu. Bununla birlikte, aşılı sığırın serumu verilen ve *S. Typhimurium* ile çelinc yapılan farelerin ve kontrol grubu farelerin iç organlarından geri izolasyon sayıları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdi. Monovalan aşılı ile aşılaman sığırın kan serumu verilen ve Salmonella antijenleri (*S. Dublin*, *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. Kentucky*) ile çelinc yapılan farelerin iç organlarından geri izolasyon sayıları oldukça düşük bulundu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında geri izolasyon sayıları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulundu. Bu çalışmada, Salmonella aşılı ile aşılaman sığırın serumu (IgG) verilen ve Salmonella antijenleri ile çelinc yapılan farelerin dışkı örneklerinden tüm Salmonella antijenleri farklı sayılarda olmak üzere geri izolasyonu yapıldı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda özellikle 14. günü dahil alınan dışkı örneklerinde *S. Dublin*'in geri izolasyon sayıları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulundu. Tüm *Salmonella* aşılı ile aşılaman sığırın serumu verilen ve *S. Typhimurium* ile çelinc yapılan fareler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Salmonella antijenlerinin geri izolasyon sayıları arasındaki farklılıklar özellikle 12. günden sonra alınan örneklerde istatistiksel olarak önemli bulundu. Tüm

Salmonella aşılı ile aşılanan sıgırların serumu verilen *S. Anatum* ve *S. Kentucky* ile çelinc yapılan fareler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Salmonella antijenlerinin geri izolasyon sayıları arasındaki farklılıklar tüm örnekleme günlerinde alınan örneklerde istatistiksel olarak önemli bulundu. Sonuç olarak, Salmonella türlerinin sebep olduğu enfeksiyonların önlenmesinde Salmonella aşılı ile imünize edilen sıgırların serumu veya IgG'sinin koruyucu olarak faydalı ancak sınırlı bir etkinliğe sahip olduğu gözlemlendi.

Teşekkür

Bu çalışma, TUBITAK-TOVAG (Project No: 1120324) tarafından desteklenen projenin bir kısmıdır. Sözlü bildiri olarak XI. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, 2014, sf 24-25, Kemer, Antalya'da sunulmuştur. Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır

Kaynaklar

- Ahmad A, Rahman S, Ahmad Z, Bilal M, Rabbani M, Muhammad K, 2011. Passive immunization of Pasteurella multocida infected rabbits. Pakistan J Zool 43, 623-628.
- Aissa RB, Al-Gallas N, Troudi H, Belhadj N, Belhadj A, 2007. Trends in Salmonella enterica serotypes isolated from human, food, animal and environment in Tunisia, 1994-2004. J Infect 55, 324-339.
- Barman S, Koley H, Naq D, Shinoda S, Nair GB, Takeda Y, 2014. Passive immunity with multi-serotype heat-killed Shigellae in mice. Microbiol Immunol 58, 463-466.
- Berge ACB, Thornburg E, Adaska JM, Moeller RB, Blanchard PC, 2008. Antimicrobial resistance in Salmonella enterica subspecies enterica serovar Dublin from dairy source calves in the central San Joaquin Valley, California (1998-2002). J Vet Diagn Invest 20, 497-500.
- Besser T, Gay CC, McGuire TC, Evermann JF, 1988. Passive immunity to bovine rotavirus infection associated with transfer of serum antibody into the intestinal lumen. J Virol 62, 2238-2242.
- Bock HL, Milcke-Ungehever L, 1988. Active and passive rabies immunization: The effect of administering hyperimmune globulin before the vaccine. J Biol Standard 16, 67-69.
- Casadevall A, 2002. Passive antibody administration (immediate immunity) as a specific defense against biological weapons. Emerg Infect Dis 8, 833-839.
- Chiwerge M, Tyler JW, 2010. Serum IgG concentrations after intravenous serum transfusion in a randomized clinical trial in dairy calves with inadequate transfer of colostral immunoglobulins. J Vet Intern Med 24, 231-234.
- Erganiş O, Corlu M, Hadimli HH, Kav K, 2003. Development and therapeutic effects of inactivated Salmonella And Klebsiella vaccine for beef cattle: A preliminary report. Condition and Perspectives of Veterinary Science and Practice Development Materials of Int. Scientific and Research Conference, Almaty, Kazakistan, pp 96-100.
- Figueiredo HCP, Lage AP, Pereira Júnior FN, Leite RC, 2004. Passive immunity in cattle against enterotoxigenic Escherichia coli: serologic evaluation of a bacterin containing K99 and F41 fimbriae in colostrum of vaccinated females and calf serum. Arq Bras Med Vet Zootec 56, 425-432.
- Gupta M, Mahanty S, Bray M, Ahmed R, Rollin PE, 2001. Passive transfer of antibodies protects immunocompetent and immunodeficient mice against lethal Ebola Virus Infection without complete inhibition of viral replication. J Virol 75, 4649-4654.
- Hadimli HH, Erganiş O, Sayın Z, Yıldırım B, 2007. Fare ve konyunlarda ginseng katılmış inaktif Salmonella Typhimurium aşılılarının etkinliği. Vet Bil Derg 23, 17-24.
- Hadimli HH, Pınarkara Y, Al-Shatrawi HJ, 2014. Farelerde Salmonella İzolatlarının Patojenitelerinin Belirlenmesi, XI. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Kemer, Antalya, sf 20-21.
- Hadimli HH, Sayın Z, Erganiş O, 2011. Buzağılarda Salmonella Dublin Enfeksiyonu ve Otojen Aşı Uygulaması ile Kontrolü. Eurasian J Vet Sci 27, 99-105.
- Herrmann JE, Wang S, Zhang C, Panchal RG, Bavari S, Lyons CR, Louchik JA, Golding B, Shiloach J, Lu, S, 2006. Passive immunotherapy of Bacillus anthracis pulmonary infection in mice with antisera produced by DNA immunization. Vaccine 24, 5872-5882.
- Ikemori Y, Ohta M, Umeda K, Icatlo Jr FC, Kuroki M, Yokoyama H, Kodama Y, 2007. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. Vet Microbiol 58, 105-111.
- Jayappa H, Davis R, Dierks L, Sweeney D, Wasmoen T, 2008. Demonstration of passive protection in neonatal calves against colibacillosis following immunization of pregnant heifers at 3 months of gestation. Vet Therp 9, 283-289.
- Jones PW, Collins P, Aitken MM, 1988. Passive protection of calves against experimental infection with Salmonella Typhimurium. Vet Rec 123, 536-541.
- Kalender H, 2002. Laboratuvar hayvanlarından Salmonella ssp. izolasyonu. İstanbul Univ Vet Fak Derg 28, 2.
- Kalenik B, Sawicka R, Gora-Sochacka A, 2014. Influenza prevention and treatment by passive immunization. Acta Bioch Polonica 61, 573-587.
- Keller MA, Stiehm ER, 2000. Passive immunity in prevention and treatment of infectious disease. Clin Microbiol Rev 13, 602-614.
- Lewis PJ, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA, 1999. Induction of immune responses to bovine herpesvirus type 1 gD in passively immune mice after immunization. J Gen Virol 80, 2829-2837.
- Maddoks S, Olma T, Chen S, 2002. Comparison of CHROM agar Salmonella medium and xylose-lysine-desoxycholate and Salmonella Shigella agars for isolation of Salmonella strains from stool samples. J Clin Microbiol 40, 2999-3003.
- Mousavi M, Behrouz B, Irajian G, Mahdavi M, Korpi F, Motamefidar M, 2016. Passive immunization against Pseudomonas aeruginosa recombinant PilA in a murine burn

- wound model. *Microbial Path* 101, 83-88.
- Muhamudana K, Madhusudana SN, Ravi V, 2007. Use of neutralizing murine monoklonal antibodies to rabies glycoprotein in passive immunotherapy against Rabies. *Human Vaccines* 3, 192-195.
- Navarro DE, Baselga C, Sun D, Khairallah C, Mann I, Hernando UA, Sheridan B, Shi M, Fries BC, 2017. Antibody based immunotherapy to treat and prevent infection with hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Vaccine Immunol* (in press), doi: 10.1128/CVI.00456-16
- Rice DH, Besser TE, Hancock DL, 1997. Epidemiology and virulence assessment of *Salmonella* Dublin. *Vet Microbiol* 56, 111-124.
- Smith GW, Smith F, Zuidhof S, Foster DM, 2015. Short communication: Characterization of the serologic response induced by vaccination of late-gestation cows with a *Salmonella* Dublin vaccine. *J Dairy Sci* 98, 2529-2532.
- Smith-Palmer A, Stewart WC, Mather H, Greig A, Cowden A, Cowden JM, Reilly WJ, 2003. Epidemiology of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium in animals and people in Scotland between 1990-2001. *Vet Rec* 153, 517-520.
- Toye P, Handel I, Gray J, Kiara H, Thumbi S, Jennings A, van Wyk IC, Ndila M, Hanotte O, Coetzer K, Woolhouse M, Bronsvort M, 2013. Maternal antibody uptake, duration and influence on survival and growth rate in a cohort of indigenous calves in a smallholder farming system in western Kenya. *Vet Immun Immunopathol* 155, 129-134.
- Wang Y, Xiang Z, Pasquini S, Ertl HC, 1998. Effect of Passive immunization or maternally transferred immunity on the antibody response to a genetic vaccine to Rabies virus. *J Virol* 72, 1790-1796.
- Zarcula S, Cernescu H, Knop R, 2008. Colostral immunity in newborn calf: Methods for improvement of immunoglobulins absorption. *Luc Stiint Vet Med XLI*, 195-202.
- Zhan Y, Wang C, Qiu B, Li C, Way H, Jin H, Gai W, Zhang X, Wang T, Sun W, Yan F, Gao Y, Wang Q, Yan J, Chen L, Perlman S, Zhong N, Zhao J, Yang S, Xia X, 2017. Passive immunotherapy for Middle East Respiratory Syndrome coronavirus infection with equine immunoglobulin or immunoglobulin fragments in a mouse model. *Antiviral Res* 137, 125-130.