

/CLOSTRİDİAL AŞILARIN KOMBİNE HAZIRLANMASI (*)

Ahmet Turan BAŞ

Dollvet Veteriner Aşı İlaç Biyolojik Madde Üretimi

Sanayi ve Ticaret A.Ş., Şanlıurfa

Rüçhan ALP

Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, İstanbul

Geliş Tarihi: 28.09.2005

Özet: Bu çalışmada, *Clostridium perfringens* tip A, C, D, *Cl. oedematiens* tip A, *Cl. septicum* ve *Cl. chauvoei*’ den oluşan 11 farklı tipte Clostridial suş ile üretilen kültürlerin toksoidleri, mini ultrafiltrasyon sistemi ile konsantre edilerek 6’lı kombine polivalan bir aşının üretilme imkanı araştırıldı.

Her bir suş ile hazırlanan monovalan aşılardan gerek bağımsız ve gerekse 4 farklı 6’lı kombine (Kombi A,B,X,Y,) aşısındaki bağımsızlık oluşturma gücünü saptamak amacıyla toplam 70 kobay, 124 tavşan ve 72 koyun 21 gün ara ile aşılandılar. İkinci aşılardan 10 gün sonra alınan kan serumlarında antitoksinlerin varlığı, beyaz farelerde toksin serum nötralizasyon test (TNT) ile saptandı. Antitoksin düzeyleri aşıları kobay ve tavşanlar için 2.5 , 5, 10 IU / ml , koyunlar için 0.25, 1, 2.5 ve 5 IU/ml. değerlerinde arandı. *Cl.chauvoei* suşu ile üretilen aşının potansi ise aşıları kobaylarda epruvasyon ile ölçüldü.

Çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda; *Cl. perfringens* tip A’ ya ait her iki suş ile yeterli düzeyde bağımsızlık elde edilemezken, *Cl. perfringens* tip C (Silivri, Pendik), *Cl. perfringens* tip D (NCTC, 8346) , *Cl.oedematiens* tip A (UK, Pendik) / (NCTC, 538) , *Cl.septicum* (NCTC , 547) suşlarının koruma değerleri sırası ile 5-10 , 10>, 10> /10>, 2.5-5 IU/ml düzeyinde bulunmuştur. *Cl. chauvoei* (No:20, Pendik) suşunun ise % 100 koruma sağladığı saptanmıştır. Altılı kombinasyondaki 5 antijenin toplam dozu ise 2.25 ml. olarak belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler : Clostridium, kombine aşı

(*) Bu çalışma, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından desteklenmiştir. Proje No : TAGEM / HS / 02 / 14 / 01 / 80

Experimental production of combined Clostridial vaccines

Summary: In this study, the possible preparation of 6 combined polyvalent vaccine was aimed by using the toxoids from cultures of 11 different Clostridial strains including *Cl. perfringens* type A, C, D, *Cl. oedematiens* type A, *Cl. septicum* and *Cl. chauvoei*. The toxoid cultures were concentrated by using ultrafiltration system.

In order to determine immunopotency of each strains in both monovalent and four different 6 combined vaccine, 70 guinea pigs, 124 rabbits and 72 sheep were vaccinated in 21 days interval. In 10th day after 2nd vaccination the amount of antitoxin level in the pooled sera of vaccinated test animals were determined by toxin serum neutralization test (TNT) in white mouse. The antitoxin levels were expected to be 2.5 ,5 , 10 IU/ ml in both guinea pigs and rabbits. They were expected to be 0.25 , 1 ,2.5 and 5 IU/ ml in sheep.

Potency of the vaccine produced with *Cl. chauvoei* strain was measured in vaccinated guinea pigs by challenge work.

The results revealed that sufficient amount of immunity was not obtained while against two strains of *Cl. perfringens* type A, while protective values of *Cl. perfringens* type C (Silivri, Pendik), *Cl. perfringens* type D (NCTC, 8346), *Cl. oedematiens* type A (UK,Pendik) / (NCTC, 538), *Cl. septicum* (NCTC, 547) were found as 5-10,10> / 10>, 2.5 – 5 IU/ ml, respectively. Vaccine prepared with *Cl. chauvoei* strains showed 100 % protection.

The total dose of five antigens was 2.25 ml in 6 - combined vaccine.

Key words: Clostridium, combined vaccine.

GİRİŞ

Evcil hayvanlarda clostridial infeksiyonlar veya intoksikasyonlar oldukça sık görülmekte ve yüksek mortalite ile seyretmektedir. *Cl. perfringens* Tip C, Tip D, *Cl. septicum* ve *Cl. oedematiens* gibi etkenlerin neden olduğu intoksikasyonlarda klinik semptomların gözlenmesine fırsat kalmadan ani ölümler görülmesi, Clostridial intoksikasyonların kliniksel olarak birbirinden ayırt edilmesinde laboratuvar tanısını gerekli kılmaktadır (4).

Laboratuvar tanısının zaman alması ve intoksikasyonların perakut seyirli olması etkili bir sağaltıma fırsat vermez iken, sağaltım için her tipe özgü antiserumlarla sağlanacak olan koruma veya terapi ancak kısa süreli olacağından , Clostridial intoksikasyonlara karşı korunmada aşılarda aracılığı ile aktif bağışıklık öngörülmektedir(4,19,25).

İlk çalışmaları 1900'lü yılların başına kadar giden kombine aşı üretimleri bugün hemen hemen her aşının başka bir aşı ile kombine edilebilirliği noktasına ulaşmıştır. Kombine aşı çalışmalarında en önemli sorun antijenler arası intra ve intermoleküler rekabettir, çünkü aynı antijenin farklı bölgelerindeki antijenik determinantlar arasında veya iki ayrı antijendeki determinantlar arasında; antijende buldukları pozisyon veya immun sistem tarafından işleniş durumlarına göre dominantlık ortaya çıkmakta ve sonuçta diğer determinantların

immunojenik uyarımını baskılamaktadır. Burada antijenlerin, immun kompetan lenfoid hücrelerde bulunan reseptörlerle, yani antijenik determinantları tanıyan ve onlarla birleşerek tepkimeyi başlatan özel bölgelerle ilişki kurma yeteneği belirleyici olmaktadır (21).

Aynı konuda Barr ve Llewellyn (2)' e göre, antikor üreten sistemin, kombinasyondaki her bir antijene karşı sınırlı yetenekte olması, daha önemli bir problemdir. Oysa bağışıklık için antikor üreten sistemin kombinasyondaki her bir komponente mutlak yanıt vermesi gerekmektedir.

Kombine aşılar da antijenlerin birbirlerini baskılaması ve stimüle etmesinin önceden belirlenmesi zordur. Bu nedenle kombinasyon çalışmalarında korumayı sağlayacak antijenik determinantların önceden iyi tespit edilmesi gereği ileri sürülürken, bazı araştırmacıların koyunlar üzerindeki araştırmalarına göre ; *Corynebacterium pseudotuberculosis* ile kombine edilmiş kombine Clostridial aşıda gerek *Corynebacteri*'ye karşı korumada, gerekse *Clostridium*'lara karşı korumada monovalan aşılarla kıyaslandığında antitoksin titrelerinde herhangi bir düşüşe rastlanmamıştır (8,19,20).

Evcil hayvanlarda kombine Clostridial aşılarla sağlanan bağışıklık düzeyi ve süresi ile ilgili olarak çok sayıda araştırma yapılmıştır (9,15,16,17,24,29).

Kerry ve Craig (17), farklı dozların uygulanması ile 2 grup hayvan üzerinde yaptıkları araştırmalarda yüksek dozla (5+2 ml) aşılanan koyunların düşük dozla (3+2 ml) aşılanan koyunlara göre 5 kat daha yüksek antitoksin titreleri eldesini mümkün kıldığını gözlemlemişlerdir. Yüksek dozla aşılanmış annelerden doğan kuzuların ise annelerine göre 8 kat daha yüksek antitoksin titrelerine sahip oldukları ayrı bir gözlemdir. Yapılan başka bir çalışmada, kombine aşı ile bağışık kılınmış annelerden doğan kuzularda 5-100 IU/ml düzeyinde β , 5-20 IU/ml düzeyinde ϵ antitoksinin görüldüğü ve kuzularda olduğu gibi aktif olarak bağışık kılınmış annelerden doğan buzağuların da kolostrum aracılığı ile korunduğu bildirilmektedir (16).

Clarkson ve ark. (6), polivalan Clostridial aşılarla hiperimmunize edilmiş sığırlardan alınan kolostrum ile beslenen annesiz veya zayıf doğan kuzuların pasif bağışıklık sağlanma sonucu korunabileceklerini göstermişlerdir.

Clostridial antijenlere karşı, aşıya katılan adjuvanta bakılmaksızın, antitoksin titrelerinin hayvan türlerine göre farklılıklar gösterdikleri bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, tavşanlarda *Cl. perfringens* β ve ϵ antitoksin düzeyleri koyunlara göre yüksek bulunurken , *Cl. septicum* antitoksin düzeyinin her iki tür hayvanda aynı olduğu , *Cl. oedematiens* antitoksin titresinin ise koyunlarda oldukça yüksek bulunduğu bildirilmektedir (9,24). Bu

değişimlere rağmen Clostridial aşılarda tavşanın genel olarak test hayvanı seçiliş nedeni ise; tavşan kan serumu antitoksin titreleri arasında büyük varyasyonların olmayışındandır.

Bağışıklık açısından güçlü bir Clostridial aşı üretebilmenin ön koşullarından en önemlisi yüksek titrelerde toksin üretebilmektir. Toksin üretiminin ise ; kullanılan suşun genetik olarak toksin üretebilme yeteneğine sahip oluşuna, üretim vasatının kompozisyonuna , pH' nın otomatik kontrolüne ve inkubasyon süresine bağlı olduğu bir çok literatürde bildirilmiştir. (3,11,13).

Günümüzde Clostridial aşılar yaygın olarak kullanılmaktadır. Yurdumuzda da bu amaçla kamu ve özel sektör tarafından üretilen veya ithal edilen aşılar sahada uygulanmaktadır. Kamu kurumlarımızca üretilen aşılarda bivalan ve monovalan oluşları, Clostridial intoksikasyonlara saha şartlarında ayırıcı tanının konulamaması ve ender de olsa kimi intoksikasyonların multi-Clostridial tabiatında olma olasılıkları, uygulanan aşıya özgü profilaksinin sağlanıp sağlanamadığı konusunda sahada haksız tereddütlere neden olmaktadır.

Tüm yukarıdaki nedenlerin dışında, günümüzde monovalan aşı uygulamasının multi-Clostridial bir profilaksi sağlayamayışı ve ekonomik olmamasına karşın (20,22), kombine hazırlanan aşılarda koyun ve sığır Clostridial intoksikasyonları ile anaerob etkenlere bağlı bazı sığır ve koyun mastitislerine karşı da koruma sağlaması (4), üretim ve uygulama maliyetinin daha düşük olması hayvancılık ekonomisine artı bir değer olarak yansımaktadır.

Yukarıda açıklanmaya çalışılan nedenlerden dolayı, bu çalışma ile deneysel düzeyde 6'lı kombine Clostridial aşı üretimi amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Bu projenin laboratuvar çalışmaları Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Anaerob Ünitesi'nde gerçekleştirildi.

Zararsızlık çalışmaları Enstitü'de bulunan sığır (Samsun yerli ırk), koyun (Merinos kırmısı, Tahirova kırmısı, İvesi kırmısı, Kıvırcık kırmısı), kobay(kısa tüylü albino – İngiliz)ve beyaz farelerde(Balb C) yapıldı. Bağışıklık çalışmaları Enstitü tavşan (Yeni Zellanda), kobay ve koyunları ile gönüllü bir koyun sürüsünde (Saf Tahirova – İnanlı TİGEM orjinli- Silivri/İSTANBUL) tamamlandı. Hazırlanan 6'lı kombine aşının sığırlarda etkinliğini gözlemlemeye yönelik saha çalışması ise TİGEM' e bağlı Atatürk Tarım İşletmesi'nde (Yalova) gerçekleştirildi.

Materyal

Deney Hayvanları

A) Zararsızlık Çalışmaları için; : 4 adet sığır, 4 adet koyun, 30 adet kobay, 30 adet beyaz fare kullanıldı.

B) Bağışıklık Çalışmaları için;

124 adet tavşan, 70 adet kobay, 72 adet koyun, (Bu koyunların 24 adeti Enstitü koyunlarından, 48 adeti gönüllü sürü koyunlarından oluşmaktadır), 30 adet sığır , yeterli sayıda beyaz fare kullanıldı.

Böylece tüm çalışmalar için 34 sığır, 76 koyun , 124 tavşan, 100 kobay ve yeterli sayıda beyaz fare kullanıldı.

Aşı Üretiminde Kullanılan Clostridial Suşlar

Deneysel amaçlı aşı üretiminde kullanılacak olan yerli ve yabancı suşlar içerisinden toksin titreleri yüksek olanlar kombine aşı hazırlanması amacıyla seçildi. Bu suşlar şunlardır: Cl.perfringens tip A (107), Pendik; Cl.perfringens tip A, NCTC (8237), İngiltere; Cl.perfringens tip C, (Silivri), Pendik; Cl.perfringens tip C, NCTC(3180), İngiltere; Cl.perfringens tip D, (Afrika), Pendik; Cl.perfringens tip D, NCTC (8346), İngiltere; Cl.oedematiens tip A, (UK), Pendik; Cl.oedematiens tip A, NCTC(0538), İngiltere; Cl.septicum (VS-54), Pendik; Cl.septicum NCTC (547), İngiltere; Cl.chauvoei , (Yerli 20 no' lu suş), Pendik .

Besiyeri ve Solüsyonlar

Çalışma süresince, deneysel amaçlı aşı üretimi ve kontrolünde kıymalı buyyon, Tarrozi vasatı, TGY buyyon, Toksin üretim buyyonu, Ardehalli vasatı(1), RCM vasatı, Glukoz (%50), NaOH (5N), Trypsin, Aliminyum hidroksit, Fenol, Toksin sulandırma sıvısı, sıvı thioglycollate buyyon (FTM), tryptic soya buyyon (TSB), sıvı sabouraud buyyon, sabouraud dextrose agar, PPLO agar, PPLO buyyon kullanıldı.

Metot

Deneysel Üretim Çalışmaları

1.Aşama: Kombine aşı hazırlamak amacı ile öncelikle her suş, laboratuvarında kendine özgü vasat ve pH koşullarında üretilerek kültürlerinden toksin titrasyonu yapıldı.

Titrasyon, Cl. perfringens tip A' da alfa toksini, Cl. perfringens tip C' de beta toksini, Cl.perfringens tip D' de epsilon toksini,Cl.oedematiens tip A' da alfa toksini ve Cl. septicum'da alfa toksini yönünden filtre edilmiş kültür süpernatantları ile beyaz farelerde yapılarak, minimal letal doz (MLD₅₀/ ml) değerleri saptandı. Cl. chauvoei titrasyonu ise anaerob koşullarda Colombia kanlı agarda koloni sayılarak (cfu) hesaplandı.

2.Aşama : Titrasyona alınan kültürlerden Cl.perfringens tip A, Cl. oedematiens tip A, Cl. septicum ve Cl. chauvoei kültürlerine % 0,6 ; Cl. perfringens tip C ve tip D kültürlerine % 0,8 oranında formol katılarak inaktivasyona alındılar. İnaktivasyon süresi Cl. perfringens tip A, tip C, tip D ve Cl.septicum' da 7 gün , Cl.oedematiens tip A' da 7-10 gün iken Cl. Chauvoei' de ise 3 gün oldu. İnaktivasyon süresi tamamlanan kültürlerden Cl.perfringens tip C, tip D, Cl.oedematiens tip A ve Cl. septicum kültür süpernatantları detoksifikasyon kontrolü amaçlı olarak farelere derialtı (SC) injekte edilerek 7 gün süre ile gözlemlendiler. Cl. perfringens tip A süpernatantı ile Cl. chauvoei kültürünün detoksifikasyon kontrolü ise kobaylarda yapıldı.

İnaktif Kültürlerin Ultrafiltrasyonu

Toksin titreleri belirlenen suşlar formol ile inaktive edilerek +4/ +8 °C' de saklandılar. Cl. chauvoei hariç tüm diğer kültürler sırası ile 5, 1.2 ve 0.2 µm' lik filtrelerden geçirilerek prefiltrasyon işlemine tabi tutuldular. Ultrafiltrasyon cihazı (VIVAFLOW 200, SARTORIUS , Göttingen/GERMANY) ile 10.000 – 30.000 dalton büyüklüğü arasındaki moleküller filtre edilmek suretiyle, kültür 3 kat konsantre edilerek hacmi 900 ml.'den 300 ml.'ye indirildi. Bu yöntem ile (Me.I) konsantre edilen toksoidler aşuya dönüştürülerek monovalan aşular hazırlandı. Hazırlanan aşular Toksoid (T) aşular olarak tanımlandı.

Hazırlanan monovalan aşılardaki toksin titre değerleri dikkate alınarak belirli hacimlerde birleştirilmek suretiyle 2 farklı 6'lı aşı kombinasyonu oluşturuldu. Oluşturulan 2 paralel aşı kombinasyonu Kombi-A ve Kombi-B olarak tanımlandı. Kombi-A kombinasyonu Cl. perfringens tip A (107) , Cl. perfringens tip C (Silivri) Cl. perfringens tip D (8346), Cl. oedematiens tip A (UK). Cl. septicum (VS-54), Cl. chauvoei (No:20) suşlarından oluşurken; Kombi-B kombinasyonu Cl. perfringens tip A (8237), Cl. perfringens tip C (3180), Cl.

perfringens tip D (AF)), *Cl. oedematiens* tip A (538), *Cl. septicum* (547) ve *Cl. chauvoei* (No:20) suşları ile oluşturuldu.

Gerek Kombi-A gerekse Kombi-B karmaları ve bu karmalara giren monovalan aşılarda aşılardan yeterli düzeyde antitoksin vermeyen aşılara ait suşlarla kültür ve toksin üretimleri tekrarlanarak inaktivasyon işlemlerini takiben Me.I'den farklı olarak prefiltrasyon işlemi sadece 5µm.' lik kartuj ile filtre yapıldı.

Böylece kısmen purifiye edilen ana kültürler Me.I'de belirtildiği gibi ultrafiltrasyon işlemine alınarak konsantre edildiler. Kısmen purifiye edilen ana kültürlerin konsantrasyon işlemi Me.II olarak tanımlanıp, elde edilen aşılarda Anakültür Toksoid (AKT) aşısı olarak tanımlandı. Me.II ile hazırlanan monovalan aşılarda oluşturdukları kombinasyonlar ise Kombi-X ve Kombi-Y olarak tanımlandı. Kombi-X ve Kombi-Y aşılarda, suş kompozisyonları itibarı ile Kombi-A ve Kombi-B aşılarda ile aynı tutuldular. Böylece Kombi-A, Kombi-X ile Kombi-B, Kombi-Y ile kombinasyondaki suşların hacimsel payları ile değilse de, suş kompozisyonu ile örtüşmekteydiler.

Kombi-X ve Kombi-Y bileşimine giren ve Me-II ile hazırlanmış aşılarda gerek monovalan ve gerekse kombinasyondaki bağışıklık sonuçları tekrarlanan tavşan aşılarda ile yeniden ölçüldü.

Bağışıklık ölçümlerinde *Cl. perfringens* tip C, tip D, *Cl. oedematiens* tip A ve *Cl. chauvoei* için Tarım Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü'nün belirlediği limitler esas alındı (26, 27, 28). *Cl. perfringens* tip A ve *Cl. septicum* için ise British Veterinary Codex (5) değerleri esas alındı.

Adjuvant Katılması

Bakteri ve aktif toksin içermediği saptanan tüm anakültür ve toksoidlere % 10'luk steril alüminyum hidroksit solüsyonundan % 12 oranında katılırken, *Cl. oedematiens* tip A toksoidine aynı adjuvanttan % 20 oranında katıldı.. Sonrasında % 80'lik steril fenol solüsyonundan % 0,3 oranında katılarak, pH' ları 6,5'e ayarlandı.

Cl. perfringens tip A, tip C, tip D ve *Cl. septicum* aşılarda oda ısısında 3 gün , *Cl. oedematiens* tip A ve *Cl. chauvoei* aşılarda ise 2 gün aynı şartlarda bırakıldı ve zaman zaman karıştırılarak adjuvanta adsorbe edildi. Üretilen aşının aerobik ve anaerobik bakteri, *Mycoplasma* ve mantar yönünden kontrolleri Tarım Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü Aşı Üretim Protokollerine göre yapıldı. Aşının zararsızlık kontrolü ise Enstitü koyun, kobay ve beyaz farelerinde yapıldı.

Bağışıklık Kontrolü

Cl. Perfringens tip A, C, D ve Cl. septicum antitoksin düzeylerinin belirlenmesi amacı ile her bir monovalan aşı için 6 adet tavşan, monovalan aşilar ile oluşturulan 6'lı kombinasyonlar için 10'ar adet tavşan, Cl. oedematiens tip A ve Cl. chauvoei aşilarının bağışıklık düzeylerini belirlemek için ise gerek monovalan aşilar ve gerekse kombine aşilar için 10'ar adet kobay aşılandı.

Aşılanan tavşanlardan ve Cl.oedematiens tip A antitoksin titresinin ölçümü için aşılanan kobaylardan alınan kanların serumları ayrılarak, bu serumlar TNT ile değerlendirildi. Tüm serumlarda öncelikle 2,5 IU/ml.düzeyinde antitoksin varlığı arandı.

Serum antitoksin titrelerinin belirlenmesinde Enstitü Anaerob Ünitesince önceden letal (L +) değeri belirlenmiş olan Cl. Perfringens tip A α , Cl. Perfringens tip C β , Cl. Perfringens tip D ϵ , Cl. septicum α ve Cl. oedematiens tip A α standart toksinleri kullanıldı.

Cl. chauvoei' de bağışıklığın ölçülmesi ise kobaylarda, aşı suşunun 24 saatlik kültürünün epruvasyonu ile yapıldı. Koyunlarda yürütülen bağışıklık çalışmaları ise sadece 6'lı kombine aşilarla gerçekleştirilip koyun serumları antitoksin düzeyleri tavşan serumlarında olduğu gibi TNT ile ölçüldü.

BULGULAR

Çalışmada aşağıda bildirilen 6 farklı türde, 11 değişik tip suş ile üretilen kültürler, Cl. chauvoei kültürleri hariç 2 farklı prefiltrasyon metodunu takiben ultrafiltrasyon ile konsantre edilerek 10 adet monovalan ve 4 farklı kombinasyonda 6'lı kombine aşı (Kombi A,-B,-X,-Y) üretildi. Üretilen aşiların monovalan ve kombine halde zararsızlık, sterilite, potens ve doz tespiti araştırmaları yapıldı. Çalışılan suşlar ve bu suşlarla ilgili toksin titrasyon sonuçları Tablo 1'de özetlenmektedir

Tablo 1: Deneysel Aşı Üretiminde Kullanılan Suşlar ve Toksin Titrasyon Değerleri

Antijen Sıra No	KS	TT	To.T (MLD ₅₀ /ml.)
1	Cl.perf.tip A (107)	α	1/5 - 1/25
2	Cl.perf.tip A (NCTC,8237)	α	1/100 - 1/200
3	Cl.perf.tip C (Silivri)	β	1/1000 - 1/2000
4	Cl.perf.tip C (NCTC,3180)	β	1/4000 - 1/8000
5	Cl.perf.tip D (Afrika)	ϵ	1/2000 - 1/4000
6	Cl.perf.tip D (NCTC,8346)	ϵ	1/2000 - 1/4000
7	Cl.oed. tip A (UK)	α	1/4000 - 1/8000
8	Cl.oed. tip A (NCTC,538)	α	1/4000 - 1/8000

9	Cl.septicum (VS54)	α (AH,BH,CH,DH,01,02)	1/200 - 1/400
10	Cl.septicum (NCTC,547)	α (AH,BH,CH,DH,01,02)	1/400 - 1/800
11	Cl.chauvoei(Pendik,no:20)	O ve H Antijenleri	3×10^8 cfu

KS: Kullanılan suşlar , **TT:** Toksin türü, **To.T:** Toksin titrasyonu

Toksin titrasyonları belirlenen suşlara ait kültürler formol ile inaktive edilerek, inaktivasyon süresi sonunda deney hayvanlarında detoksifikasyon, besiyerlerinde sterilite kontrolleri yapıldı. Sonuçlar aşağıda tablo 2’de özetlenmektedir.

Tablo 2: İnaktivasyon işlemi ve sonuçları

Antijen Sıra No	İFO	İS	DHDK	BSK	Sonuç
1	%0.6	7 Gün	2 ml.(Kobay,s.c.)	7 Gün	+
2	%0.6	7 Gün	2 ml.(Kobay,s.c.)	7 Gün	+
3	%0.8	7 Gün	0.5 ml.(Fare,s.c.)	7 Gün	+
4	%0.8	7 Gün	0.5 ml.(Fare,s.c.)	7 Gün	+
5	%0.8	7 Gün	0.5 ml.(Fare,s.c.)	7 Gün	+
6	%0.8	7 Gün	0.5 ml.(Fare,s.c.)	7 Gün	+
7	%0.6	10 Gün	0.5 ml.(Fare,s.c.)	7 Gün	+
8	%0.6	10 Gün	0.5 ml.(Fare,s.c.)	7 Gün	+
9	%0.6	7 Gün	0.5 ml.(Fare,s.c.)	7 Gün	+
10	%0.6	7 Gün	0.5 ml.(Fare,s.c.)	7 Gün	+
11	%0.6	3 Gün	2 ml.(Kobay,s.c.)	7 Gün	+

İFO :İnaktivasyondaki formol oranı, **İS:** İnaktivasyon süresi, **DHDK:** Deney hayvanlarında detoksifikasyon kontrolü, **BSK:**Besiyeri sterilite kontrolü

İnaktivasyon ve detoksifikasyon işlemleri tamamlanan kültürlerden Cl.chauvoei dışındakilerin tümü Me.I’ e göre prefiltrasyon işlemini (5, 1.2 ve 0.2 μm .’ lik kartuj filtreler ile) takiben ultrafiltrasyon ile konsantre edildi.

Me.I’ e göre konsantre edilen aşılar toksoid formunda oldukları için,Toksoid (T) aşılar olarak tanımlandılar. Bu yöntemle üretilen kombine aşılar Kombi A ve Kombi B aşıları olarak isimlendirildiler.

Kombi A ve Kombi B 6’lı karma aşılarla, bu aşıların bileşimine giren monovalan aşıların deney hayvanlarındaki bağışıklık sonuçları aşağıda tablolar halinde özetlenmektedir.

Tablo 3: Me.I ' e göre üretilen monovalan aşuların deney hayvanlarındaki bağışıklık sonuçları

Antijen Sıra No	AS	AF	ADHS	AD	BS (IU/ml.)
1	Cl.perf.tip A (107)	T	6 Tavşan	0.6 ml.	0 - 2.5
2	Cl.perf.tip A (NCTC,8237)	T	6 Tavşan	0.75 ml.	0 - 2.5
3	Cl.perf.tip C (Silivri)	T	6 Tavşan	0.45 ml.	0 - 2.5
4	Cl.perf.tip C (NCTC,3180)	T	6 Tavşan	0.3 ml.	0 - 2.5
5	Cl.perf.tip D (Afrika)	T	6 Tavşan	0.3 ml.	0 - 2.5
6	Cl.perf.tip D (NCTC,8346)	T	6 Tavşan	0.45 ml.	0 - 2.5
7	Cl.oed. tip A (UK)	T	10 Kobay	0.3 ml.	10 >
8	Cl.oed. tip A (NCTC,538)	T	10 Kobay	0.3 ml.	10 >
9	Cl.septicum (VS 54)	T	6 Tavşan	0.45 ml.	0 - 2.5
10	Cl.septicum (NCTC,547)	T	6 Tavşan	0.45 ml.	5 - 10
11	Cl.chauvoei (Pendik,no:20)	AKT	10 Kobay	0.75 ml.	% 100 Koruma

AS: Aşı suşu, **AF:** Aşı formu, **ADHS:** Aşılanan deney hayvanı sayısı, **AD:** Aşı dozu,

BS: Bağışıklık sonucu

Tablo 4: Me.I ' e göre üretilen 6'lı kombine aşuların (Kombi A ve B) deney hayvanlarındaki bağışıklık sonuçları

Antijen Sıra No	Kombi A' daki Aşı Suşu	AF	ADHS	AD	BS (IU/ml.)
1	Cl.perf.tip A (107)	T	10 Tavşan	0.6 ml.	0 – 2.5
3	Cl.perf.tip C (Silivri)	T	10 Tavşan	0.45 ml.	0 – 2.5
6	Cl.perf.tip D (NCTC,8346)	T	10 Tavşan	0.45 ml.	0 – 2.5
7	Cl.oed. tip A (UK)	T	10 Kobay	0.3 ml.	10 >
9	Cl.septicum (VS 54)	T	10 Tavşan	0.45 ml.	0 – 2.5
11	Cl.chauvoei (Pendik,no:20)	AKT	10 Kobay	0.75 ml.	% 100 Koruma

Total Doz: (2+1 ml., 21 gün ara ile)

3 ml.

Antijen Sıra No	Kombi B' deki Aşı Suşu	AF	ADHS	AD	BS (IU/ml.)
2	Cl.perf.tip A (NCTC,8237)	T	10 Tavşan	0.75 ml.	0 – 2.5
4	Cl.perf.tip C (NCTC,3180)	T	10 Tavşan	0.3 ml.	0 – 2.5
5	Cl.perf.tip D (Afrika)	T	10 Tavşan	0.3 ml.	0 – 2.5
8	Cl.oed. tip A (NCTC,538)	T	10 Kobay	0.3 ml.	10 >
10	Cl.septicum (NCTC,547)	T	10 Tavşan	0.45 ml.	2.5 – 5
11	Cl.chauvoei (Pendik,no:20)	AKT	10 Kobay	0.75 ml.	% 100 Koruma

Total Doz: (2+1 ml., 21 gün ara ile)

3 ml.

AS: Aşı suşu, **AF:** Aşı formu, **ADHS:** Aşılanan deney hayvanı sayısı, **AD:** Aşı dozu,

BS: Bağışıklık sonucu

Bu proje ile 6'lı kombine bir aşının deneysel bazda üretimi amaçlandığından Me.I' e göre hazırlanan her iki kombinasyonda da asgari 2.5 IU/ml. düzeyinde bağışıklık vermesi hedeflendi. Yeterli düzeyde bağışıklık vermeyen bir türe ait suş çiftleri (Cl.perf. tip A , Cl.perf. tip C ve Cl.perf. tip D) yeniden kültüre edilerek inaktivasyon sonrası sadece 5 µm.' lik kartuj filtreden süzdürülerek prefiltrasyon işlemi değiştirildi. Prefiltrasyonu takiben ilk üretimlerinde olduğu gibi kültürlerin ultrafiltrasyon işlemi ile konsantrasyonları sağlandı.

Bu üç çift suş ile hazırlanan aşılar anakültür toksoid (AKT) formunda olduklarından ve yeniden hazırlanan kombinasyonlarda monovalan aşı oranlarında değişikliğe gidildiğinden, yeni kombinasyonlar Kombi X ve Kombi Y olarak isimlendirildi. Kombi X ve Kombi Y aşıları suş kompozisyonları itibarı ile Kombi A ve Kombi B karmaları ile örtüşürken bileşenlerin payları itibarı ile değişiklikler göstermektedirler.

Kombi X ve Kombi Y 6'lı karma aşılarla bu aşılarının bileşimine giren monovalan aşılardan deney hayvanlarındaki bağışıklık sonuçları aşağıda tablolar halinde özetlenmektedir.

Tablo 5: Me.I (T) ve Me.II (AKT)' ye göre üretilen monovalan aşılardan deney hayvanlarındaki bağışıklık sonuçları

Antijen Sıra No	AS	AF	ADHS	AD	BS (IU/ml.)
1	Cl.perf.tip A (107)	AKT	6 Tavşan	0.75 ml.	0 - 2.5
2	Cl.perf.tip A (NTCT,8237)	AKT	6 Tavşan	0.75 ml.	0 - 2.5
3	Cl.perf.tip C (Silivri)	AKT	6 Tavşan	0.45 ml.	2.5 - 5
4	Cl.perf.tip C (NTCT,3180)	AKT	6 Tavşan	0.45 ml.	0 - 2.5
5	Cl.perf.tip D (Af)	AKT	6 Tavşan	0.45 ml.	0 - 2.5
6	Cl.perf.tip D (NTCT,8346)	AKT	6 Tavşan	0.45 ml.	10>
7	Cl.oed. tip A (UK)	T	10 Kobay	0.3 ml.	10 >
8	Cl.oed. tip A (NTCT,538)	T	10 Kobay	0.3 ml.	10 >
9	Cl.septicum (VS 54)	T	6 Tavşan	0.45 ml.	0 - 2.5
10	Cl.septicum (NTCT,547)	T	6 Tavşan	0.45 ml.	5 - 10
11	Cl.chauvoei (Pendik,no:20)	AKT	10 Kobay	0.6 ml.	% 100 Koruma

AS: Aşı suşu, **AF:** Aşı formu, **ADHS:** Aşılardan deney hayvanı sayısı, **AD:** Aşı dozu, **BS:** Bağışıklık sonucu

NOT: Aşı dozunun 2/3'ü ilk uygulamada, 1/3'ü ise 21 gün sonraki ikinci uygulama ile deney hayvanlarına injekte edildi. Aşı uygulaması Cl.chauvoei için ise tek injeksiyon olarak yapıldı.

Tablo 6: Me.I (T) ve Me.II (AKT) 'ye göre üretilen 6'lı kombine aşılardan (Kombi X ve Y) deney hayvanlarındaki bağışıklık sonuçları

Antijen Sıra No	Kombi X' teki Aşı Suşu	AF	ADHS	AD	BS (IU/ml.)
1	Cl.perf.tip A (107)	AKT	10 Tavşan	0.75 ml.	0 - 2.5
3	Cl.perf.tip C (Silivri)	AKT	10 Tavşan	0.45 ml.	5 - 10
6	Cl.perf.tip D (NCTC,8346)	AKT	10 Tavşan	0.45 ml.	10>
7	Cl.oed. tip A (UK)	T	10 Kobay	0.3 ml.	10 >
9	Cl.septicum (VS 54)	T	10 Tavşan	0.45 ml.	0 - 2.5
11	Cl.chauvoei (Pendik,no:20)	AKT	10 Kobay	0.6 ml.	% 100 Koruma

Total Doz:(2+1 ml., 21 gün ara ile)

3 ml.

Antijen Sıra No	Kombi Y' deki Aşı Suşu	AF	ADHS	AD	BS (IU/ml.)
2	Cl.perf.tip A (NCTC,8237)	AKT	10 Tavşan	0.75 ml.	0 - 2.5
4	Cl.perf.tip C (NCTC,3180)	AKT	10 Tavşan	0.45 ml.	0 - 2.5
5	Cl.perf.tip D (Afrika)	AKT	10 Tavşan	0.45 ml.	0 - 2.5
8	Cl.oed. tip A (NCTC,538)	T	10 Kobay	0.3 ml.	10 >
10	Cl.septicum (NCTC,547)	T	10 Tavşan	0.45 ml.	2.5 - 5
11	Cl.chauvoei (Pendik,no:20)	AKT	10 Kobay	0.6 ml.	% 100 Koruma

Total Doz:(2+1 ml., 21 gün ara ile)

3 ml.

AS: Aşı suşu, **AF:** Aşı formu, **ADHS:** Aşılardan deney hayvanı sayısı, **AD:** Aşı dozu,

BS: Bağışıklık sonucu

Koyunlardaki bağışıklık çalışmaları 24 adet Enstitü ve 48 adet gönüllü sürü (Silivri/İstanbul) koyunlarında yürütüldü.

Enstitü koyunlarının 12'si ve gönüllü sürü koyunlarının 24'ü Kombi X ile, kalan yarısı da Kombi Y ile 21 gün aralıklı olarak aşılandılar. II. aşılardan 10 gün sonra sürülerdeki her bir kombinasyonla aşı 6'şar koyundan tesadüfi örnekleme ile kan alınarak serumları ayrıldı. Serumlarda sırası ile 0.25, 1, 2.5 ve 5 IU/ml. düzeylerinde antitoksin varlığı TNT ile araştırıldı. Her iki sürüye ait sonuçların ortalama değerleri Tablo 7 ve 8'de verilmektedir.

Tablo7: 6'lı Kombi X aşısının koyun bağışıklık sonuçları

Antijen Sıra No	Kombi X' teki Aşı Suşu	AF	AKS	AD	BS (IU/ml.)
1	Cl.perf.tip A (107)	AKT	12/36	0.75 ml.	0 – 0,25
3	Cl.perf.tip C (Silivri)	AKT	12/36	0.45 ml.	2.5 - 5
6	Cl.perf.tip D (NCTC,8346)	AKT	12/36	0.45 ml.	5 >
7	Cl.oed. tip A (UK)	T	12/36	0.3 ml.	2.5 - 5
9	Cl.septicum (VS 54)	T	12/36	0.45 ml.	5 >
11	Cl.chauvoei (Pendik,no:20)	AKT	12/36	0.6 ml.	% 100 Koruma

Total Doz: (2+1 ml., 21 gün ara ile)

3 ml.

AF: Aşı formu, **AKS:** Aşılanan koyun sayısı, **AD:** Aşı dozu, **BS:** Bağışıklık sonucu

Tablo 8: 6'lı Kombi Y aşısının koyun bağışıklık sonuçları

Antijen Sıra No	Kombi Y' deki Aşı Suşu	AF	AKS	AD	BS (IU/ml.)
2	Cl.perf.tip A (NCTC,8237)	AKT	12/36	0.75 ml.	0 – 0.25
4	Cl.perf.tip C (NCTC,3180)	AKT	12/36	0.45 ml.	0.25 - 1
5	Cl.perf.tip D (Afrika)	AKT	12/36	0.45 ml.	2.5 - 5
8	Cl.oed. tip A (NCTC,538)	T	12/36	0.3 ml.	2.5 - 5
10	Cl.septicum (NCTC,547)	T	12/36	0.45 ml.	5 >
11	Cl.chauvoei (Pendik,no:20)	AKT	12/36	0.6 ml.	% 100 Koruma

Total Doz : (2+1 ml., 21 gün ara ile)

3 ml.

AF: Aşı formu, **AKS:** Aşılanan koyun sayısı, **AD:** Aşı dozu, **BS:** Bağışıklık sonucu

Araştırmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda Cl. Perfringens tip A suşları hariç, diğer suş çiftlerinin en az birisinde yeterli (2.5 IU/ml.) veya yeterli düzeyin üstünde bir bağışıklık seviyesinin eldesi ile 6'lı anaerob kombinasyon için 5 antijenin varlığı belirginleşmiştir. Bunlar ; 3, 6, 10 ve 11 no' lu antijenler ile 7 veya 8 no' lu antijenlerden biri olup, tavşandaki kombine aşı sonuçlarına göre bu antijenler için sırası ile 5-10, 10>, 2.5-5, 10> veya 10> IU/ml. değerleri ve 11 no' lu antijen olan Cl.chauvoei' deki % 100 koruma elde edilmiştir. Söz konusu 5' li kombinasyonun total dozu 2,25 ml.'dir. Kombi X ve Kombi Y karmalarının her biri TİGEM' e bağlı Atatürk Tarım İşletmesi' ne ait 30 adet süt sığırında 15' erli 2 grup halinde deneysel olarak 5 cc.' lik tek bir doz ile s.c. uygulandılar. Bu çalışma salt gözlem amaçlı olduğu için sığır kanları antitoksin düzeyleri yönünden araştırılmadı.

TARTIŞMA

Değişik kombinasyon denemeleri ile bileşime giren komponentlerden Cl. perfringens tip A suşları dışındaki tüm diğer suş çiftlerinin en az birisiyle yeterli bağışıklık elde edildi. Cl. perfringens tip A suşları ile hazırlanan monovalan ve kombine formulu aşıların bağışıklık denemelerinin hiç birinde asgari düzeyde de (0.25 IU/ml.) olsa α -antitoksininin varlığı saptanamadı. Cl. perfringens tip A ile ilgili sonuçları doğrular nitelikte İsoolatovskaya (14), araştırmalarında koruyucu antikorların görülmediğini, güçlü bir bağışıklık elde edemediğini, ancak aşıları hayvanlarda gelişmiş bir direncin varlığına işaret etmektedir. Cl.perfringens tip A ile ilgili olarak araştırmacılar, suşun, antijen üretim koşullarının ve aşı dozunun önemli olduğu noktada birleşirken, verilen immun yanıtın yeterliliği konusunda bir fikir birliği sağlayamamaktadırlar (14, 30).

Me.II' ye göre üretilen aşıların (AKT aşılar) dozlarındaki çok küçük artışlar (0.3 ml.'den 0.45ml' ye varan) sonucu Cl. perfringens tip C (Silivri), Cl. perfringens tip D (8346) suşları ile tavşanlarda güçlü antitoksin değerleri elde edildi. Ancak bu değerlerin inaktif kültürün prefiltrasyon işlemindeki değişimden kaynaklandığı sonucu çıkarılmamalıdır, zira Me.I' e göre konsantre edilen inaktif kültürlerin bir paraleli Me.II' ye göre konsantre edildiğinde yeterli bağışıklık sağlamadıkları gözlemlendi, fakat bu gözlem sonuçlara yansıtılmadı. Bu nedenlerle Cl. perfringens tip C ve tip D suş çiftleri yeniden kültüre edilerek inaktivasyon sonrası Me.II' ye göre konsantre edilip, hazırlanan aşıların dozlarındaki çok küçük değişikliklerle yeniden potens testine alındılar (Tablo: 6, 7 ve 8).

Cl.perfringens tip C ve tip D monovalan ve kombine formulu aşılarıyla aşılanan tavşanlarda, β antitoksini kombinasyonda monovalan formuna göre 2 kat daha güçlü değerlerde (5-10 IU/ml.) bulunduğu halde, ϵ antitoksini titresini, monovalan ve kombine formda ölçülen değerler itibarı ile bir değişiklik göstermemektedir.

Pürüfiye toksoid Cl. oedematiens tip A aşılarında, gerek monovalan ve gerekse kombine formlarla aşılanan kobaylardaki α antitoksini düzeyi, aynı değerlerde (10 IU/ml.>) saptandı.

Cl. septicum (NCTC 547) pürüfiye toxoidi ile hazırlanan aşılarında ise monovalan formu kombinasyondaki formuna göre tavşanda 2 kat daha güçlü α -antitoksini (5-10 IU/ml.) titresini oluşturdu.

Cl. chauvoei ile hazırlanan AKT aşısı monovalan ve kombine formdaki kobay bağışıklık denemelerinin tümünde %100 koruma ile stabil bir bağışıklık sağladı.

Yukarıdaki deney hayvanlarında gözlenen bağışıklık sonuçlarındaki dalgalanmalar dikkate alındığında, elde edilen sonuçlar *Cl. perfringens* tip C ve *Cl. chauvoei* aşılara tepkimeler yönünden Sterne ve ark. (24)'nın elde ettiği sonuçlarla örtüşmekte, *Cl. perfringens* tip D ve *Cl. septicum* sonuçları ile kısmen uyumsuzluk göstermektedir.

Cl. oedematiens tip A ile ilgili bağışıklık çalışmaları bir çok literatürde (1, 8, 10, 24) tavşanlar üzerinde yürütüldüğü ve kobaylarda monovalan ve kombine formda karşılaştırılmalı olarak test edilmediği için, bu araştırmada elde edilen sonuçları kıyaslamak mümkün olmamakla beraber, genelinde tavşan titreleri kobay titrelerine göre 3-10 kat daha düşük çıkmaktadır (31).

6'lı kombine aşı denemelerinin deney hayvanları (tavşan, kobay) ve koyunlarda elde edilen sonuçları karşılaştırıldığında *Cl. perfringens* tip A komponentinin gerek tavşanlarda gerekse koyunlarda ölçülebilir düzeyde dahi antitoksin titresini oluşturmadığı belirlendi. Bu durumun olası nedeni, genelde letal gücü, hemolitik gücüne göre daha zayıf olan alfa toksininin, antijenik dahi olsa, toksoid hale geçtiğinde antijenisitesindeki azalmadan kaynaklanıyor olması olabilir (23).

Kombinasyondaki *Cl. perfringens* tip C, *Cl. perfringens* tip D, *Cl. oedematiens* tip A aşılarının deney hayvanları ile koyun bağışıklık sonuçları karşılaştırıldığında *Cl. perfringens* tip C (Silivri) β antitoksini, *Cl. perfringens* tip D (8346) ϵ antitoksini, *Cl. oedematiens* tip A (UK ve NCTC 538 suşları) α antitoksini değerleri, koyun serumlarında sırası ile 2, 2 ve en az 4 kat titre düşüşleri göstererek 2.5-5, 5> ve 2.5-5 IU/ ml. düzeyine inmişlerdir.

Cl. septicum suş çiftlerinin koyun bağışıklık sonuçlarının tavşan bağışıklık sonuçlarına göre 2 kat yüksek çıkarak 5 IU/ ml.> değere ulaştığı saptandı. Aynı tarzda tavşanlarda bağışıklık vermeyen *Cl. perfringens* tip D (AF) suşu koyunlarda 2.5-5 IU/ ml. değeriyle bağışıklık verdi.

Cl. chauvoei'nin koyun bağışıklık ölçümleri yapılmadığından, değerlendirmeler kobay epruvasyon testleri ile sınırlandırılmıştır. Crichton ve ark.(7), kobay bağışıklığı ile koyun bağışıklığı arasında pozitif bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir.

Yukarıdaki sonuçlar gerek bu suşlara ait ölçülen toksin ve antitoksin değerleri, gerekse monovalan ve kombine formlar arasındaki titre değişimleri açısından birçok araştırmacının (1, 8, 10, 12, 18, 31) bulguları ile büyük ölçüde örtüşmektedir.

Bazı araştırmacılar (9, 24) koyun ve tavşanlar üzerinde kombine aşılarla yaptıkları karşılaştırmalı denemelerde β ve ϵ antitoksin değerlerinde 3-10 kata varan düşüşler gözlemlenmişlerdir. Ancak *Cl. septicum* ve *Cl. oedematiens* koyun antitoksin değerlerinin tavşan değerlerine göre düşük çıkmasının nedenini açıklayamamaktadırlar. Sterne ve ark.

(24), kombine aşılarıdaki her bir antijenin bağışıklık düzeyinin monovalan formdaki düzeye göre düşük olduğunu ve bu dalgalanmaların küçük deney hayvanlarından büyük evcil hayvanlara doğru (fare, tavşan, kobay, koyun) bir azalma gösterdiğini bildirmektedirler.

Kombine aşılarla ilgili olarak tüm literatürlerde vurgulanan *Cl. chauvoei* komponentinin monovalan ve kombine formlarındaki antijenitesinin değişmediğine dair bilgiler bu çalışmada elde edilen sonuçlarla uyumludur.

Literatürlerce hedef hayvandaki (koyun, keçi) koruyucu minimal antitoksin değerleri struck ve kuzu dizanterisi'nde 0.1- 0.15 IU/ml.β, pulpey kidney'de 0.2 IU/ml.ε, enfeksiyöz nekrotik hepatitis'de 0.2 IU/ml.α, bradzot'da 0.4- 0.5 IU/ml.α olarak literatürlerce kabul görmektedir (12, 15, 16, 31). Yukarıdaki veriler ışığında Kombi X ve Kombi Y ile aşıları koyunlarda (Tablo 7 ve 8) *Cl. perfringens* tip A aşısı dışındaki tüm diğer aşılarında korunma sağlandığı sonucu çıkmaktadır.

Kombine aşılarla ilgili denemelerde lokal aşı reaksiyonları normal sınırlar içerisinde kalmış olup genel reaksiyonlar ise gözlemlenmemiştir.

Her iki koyun sürüsünün aşılmasından 1 yıl, sığırların aşılmasından ise 3 ay geçmesine rağmen şüpheli bir Clostridial enfeksiyona rastlanmamıştır.

Beş antijen içeren kombine Clostridial aşı deneysel olarak üretilmeye çalışılmış ve yeterli bağışıklık sağladığı belirlenmiştir. Gelecekte, endüstriyel düzeyde üretimi sağlanarak, aşılamının yurt genelinde yaygınlaştırılması düşünülmelidir.

KAYNAKLAR

1) Ardehali, M., Darakhshan, H. and Mossawi, M. (1985) : Mass Production and Standardization of *Clostridium oedematiens* Vaccine against Black Disease. IABS Symposium on Reduction of Animal Usage in the Development and Control of Biological

Products London UK. 1985. Develop biol. Standard. Vol. 64 , 137-140 (S. Karger, Basel , 1986)

2) Barr, M. and Llewellyn Jones, M. (1953) : British J. Exp, Path.,34.12 Ibid. 233

3) Bartholomew, B. A. , Stringer , MF.,Watson, GN. and Gilbert, R.J.(1985) : Developemnt and Application of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Clostridium perfringens Type A Enterotoxin. J. Clin. Pathol., 38, 222-228

4) Blobel, H und Schliesser, T. (1984) : Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren. Band II,1. Auflage,VEB Gustav Fischer Verlag 1980

5) British Pharmacopaeia: British Veterinary Codex (1965): The Pharmaceutical Press/ London

6) Clarkson, M.J., Faul,W.B. and Kerry, J.B.(1985) : Vaccination of cows with clostridial antigens and passive transfer of clostridial antibodies from bovine colostrum to lambs. Veterinary Record, 116: 467-469

7) Crichton, R., Haris, D.A. and McKay,D.J.(1986) : Standarts for Cl.chauvoei vaccine- The Rationship between the response of guine pigs and sheep following vaccination and challenge with virulent Cl.chauvoei. Australian Vet.Journal, 63 (3) , 68-70

8) Egeleton, D.G., Doidge, C.V., Middleton, H.D. and Minty, D.W.(1991) : Immunisation against ovine caseous Iymphadenitis: efficacy of monocomponent Corynebacterium pseudotuberculosis toxoid vaccine and combined clostridial vaccine. Veterinary Journal, 68(10) :320-321

9) Frerichs ,G.N. and Gray,A.K.(1975): The relation between the rabbit potency test and the response of sheep to sheep clostridial vaccines. Research in Veterinary Science, 18 , 70-75

10) Gadalla, M.S.A., Farrag, I., El-Sahaat, F., AL-Bendary, T. and Moustafa,R.(1969): Studies on polyvalent vaccines against some Clostridial disease in sheep. J. Vet. Sci. U.A.R., 6 (1), 1-14

- 11) Goldner, S.B., Solberg, M., Jones, S. and Post, L.S. (1986) : Enterotoxin synthesis by nonsporulating cultures of *Clostridium perfringens*. *App. Environ. Microbiol.*, 52(3), 407-412
- 12) Harbola, P.C. and Verma, J.C.(1988): Immunogenic response to *Cl. novyi* type B toxoid guinea pigs and sheep. *Indian Vet. J.*, 658-660
- 13) Harmon, S. and Kautter, D.A.(1986): Improved media for sporulation and Enterotoxin production by *Clostridium pefringens*. *Journal of food protection*, 49(9), 706-711
- 14) Ispolatovskaya, M.V.(1971): Type A *Clostridium perfringens* toxins. In *Microbiol Toxin*. 2A, 109-149. Academic Press Newyork and London
- 15) Jansen, B.C. (1967) : The duration of immunity to pulpey kidney disease of sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 34(2) , 333-334
- 16) Kennedy, K.K., Norris , S.J., Beckenhauer, W. H. and White, R.G. (1977): Vaccination of cattle and sheep with a combined *Clostridium perfringens* type C and D toxoid. *Am. J. Vet. Res.*, 38 (10), 1515-1517
- 17) Kerry, J.B. and Craig, G.R. (1979): Field studies in sheep with multicomponent Clostridial vaccines. *The Veterinary Record*, 105, 551-554
- 18) Kumar, A.A., Uppal, P.K. and Kataria, J.M.(1992): Studies on enterotoxaemic vaccination in goats and their humoral response. *Indian Vet. J.*, 69, 778-781
- 19) Mayr, A.(1984) : Wesen und Wirksamkeit funktionel-synergistischer kombination vaccinen. *Wiener Tierarzt. Monatsschr*, 71(11), 305-311
- 20) Mayr, A., Eibner, G. and Bibrack, B.M.(1984) : *Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin*. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

- 21) Özyer, M. (1995): Enterotoksemi ve Enfeksiyöz Nekrotik Hepatitis kombine aşısının üretimi ve saha çalışmaları. Pendik Vet. Kont. Ve Araşt.Enst.Derg.,26(2),209-220
- 22) Roberts, R.S., Güven,S., Erdoğan,İ. and Boran,Ş., Worral,E.E. (1968): Clostridial enfeksiyonlara karşı kombine aşılar. Pendik Vet. Kont. ve Araşt. Enst. Derg., 1(3), 49-56
- 23) Smith, L.Ds.and Holdeman, L.V.(1968): The Pathojenic Anaerobic Bacteria. Ed. by Balows, A. Sprigfield, İllinois, U.S.A
- 24) Sterne, M., Batty, I.and Thomson, A.(1962): Immunisation of sheep with multicomponent clostridial vaccines. The Veterinary Record, 74 (34), 909-913
- 25) The Merck Veterinary Manuel (1986): Sixth Edition. Published by Merck Co., Inc. Rahway, N.J. USA
- 26) Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü Enterotoksemi Aşısı Üretim ve Kontrol Protokolü
- 27) Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü İnfeksiyöz Nekrotik Hepatitis Aşısı Üretim ve Kontrol Protokolü
- 28) Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü Yanıkara Aşısı Üretim ve Kontrol Protokolü
- 29) Verma, N.D.(1986): Comparative Efficacy of formalized , Alum precipitated and aliminium hydroxide gel adsorbed bacterin toxoid of Clostridium perfringens Type A. İndian Vet J., 63,704-710
- 30) Verma,N.D.(1987): Immunoglobulin response in rabbits to the use of Cl. perfringens type A vaccine. İndian Journal of Animal Sciences, 57(4), 281-284
- 31) Webster,A. and Frank, C.L.(1985): Comparison of immune response stimulated in sheep, rabbits and guine pigs by the administration of multi-component Clostridial vaccines. Australian Vet. Journal, 62(4),112-114

