

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**BUZAĞI İSHALLERİNE KARŞI AŞILANAN GEBE DÜVELERDE
Corynebacterium cutis LİZATI'NIN KOLOSTRUM
İMMUNGLOBULİN G DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

Proje No: TSY – 12 – 4049

Yüksek Lisans Tezi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Vehbi GÜNEŞ

Veteriner Fakültesi/İç Hastalıkları A.B.D

Hüseyin ÇALIK

Veteriner Hekim

Eylül 2016

KAYSERİ

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BUZAĞI İSHALLERİNE KARŞI AŞILANAN GEBE DÜVELERDE
Corynebacterium cutis LİZATI'NIN KOLOSTRUM İMMUNGLOBULİN
G DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

**Hazırlayan
Hüseyin ÇALIK**

**Danışman
Prof. Dr. Vehbi GÜNEŞ**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından
TSY – 12 – 4049 no'lu proje ile desteklenmiştir.**

**Haziran 2016
KAYSERİ**

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanması esnasında hoşgörüsünü üstümden esirgemeyen, çalışmalarına her türlü desteği sunan danışman hocam Prof. Dr. Vehbi GÜNEŞ'e, hayvanların tedarik edilmesi ve çalışma ortamının sağlanması konusunda her türlü yardımı yapan Karaer Gıda Tarım Hayvancılık İşletmesi sahibi Rahmetli Orhan KARAER'e, ve oğlu Fatih KARAER'e, çalışmam esnasında görev yaptığım Nevşehir Avanos TİM Veteriner Hekim Ahmet AYDIN ve Veteriner Sağlık Teknisyeni Ahmet ÇAĞLI'ya, biyokimyasal analizlerimin hazırlanması ve tamamlanması esnasında göstermiş olduğum gayreti destekleyen ve bana sabırla yardımcı olan Erciyes Üniversitesi Merkez Laboratuvarı çalışanlarına, tezimin ELİSA analizlerinin yapımında yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen ERÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Mustafa ÇAKIR'a ERÜ Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Mehmet ULUSAN'a tezin maddi desteğini sağlayan ERÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine, yüksek lisansımı bitirmem konusunda heyecanını ve desteğini hep hissettiğim canım eşim Candan ÇALIK'a ve Biricik oğlum Erol Emir ÇALIK'a yürekten teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Buzağı ishalleri ve önemi	4
2.2. Kolostrumun Buzağılar için Önemi.....	8
2.4. Veteriner Hekimliğinde İmmunomodulasyon	11
2.4.1. Corynebacterium cutis lizati	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. Kullanılan Denek Cinsi Sayısı ve Dağılımı.....	15
3.2. Kan ve kolostrum örneklerin toplanması	16
3.3. Hematolojik Analizler	17
3.4. Biyokimya Analizleri.....	17
3.5. Kolostrum Dansitesi Analizleri	17
3.6. Serum ve Kolostrum Immunglobulin G Analizleri	18
3.7. ELİSA Analiz Protokolü	18
3.7. İstatistik Analizler	19
4. BULGULAR.....	21
4.1. Klinik Muayene Bulguları	21
4.2. Biyokimya Analiz Bulguları.....	21
4.3. Hematoloik Analiz Bulguları	23
4.3. Kan serumunda İmmunglobulin G Analiz Bulguları.....	24
4.4. Kolostrum örneklerinde İmmunglobulin G Analiz Bulguları	27

5. TARTIŞMA ve SONUÇ	30
KAYNAKLAR.....	42

BUZAĞI İSHALLERİNE KARŞI AŞILANAN GEBE DÜVELERDE *Corynebacterium cutis* LİZATI'NIN KOLOSTRUM İMMUNGLOBULİN G DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Hüseyin ÇALIK

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2016

Danışman: Prof. Dr. Vehbi GÜNEŞ

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, buzağı ishallerine karşı aşılanan gebe düvelerde *corynebacterium cutis* lizati'nın kolostrum immunglobulin G düzeylerine etkisini araştırmaktır. Bu amaçla, Nevşehir ili Kalaba ilçesinde bulunan ticari bir sürüdeki klinik açıdan sağlıklı Holstein düvelerden seçilen 30 adet sütücü sığır çalışma materyalini oluşturmuştur. Tüm hayvanlar rastgele üç gruba bölünmüş ve gebeliklerinin son altıncı ve üçüncü haftalarında tüm enjeksiyonlar yapılmıştır. Birinci gruba kontrol amacıyla belirtilen zamanlarda yalnız serum fizyolojik enjekte edilirken, ikinci gruba; yalnız inaktif Rota, Coronavirus antijenleri ve inaktif enteropatojenik E.Coli'nin 3 serovar'ını içeren ticari bir trivalan aşı (Kolibin RC Neo®, Interhas-Turkey) 2 mL kas içi verilmiştir. Her bir aşı enjeksiyonu ile birlikte *Corynebacterium cutis* lizati (Ultra-corn® Inj. Susp. Virbac-France) enjeksiyonu aynı zamanlarda üçüncü gruba uygulanmıştır. Kan örnekleri enjeksiyonlardan önce ve düvelerin doğum yaptığı gün kuyruk venasından alınmıştır. Kolostrum örnekleri doğumdan hemen sonra toplanmıştır. Serum ve ağız sütündeki IgG seviyelerini tespit etmek için ticari bir ELISA kiti (Bovine IgG, MyBioSource, USA) kullanılmıştır. Gebeliğin son üçüncü haftasında ve doğumun gerçekleştiği günde sadece aşıya maruz kalan düvelerdeki IgG seviyelerinin ortalaması ($36,69 \pm 17$ mg/ml) istatistiksel olarak kontrol düvelerinkinden daha yüksek ($16,40 \pm 8,68$ mg/ml) bulunmuştur. Ancak, gebeliğin son üçüncü haftasında üçüncü grubun IgG seviyelerinin ortalama değeri $81,06 \pm 48,27$ mg/ml olup diğer gruplarinkinden anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Doğumun gerçekleştiği gündeki IgG seviyelerinin ortalaması ikinci ($90,01 \pm 63,45$ mg/ml) ve üçüncü ($100,59 \pm 56,05$ mg/ml) gruplar arasında istatistiki farklılık göstermemiştir. Bununla beraber, üçüncü grubun kolostrum örneklemindeki IgG seviyelerinin ortalama değeri ($38,25 \pm 3,66$ mg/ml), birinci ($16,23 \pm 3,72$ mg/ml) ve ikinci ($25,09 \pm 5,98$ mg/ml) gruplarinkinden istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen bulgular ışığında, *Corynebacterium cutis* Lizatının gebe düvelerin serum ve kolostrumlarında IgG seviyelerinde önemli bir artışa neden olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Buzağı, *Corynebacterium cutis* lizat, ağız sütü, düve, aşı

**THE EFFECT OF *Corynebacterium cutis* LYSATE ON THE LEVEL OF
COLOSTRUM IMMUNOGLOBIN-G IN PREGNANT HEIFERS VACCINATED
AGAINST NEONATAL CALF DIARRHOEA**

Hüseyin ÇALIK

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Veterinary Internal Medicine

M. Sc. Thesis, Haziran 2016

Supervisor: Prof. Dr. Vehbi GÜNEŞ

ABSTRACT

In the present study, it was aimed to investigate the effect of commercial *Corynebacterium cutis* Lysate injections on immunoglobulin G (IgG) levels of heifers vaccinated with a trivalent vaccine. For this purpose, the sample of the study consisted of 30 heifers selected from clinically healthy Holstein heifers in a commercial herd in the province Nevşehir, Turkey. The animal samples were randomly divided into 3 groups and injected on last 6th and 3th weeks of pregnancy. While isotonic saline solution was injected to Group I, 2 mL of a commercial trivalent vaccine (Kolibin RC Neo®, Interhas-Turkey) - containing inactive Rota and Coronavirus antigens and inactive enteropathogenic E.Coli 3 serovar - was given intramuscularly to Group II. Furthermore,, *Corynebacterium cutis* lysate (Ultra-corn® Inj. Susp. Virbac-France) injection was concurrently carried out to Group III. Colostrum samples were immediately collected after the birth. Blood samples were also gathered from coccygeal vein before the injections and on the day of the birth in heifers. A commercial ELISA kit (Bovine IgG, MyBioSource, USA) was deployed to determine IgG levels in serum and colostrum. Mean level of IgG levels in heifers (Group II), which were exposed to only vaccine ($36,69 \pm 17$ mg/ml), was statistically higher than that of control heifers ($16,40 \pm 8,68$ mg/ml) on the last 3th week of pregnancy and the day of the birth. However, mean value of IgG levels in Group III ($81,06 \pm 48,27$ mg/ml) was significantly higher than those of other groups on the last 3th week of pregnancy. Mean score of IgG levels on the day of the calving showed no difference between Groups II ($90,01 \pm 63,45$ mg/ml) and III ($100,59 \pm 56,05$ mg/ml). Further, mean value of IgG levels in Group III of colostrum samples ($38,25 \pm 3,66$ mg/ml) was statistically higher than those of Groups I ($16,23 \pm 3,72$ mg/ml) and II ($25,09 \pm 5,98$ mg/ml). In the light of the results, it can be concluded that *Corynebacterium cutis* Lysate with a calf diarrhoea vaccine cause a significant increase at IgG levels in serum and colostrum of pregnant heifers.

Key Words: Calf, *Corynebacterium cutis* Lysate, colostrum, heifer, vaccine

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde insan hekimliği alanında ticari olarak satışta bulunan *Saccharomyces cerevisiae*'nin hücre duvarından elde edilen bir polisakkarit olan İmmunex ile Veteriner hekimliği alanında inaktif *Parapoxvirus ovis* D1701 suju Zylexis ve *Corynebacterium cutis* lizatı (CCL) olan Ultra-corn gibi patojenik etkinliği düşük, bakteri veya virus antijenleri ile hazırlanmış çeşitli immunstimulant preparatlar bulunmaktadır. Nonspesifik immun stimulant *Corynebacterium cutis* Lizatının (Ultra-corn, Virbac-Fransa) Veteriner hekimliğinde kullanımı hakkında bazı çalışmalar bulunmakla birlikte (1-4), özellikle gebe ineklerde aktif bağışıklığın sağlanmasında kullanılacak aşılarda birlikte bu ilaçların nonspesifik immune modölatör etkisi bilinmemektedir.

Buzağı ishallerinin özellikle hayatın ilk günlerinde ortaya çıkışın hayvanlardaki immun yetmezlik tablosu önemli görülmektedir. Yetersiz immüniteyi ortadan kaldırmak için anaların aktif olarak bağışıklığı ve/veya buzağının pasif bağışıklığının sağlanması gerekir.

Buzağı yetiştiriciliğinde aktif bağışıklık; anaların spesifik hastalıklara karşı aşılması ile pasif bağışıklık ise, kolostrumla ana kanından meme bezlerine geçen spesifik immunoglobulinlerin buzağın tarafından alınması sayesinde oluşturulur. Buzağılardaki aktif bağışıklık mekanizması maternal antikor düzeyinin ortadan kalktığı, buzağının kendi immun durumlarının geliştiği zaman olan genellikle 3-4 aylık dönemden sonra gelişmekte ve bu dönemden sonra aktif bağışıklık için aşılama yapılmaktadır. Ruminantlarda plasentanin sindesmodorial tip plaseenta olması nedeniyle immunoglobulinin anneden yavruya geçişi mümkün olmaz (5). Buzağın doğduklarında yeterli oranda immunoglobuline (Ig) sahip değildirler. Bu

durum hipo ya da agammaglobulinemik olarak ifade edilir. Pasif immun transferin sağlanabilmesi için kolostrum ile anadan Ig'lerin yeterli miktarda alınması gereklidir. Pasif transferi etkileyen çeşitli faktörler vardır. Bunlar arasında en önemlileri; spesifik kolostral Ig, ilk kolostrum alma zamanı ve alınan Ig'lerin miktarı yer almaktadır (6). Doğumu izleyen 24 ile 48 saat sonra, buzağuların Ig'leri sindirme kapasiteleri belirgin olarak azalmaktadır. Bu nednele doğum sonrasında buzağuların acilen kolostrum almaları buzağı sağlığı ve gelecek verimleri açısından oldukça önemlidir (7). Bir buzağı, kendi immunoglobulinlerini yaklaşık 10 günlükten itibaren üretmeye başlar. Takiben 8 hafta sonunda normal Ig seviyelerine ulaşır (8). Buzağuların doğumdan 24 ve 48 saat sonrasında kan IgG seviyelerinin 10 mg/ml'den az olduğu durumlar "Pasif Transfer Yetmezlik" (PTY) olarak tanımlanmaktadır. Pasif transfer yetmezliği olan buzağuların hastalıklara yakalanma ve ölüm oranları, ilk iki aylık dönemde yeterli bağışıklığa erişmiş buzağılara göre daha yüksek olduğu görülmektedir. PTY'nin nedenleri arasında, kolostrumun geç verilmesi, buzağının kalitesiz kolostrumla beslenmesi, emilen kolostrumun Ig konsantrasyonu annenin yaşı, kolostrumu depolama, annenin ırkı ve buzağılarda şekillenen respiratorik asidozis gibi faktörler bulunmaktadır (9). Buzağılarda PTY oranları çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Yetmezlik oranları yetiştiriciliğin tipi ve hayvana göre değişmekle birlikte genellikle % 10 ve bazı sürülerde % 40'a kadar yükselebilmekte ve önemli bir problem haline gelmektedir. Ölüm oranı bu buzağılarda, yeteri kadar Ig alabilen buzağılara kıyasla 3 ile 10 kat daha fazla olmaktadır. Enfeksiyonlardan ölen buzağuların % 90'ında PTY söz konusudur (6).

Kolostrum doğumdan önce meme bezlerinin oluşturduğu özel bir salgıdır. Bu salgı protein, yağ, karbonhidrat, su ve yağda eriyen vitaminler, büyüme faktörleri, nükleotidler, sitokinler, komplement ve immunoreaktif hücreler içermektedir. Renk ve içerik bakımından normal sütlerden tamamen farklı bir salgıdır. İkinci ve sekizinci laktasyonlar arasındaki sütler, içeriğinin giderek normal süt haline dönüşmesi ve emiliminin yeterince sağlanamaması nedeniyle kolostrumdan farklıdır ve bu dönemde "transit süt" olarak tanımlanmaktadır (10). Kolostrum yaklaşık 48 saat içinde transit süt, 72 saat içinde de normal süt halini almaktadır (11).

Bu tez projesinde *E. coli*, *rotavirus* ve *coronavirus* üçlü kombine inaktif aşı uygulamalarının paralelinde yapılacak *Corynebacterium cutis* Lizatı (CCL)

enjeksiyonlarının gebe düvelerde aktif bağışıklığın geliştirilmesi üzerindeki etkinliğinin ortaya konulması amaçlanmaktadır. Bir damızlık işletmesinde kış şartlarında doğum yapan düvelerin kolostrum kalitelerinin arttırılması amacıyla spesifik olmayan bir immunstimulantın özellikle kolostrum IgG düzeylerine etkileri bu projeyle ortaya konulmuştur.

İneklerden elde edilen kolostrumların hepsinin kalitesi aynı değildir. Doğum sonrası dönemde kolostrum kalitesinin erkenden belirlenmesi ve iyi kaliteli kolostrumun verilmesi hastalıkların önlenmesi açısından önemlidir. İmmunglobulin düzeyleri kolostrum kalitesinin temel belirleyicisidir. Bu çalışmada kolostrum kalitesi arttırılarak buzağıların daha kaliteli kolostrum alması ve hayatlarının ilk dönemlerindeki problemlerin en aza indirilmesi hedeflendi. Bu doğrultuda seçilen düveler çalışma kapsamında değerlendirildi. Toplam 30 dve 3 gruba ayrılarak çalışıldı Gruplardan birine iki kez aşı (*E. coli*, *Rotavirus* ve *coronavirus*) uygulandı. Diğer gruba ise aşı ve plasebo uygulamalarına eş zamanlı toplam 2 uygulama şeklinde CCL enjekte edildi. Diğer grup ise kontrol amacıyla kullanıldı. Nonspesifik bir ticari immunstimulantın kolostrum kalitesi ve ananın periferel kan IgG düzeyleri üzerindeki etkinliği ilk kez bu tez proesi ile araştırıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Buzağı ishalleri ve önemi

Buzağı hastalıkları ve ölümleri, sığır yetiştiriciliği yapılan tüm işletmelerde önemli sağlık problemlerinden biri olup ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Buzağının hayatlarının ilk dönemlerinde ishal olayları daha fazla görülürken, ilerleyen aylarda solunum sistemi ve diğer hastalıklar daha fazla yaygınlaşır. Buzağılarda neonatal dönem hastalıklarını infeksiyöz (bakteriyel, viral, paraziter ve mikotik) ve infeksiyöz olmayan (vitamin, mineral madde, iz element yetersizlikleri, konjenital anomaliler vs) olarak sınıflandırmak mümkündür. Yapılan çalışmalarda; güç doğum, sindirim sistemi hastalıkları (ishal, enterotoksemi), solunum sistemi problemleri (pnömöni), sepsisemiler, eklem ve göbek lezyonları, mineral, iz element ve vitamin yetersizlikleri (Vitamin E, İyot, Selenyum yetersizlikleri) ve uygun olmayan çevre koşulları (bakım, barınma, besleme ve iklim gibi) başlıca buzağı ölümlerinin ve hastalıklarının sebebi olarak bulunmuştur (12-16). Bu konu ile ilgili olarak dünyanın çeşitli ülkelerinde, farklı yaş gruplarını kapsayan epidemiolojik çalışmalar yapılmıştır (12, 15, 17, 20). Gelişmiş ülkelerde buzağı mortaliteleri %2-%12 arasında bulunmuştur (12, 14, 18). Nitekim Dutil et al. (19) tarafından gerçekleştirilen anket ve saha çalışmasında perinatal ölümler % 4.9 - % 5.2, Wells et al. (14) tarafından yapılan saha çalışmasında ise 0-8 haftalık buzağılarda ölüm oranı % 6.3 olarak bulunmuştur. Benzer bir çalışmada Sivula et al. (18) 0-16 haftalık buzağılarda mortalite oranını % 11.8 ve yine Donovan et al. (16) 0-6 aylık buzağılarda mortalite oranını % 11.7 olarak bulmuşlardır. Ancak gelişmekte olan ülkelerde mortalite oranlarının daha yüksek olduğu (yaklaşık %35) bildirilmiştir (20). Buzağı kayıplarının nedenlerine göre yapılan

sınıflandırılmalarına göre hayatın ilk dönemlerinde özellikle ishal olaylarının daha çok ön plana çıktığını görmekteyiz. Wells et al. (14) tarafından yapılan bir morbidite çalışmasında buzağılarda, ishal % 24.6, halsizlik % 10, solunum sistemi problemleri % 8.4, dehidrasyon % 4.1 eklem problemleri ve topallık olaylarının % 1.1 oranında görüldüğü bildirilmiştir. Sivula et al. (18) ise inceledikleri buzağılarda % 17.9 oranında enteritis olgularına ve % 9.4 oranında ise pneumöni vakalarına rastlamışlardır. Bu araştırmacılar enteritisli buzağların % 43.8'inin ve pneumönili buzağların ise % 29.7'sinin öldüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca ölen buzağların % 50 sinde pasif kolostral transfer yetmezliğinin mevcut olduğunu saptamışlardır. Dutil et al. (19) ise ishalden % 29 ve pneumönilerden % 18 oranında ölümlerin gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Donovan et al. (16) tarafından yapılan çalışmada ise diyare, pneumöni, septisemi, ve diğer sebeplerden kaynaklanan buzağı ölüm oranları sırası ile, % 10, % 55.4, % 21.9 ve % 11.8 olarak saptanmıştır. Saha çalışmalarının bir kısmında ve konuyla ilgili derlemelerde, buzağı ishallerinde mortalite ve morbiditelerin etiyojisi de açıklanmaya çalışılmıştır. Örneğin Sivula et al. (18) enteritis ve pneumöni olgularında Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV), Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), Parainfluenza-3 (PI-3), Pasteurella hemolytica Pasteurella multocida, Haemophilus somnus, Rota virus ve E. coli mikroorganizmalarını izole etmişlerdir. Blowey (12), Rotavirus, Coronavirus, Cryptosporidium, E. Coli (verotoksijenik veya enterotoksijenik), ve Salmonella mikroorganizmalarının sırasıyla % 42, % 14, % 23, % 13 ve % 12 oranında buzağı ishallerine sebep olduğunu bildirmiştir. Arda (21) yaptığı bir derlemede E coli, Campylobacter spp., Salmonella spp, Cl perfringes tip B ve C, Rota virus, Corona virus, Eimeria spp. ve Cryptosporidium spp. mikroorganizmalarının buzağı ishallerinin temel etiyojistik faktörleri olduğunu bildirmiştir.

Neonatal dönemde görülen hastalıklar ve ölümlerle ilgili yapılan çeşitli derlemelerde; IBR, Rotavirus, Coronavirus, Astrovirus, BVDV, Parvo virus, Adeno viruslar, E. coli, Salmonella, Clostridium perfringes, Campylobacter spp., Eimeria spp. ve Cryptosporidium spp. en çok hastalık ve ölüme yol açan mikroorganizmalar olarak bildirilmektedir (12, 13, 22). Buzağı ishallerine bağlı hastalıkların ve ölümlerin ciddi ekonomik kayıplara yol açtığı bilinmektedir. Blowey (12) ekonomik kayıp; %5 oranında buzağı mortalitesi görülen İngiltere'de yıllık 20 milyon sterline, Amerika

Birleşik Devletlerinde ise 976 milyon Dolara tekabül etmektedir. Ülkemizdeki buzağı ölümlerinin Tarım Bakanlığı'na bağlı işletmelerde yaklaşık % 2.5 iken, bu oranın halk elindeki işletmelerde % 25 civarında olabileceği tahmin edilmektedir (21). Bu yüksek ölüm oranı temel alınıp, ülkemizde yaklaşık 5 milyon ineğe 5 milyon buzağı doğduğu kabul edilirse, yılda 1.25 milyon buzağının öldüğü ortaya çıkmaktadır. Bu kayıpların parasal değeri, 2016 yılı hesaplarına göre yaklaşık 1250.000.000 (bir milyar ikiyüz elli milyon) TL' na (bir buzağı asgari 1000 YTL kabul edildiğinde) tekabül eder. Bu miktara Veteriner Hekim giderleri ve tedavi masrafları da dahil edildiği takdirde ekonomik kayıp daha da yüksek olacaktır.

Buzağı ishallerinde enfeksiyöz kaynaklı ishallerin çok daha yaygın olduğu görülmektedir. Bu etkenler; bakteriyel, viral ve paraziter olarak ayrılırlar. Bakteriyel olanlar; E. coli, Salmonella, Camphylobakter, Clostridium, Chylamida, Viraller; Corona, Rota, BVD, Adenovirus, Bredavirus, Torovirus, Protozoal: Coccidia, cryptosporidia, giardia, Helmint: Neoscaris vitulorumdur (21-24).

Söz konusu etkenlerin buzağılarda ishal oluşturabilmesi için bir takım hazırlayıcı faktörlerin de rol aldığı görülmektedir. Predispoze edici bu faktörler; anaya, yavruya, beslenmeye ve çevreye ait faktörlerdir (24). Anaya ait faktörler: Gebelik süresince yetersiz bakım besleme, kuruda kalmanın yetersiz olması, ananın yeşil ot yememesi, gebelikte geçirilen metabolik ve enfeksiyöz hastalıklardır. Yavruya ait faktörler: yetersiz ısı regülasyonu, yetersiz immun system, elektrolit dengenin stabil olmayışı, embriyonik dönemde aşırı metabolizma artıklarının bulunması, pepsin, şimozin, safra ve HCl yetersizliğidir. Beslenmeye bağlı faktörler; zamanında ve yeterli kolostrum alınmaması, kolostrumda yeterli antikor düzeyinin olmaması, buzağıya çok süt verilmesi ve sütün soğuk olması, kolostral pasif bağışıklığın enfeksiyondan önce sağlanamaması daha çok ön plana çıkan faktörlerdir (25). Ayrıca çevresel faktörler içerisinde; ahır hijyeninin kötü olması, ahırda yaş gruplandırmasının yapılmaması, doğuma yakın ananın başka bir bölgeye nakli, yavrunun nakli, ahırların, havasız, nemli olması, güneş almaması, hava ceryanına maruz kalma olarak sıralanmaktadır (26, 27).

Neonatal buzağı ishallerinin genel klinik belirtisi; bol sulu, genellikle sarı renkte bir ishale yol açar. İshalle birlikte depresyon, halsizlik, hareket etmeye karşı isteksizlik, dehidrasyon ve iştahsızlığa yol açar. İshalin sonucunda buzağıda hipovolemi ve elektrolit imbalansı ile sonuçlanan şok belirtileri oluşur. Hafif vakalar birkaç gün

içinde kendiliğinden düzelebilir. Fakat şiddetli vakalar 8 saat gibi kısa bir süre içinde ölümle sonuçlanır. Farklı etiyolojik etkenler rol almasına rağmen, genel tedaviler aynı perspektif içerisinde uygulanır (28).

Buzağı ishallerinde spesifik sağaltım yöntemleri ve hedefleri ise şunlardır: kaybedilen suyu yerine koymak, elektrolit ve baz dengesizliklerini düzeltmek, enerji desteğini sağlamak, gıda desteği sağlamak, zarar gören bağırsak epitelinin onarılmasını kolaylaştırmak, proksimal ince bağırsakta E. coli konsantrasyonunu azaltmak, E. coli bakteriyemisini ortadan kaldırmaktır. Tedavide antibiyotik uygulamalarının sahadaki başarı oranlarını arttırdığı görülmektedir. Sulbaktam-ampisilin, trimetoprim-sülfam, gentamisin, kinolon grubu antibiyotikler faydalı olup yaygın kullanılmaktadır. Bununla birlikte Septisemik kolibasillosis vakalarında başarının sınırlı olduğu görülmektedir. Kemoterapide direnç oluşumuna dikkat edilmeli ve antibiyotikler bu açıdan kontrollü kullanılmalıdır (29-32).

Tedavi temel olarak anadan alınamayan pasif immünitinin sağlanması, bozulan sıvı-elektrolit dengenin, metabolik asidozisin, üremi ve hipogliseminin düzenlenmesi amaçlanır. İshal kesici uygulamalar ve barsak büzüştürücüleri olarak; kaolin, pektin, bizmut subsalisilat, difenoksilat hidroklorit, loperamid hidroklorid, NSAID, A ve D vitamin uygulamaları, Vit E ve Se uygulamaları yapılmalıdır. Buzağının süt içmeye devam etmesi zorunludur. Çünkü süt; vücut yağ depo yoğunluğunu ve duodenal mukozanın mitotik indeksini artırır. Daha fazla mukozal rejenerasyon ve daha az timus atrofisine neden olur. İshal olan buzağılarda immün sistemin desteklenmesi oluşturur. Bu nedenle bağışıklık mekanizmasının uyarılması, spesifik antikor temini, direnci arttırmak, antibiyotik etkinliğini arttırmak amacıyla; ana kanı nakli (150-300 ml İV), buzağı septisemi serumu, kolostrum serumları (50-150 ml SC), gamaglobulin solüsyonları ve plazma transfüzyonları (40 ml/kg İV) da uygulanabilmektedir (29-31). Ayrıca immünoterapi amacıyla immünostimülan ve immün sistemi destekleyen ajanlar (Levamisol, interferon, kolostrum, immün serumlar ve aşılarda kullanılmıştır (33-36). Fakat buzağı ishallerinde bakteri lizatlarını içeren nonspesifik uygulamalar hakkında herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Buzağı ishallerinde gerçekçi bir koruma her zaman mümkün değildir. Buzağılar tam bir hijyenik ve uygun yönetim pratiklerine tabi tutulmalıdır. Yeterli kolostrum almaları sağlanmalı, ana veya buzağının aşılama yapılmalıdır. İşletmelerde ayrı buzağı padokları ve ayrı buzağı bölümleri

kullanılmalıdır. Yetersiz işçiliğe bağlı kayıpların önüne geçebilmek için doğumlar zamana yayılmalıdır. Göbek bakımı gibi hijyenik tedbirler de doğru bir şekilde yapılmalıdır (37, 38).

2.2. Kolostrumun Buzağılar için Önemi

Yeni doğmuş buzağının özellikle infeksiyöz hastalıklara karşı savunma mekanizmaları tam olarak gelişmemiştir. Doğduklarında savunmasız olarak dünyaya gelirler. İneklerde plasental yapı syndesmochorial placentada yapısında olup antikorların da çok büyük olması nedeniyle anadan fötusa antikor geçişi mümkün olmaz. Bu nedenle buzağın doğduklarında Ig düzeyi yönünden yetersizdirler -neredeyse agamaglobulinemik doğarlar- ve yeterli miktarda kolostrum alana kadar hastalık etkenlerine karşı korumasızdırlar (5, 39). Buzağıya uygun zamanda, yeterli miktar ve nitelikte verilen kolostrum serum antikor konsantrasyonunu yükseltmekte, böylece bağışıklık sağlanabilmektedir (40). Yenidoğan buzağılara ilk 12 saatte canlı ağırlıklarının % 10'u kadar kolostrum verilmesi gerekmektedir (41). Yenidoğan buzağın, yeterli miktarda ve yüksek kalitede kolostrum alamadıkları (yetersiz Ig alımı, PTY) takdirde yüksek düzeyde neonatal kayıplar, yaşayanlarda ağırlık ve verim kaybı ile hastalıklara karşı duyarlılık görülmektedir. Kolostrum alımı gecikirse hipogamaglobulinemi oluşabilir. Kolostral Ig'lerin emiliminin olacağı dönemde barsak epiteline mikroorganizmalar yerleşebilir. Bu nedenle, hipogamaglobulinemik buzağılarda yüksek oranda gözlenen morbidite ve mortalite, pinositotik aktivite tamamlanmadan patojenlerin transepitelyal göçünün sonucu gelişebilir (42). Kolostrum, diğer sütlerle göre daha fazla kuru madde, yağ ve yağsız kuru madde, protein ve en önemlisi daha fazla immunoglobulin (Ig) konsantrasyonuna sahiptir. Kolostrum Ig konsantrasyonu üçüncü günden sonra en az düzeye inmektedir. Normal bir inek sütünde kuru madde oranı %12 civarında iken, bu oran kolostrumda %22-28 dolayındadır (43). Buna karşın laktoz oranı, normal süttekinden daha düşüktür. Kolostrumda bulunan Ig'ler ilk 24 saatte parçalanmadan emilip kana geçmektedir. Başlıca kolostral proteinler; immunoglobulinler, laktoferrin, transferrin, α -laktalbumin ve β -laktoglobulin, ve albümindir (44). Sığır kolostrumundaki immunoglobulin çoğunluğunu (% 85-90) IgG oluşturur. Sığır IgG'si iki alt sınıf arasında paylaşılır, IgG₁ ve IgG₂ (45). Baskın olan IgG sınıfı yapıcı ve tamir edici bir rol oynayan IgG₁ olup,

IgG₂ ise bu role sahip değildir. Immunoglobulin G₁ ana kanından kolostruma transfer edilir (46, 47). Ig'lerin kolostruma geçişleri doğumdan önceki 5. haftada başlar ve IgG₁ ve IgG₂ için sırasıyla doğumdan önceki 1. ve 3. günlerde en üst düzeyine ulaşır (67,69). Immunoglobulin G₁'in taşınması IgG₁ bağlayan meme lökositleri ve meme epitelyum hücrelerindeki reseptörlere bağlanması vasıtasıyla gerçekleştirilir (48).

Diğer kolostral immunoglobulinler ise IgM ve IgA dır. İmmunglobin M ve Ig A'nın toplam kolostral immunoglobulindeki oranı sırasıyla % 7 ve % 3'dür (45). Bunların büyük bir çoğunluğu meme bezlerindeki plazmositler tarafından bölgesel sentezleme ile üretilir (49). Miktarındaki fazlalığının bir sonucu olarak, IgM bakteriyel enfeksiyonlarda, tamamlayıcı, onarıcı ve opsonizasyonda etkilidir (50). IgM'nin konsantrasyonu serumda kolostrumdakinden daha yüksektir (51, 52). Ancak, fazla miktarından dolayı, IgM diğer immunoglobulin sınıflarından daha fazla damar içi kompartmanlarla sınırlıdır (53). Immunoglobulin A ne tamamlayıcı ne de iyileştirici role sahip değildir (54), ancak bakteri hücrelerinin epitel yüzeylere bağlanmasını engeller (55). Bazı faktörler de kolostral immunoglobulinlerin pasif transferini etkiler. Kolostral immunglobulin'in başarılı transferi için başlıca etkili olan faktörlerden birisi kolostral Ig konsantrasyonudur. Kolostral Ig'inin ilk sağılma (ağız sütü) miktarı inekten ineğe değişiklik gösterir (56). Buzağılar şişe veya biberonla beslendiklerinde toplam 100 g Ig verilmesi, kolostral immonuglobulinlerin yeterli pasif transferi için tavsiye edilmektedir (56-58). Buzağı tarafından sindirilen kolostrumun hacmi de kolostral Ig'lerin pasif transferini etkiler. Bu açıdan verilmesi önerilen hakim görüş genellikle 3 ile 4 L dir (56). Ancak, kolostromun uygun miktarıyla beslenilirse, immunoglobulin konsantrasyonu oluşturulan toplam Ig'nin tek belirleyicisidir ve yüksek serum IgG konsantrasyonu yüksek IgG kolostrumuyla alınarak başarılabılır (59). Kolostral immunoglobulinin absorpsiyonunun yeterliliği buzağının yaşındaki artışla azalır. Bir çalışmada, buzağının 6, 12, 24, 36 ve 48 saat yaşlarında beslendiği zaman, sindirilen kolostral immunoglobulinin sırasıyla % 65.8, % 49, % 11.5, % 6.7 ve % 6.0 oranlarında olduğu serumda belirlenmiştir (60). Hayatın ilk 24-36 saatinde küçük miktarlarda kandaki kolostral bileşenlerinin absorpsiyonu seçimli değildir ve pinositozis tarafından gerçekleştirilir (42). Kandaki kolostral bileşenlerinin transferinin, yaşın ilk 12. saatinden 24. saatine doğru hızla azalır (61). Besleme geciktirilirse, kolostral bileşenlerinin absorpsiyonu doğumdan sonraki 36. saate kadar

uzatılabilir (42) Farklı inek cinsleri farklı oranlarda immunoglobulin konsantrasyonu içeren ilk ağız sütü üretirler (62, 63). Jersey ve Aryshire cinsleri, Holstein ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak daha fazla kolostral IgG konsantrasyonuna sahiptir (62). Guernsey ırkında kolostral IgG konsantrasyonu Holstein ırkı ineklerle karşılaştırıldığı takdirde daha yüksek olduğu görülmektedir (63).

2.3. Kolostrum Kalitesini Etkileyen Faktörler

Laktasyonda bulunan ineklerden sağılan kolostrumların tümünün kalitesi aynı değildir. Bu nedenle çiftliklerde her doğumdan sonra elde edilen kolostrumların kalitesinin mutlaka her hayvan için ölçülmesi ve ancak iyi kaliteli kolostrum buzağılara verilmesi tavsiye edilmektedir. Doğum sonrası dönemde kolostrum kalitesinin erken dönemde belirlenmesi hastalıkların önlenmesi açısından önemlidir (64). Anaya, çevreye ve uygulamaya şekillerine bağlı olarak kolostrum kalitesini etkileyen bazı faktörler söz konusudur. Özellikle ırk, yaş, doğumdan önceki kolostrum sızıntısı, ilaç kullanımları, kuru dönem beslenmesi, güç doğumlar, kolostrumun veriliş zamanı ve miktarı bu faktörler arasında sayılabilir.

Bu tez projesinde, nonspesifik bir immunstimulan olan *Corynebacterium cutis* Lizatı'nın (CCL) damızlık düvelerde buzağı ishallerinin önlenmesi amacıyla kuru dönem sonunda yapılacak aşılama ile birlikte kullanıldığında immun sistem üzerindeki muhtemel faydalı etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Aşı uygulamalarının paralelinde yapılacak CCL enjeksiyonlarının analardaki aktif bağışıklığın geliştirilmesi üzerindeki etkinliğinin ortaya konulması planlanmaktadır. Bu sayede kolostruma daha fazla spesifik antikor geçişi mümkün olabilir. İmmunglobulin düzeyi arttırılmış kaliteli kolostrum alan buzağılara daha fazla oranda maternal antikor temini ile buzağının E. coli, rotavirus ve coronavirus enfeksiyonlarına karşı daha iyi korunması da mümkün olabilecektir. Mandalar üzerinde yürütülen bir çalışmada doğum öncesi uygulanan Vitamin E ve Selenyum enjeksiyonları ile birlikte CCL (40 mg/100 kg, DA) enjeksiyonlarının kontrollere göre uterus involüsyon sürelerini önemli ölçüde azalttığı, daha yüksek büyüme oranları ve daha iyi sağlık durumlarının olduğu, aynı zamanda kolostrum ve ananın immunoglobulin düzeylerinin immunstimulant verilenlerde daha yüksek düzeylerde olduğu belirlenmiştir (1).

Buzağı ishalleri çoğu zaman anaya bağlı, buzağıya bağlı ve çevresel faktörler nedeniyle ve başlıca pasif maternal yetmezliğe bağlı; bakteriyel, viral, paraziter gibi yapıcı etkenler sonucu ortaya çıkar. Yapılan başlıca antibiyotik ve sıvı tedavileri etkili olabildiği gibi çoğu zaman ishalin tekrar oluşması nedeniyle kayıplara da yol açar. Buzağı ishallerinin önlenmesi amacıyla verilecek kolostrumların kalitesi buzağı sağlığı açısından oldukça önemlidir. Kolostrum kalitesini etkileyen birçok faktör arasında ana yaşı ve ilk doğum önemli bir yer tutar. Düvelerdeki kolostrum kalitesinin ileri yaşlardaki sığırların kolostrumlarına göre daha düşük oranda antikör ve kuru madde içermesi nedeniyle, düvelerin ilk buzağılarının kolostrum yetersizliğine bağlı kaybı daha fazla olacaktır. Ayrıca bölgemizde doğumların çoğunlukla kış mevsiminde olması kolostrum kalitesini azaltan bir faktördür. İşte kış şartlarında doğum yapan düvelerin kolostrum kalitelerinin artırılması amacıyla spesifik olmayan bir immunstimulantın özellikle kolostrum IgG düzeylerine etkileri bu projeye ortaya konulmuştur.

2.4. Veteriner Hekimliğinde İmmunomodulasyon

Nonspesifik immün modülatörler son dönemde veteriner sahada daha çok enfeksiyöz hastalıklarla mücadelede asıl tedaviye ilave olarak verilmektedir. Bu ilaçlar immün sistemi uyarak tedavideki başarıyı arttırmak veya inaktif aşılardan etkisini güçlendirmek amacı ile kullanılmaktadır (65). Önemli özelliklerinden birisi de antijenik özgünlük olmadan immün sistemin bileşenlerini aktive etmeleridir (66). Türkiyede veteriner alanda *Cornynebacterium cutis lizati* (Virbac Animal Health, Fransa) (67) ve İnaktif *Parapoxvirus ovis* (Zoetis, ABD) (68-70) immün modülasyon amacı ile ticari preparatlar bulunmaktadır. *Parapoxvirus ovis* (orf virus, OV) küçük ruminantlarda burun ucu, dudaklar ve ayaklarda bazen de genital bölgelerde kabuklu papüller ile karakterize bulaşıcı ektima veya kontagiyöz püstular dermatitis hastalığının etkenidir (71). Primer enfeksiyona bağlı lezyonlar 6-8 hafta içinde düzelebilmektedir. Tekrarlayan enfeksiyona bağlı gelişen lezyonlar daha küçük ve hızlı iyileşme ile karakterizedir. Hastalık ayrıca zoonozdur (71, 72). Orf virüsünün özellikle attenué strain D1701 suşu farklı immün stimülatör özelliklere sahip olduğu ortaya konulmuştur (73-75).

Parapoxvirus'a karşı gelişen immün yanıtın anlaşılmasının diğer poxviruslar ile karşılaştırıldığında kendine özgü yönleri vardır. *Parapoxvirus ovis*'e karşı korunmada

antikorların rolü olsa bile çok sınırlıdır. Spesifik antikorlar in vitro ortamda *parapoxvirus ovis*'i tamamen nötralize etmekte yetersiz kalırken, İn vivo ortamda ise koruyucu etkinlikleri görülmemiştir. Hücrel immün yanıtın OV tarafından uyarıldığı doğal öldürücü hücreler (NK), fagositoz ve komplement aracılı lizisin OV tarafından aktifleştirildiğinin ortaya konulması ile gösterilmiştir (73, 76). Parapoxvirus ovis enfeksiyonlarından sonra koloni stimüle eden faktör (CSF), interferon (IFN), interlökin-2 (IL-2), tümör nekrozis faktör (TNF) gibi immün modölatör moleküllerinin indüklendiği de görülmüştür (77, 78).

Paramünite aktivatörü olarak lisans alan ilk ilaç, inaktif parapox virus D1701 suşu içeren preparattır (Baypamun® Bayer, Almanya) (74, 75, 79). Son yıllarda ise Zylexis (Zoetis, USA) ismi ile satışa sunulmaktadır (80). Yapılan çalışmalarda sözkonusu paramimmünite aktivatörlerinin sığır (68, 81) ve atlarda (82) solunum sistemi enfeksiyonlarına karşı yapılan tedavi ile birlikte ya da yalnız başına uygulandığında enfeksiyonun yayılımını durdurduğu ve tedavideki başarıyı arttırdığı belirtilmiştir. Baypamun'un koyunlarda çiçek hastalığı ile mücadelede terapötik ve koruyucu amaçlı kullanımında önemli başarılar elde edilmiştir (69). Köpeklerde meme tümörü operasyonlarından sonra yapılan İnaktif parapox virus D1701 suşu tedavisi (İPPVO) yeni tümörlerin gelişmesini ve tümörlerin yayılmasını önlemede etkili görülmüştür (83). Köpeklerde ise fagositik hücreleri aktive ederek *Listeria monocytogenes*'e karşı fagositoz oranını arttırmaktadır (84). Farelerde İPPVO uygulaması IFN- γ , IL-12 p40, IL-18 ve TNF- α genlerinin ekspresyon düzeylerini artırarak herpes simplex ve hepatit B virusuna karşı duyarlılığı azaltmıştır (85). Ayrıca in vitro ortamda insan periferik mononükleer immün hücrelerine yapılan bir çalışmada T hücreleri ve NK hücrelerinden proinflamator ve antiinflamator sitokin salınımı üzerine etkili olduğu dolayısı ile immunostimulan etkileri yanında inflamasyon ve immün cevap üzerinde regülatör olarak da etkili olduğu rapor edilmiştir. İnsanlarda ise antiviral tedaviye katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (86). Domuzlarda yapılan başka bir çalışmada spesifik antikor üretmemesine rağmen Aujeszky hastalığına karşı aşından bile daha koruyucu etkinliğinin olduğu bildirilmiştir (87). Domuzlarda BVD ile aynı genus ve ailede yer alan klasik Domuz Vebası hastalığına karşı yapılan aşılamalarda İPPVO kullanımı sonucunda yüksek antikor titresi elde edilmiştir. CD45RC+memory hücrelerinde, T_h ve T_c lenfositlerde yalnız aşı yapılan gruba göre aşı ve İPPVO yapılan grupta daha

yüksek oranlar tespit edilmiştir (88). Konuya ilişkin en önemli bilgi ise Büttner (89) tarafından yapılan çalışmada elde edilmiştir. Attenuated monovalent BVD aşısı ile birlikte ısı ile inaktive edilmiş *parapoxvirus ovis* uygulaması yapılan tavşanlarda ve buzağılarda yüksek titrede BVD antikoru gelişmiştir. Ayrıca sığırlarda aralıklı yapılan uygulamalarda lökopeni görülmemiştir. Aşı ve *parapox virus ovis* uygulaması yapılan farelerin yalancı kuduz hastalığına karşı korundukları da görülmüştür.

2.4.1. *Corynebacterium cutis* lizati

Corynebacterium cutis lizati da nonspesifik bir immünmodülatör olarak kullanım alanı bulmuştur (CCL-Ultra-corn/Virbac-Fransa) (90-92). Prospektüs bilgilerinde domuzlarda, sığırlarda ve kanatlı hayvanlarda immün sistemin nonspesifik uyarımı amacı ile kullanılması önerilmektedir. Büyük hayvanlara 4 ml/100 kg ve 200 kg dan daha ağır hayvanlar için 2ml/100 kg dozda kullanımı bildirilmiştir Ayrıca subakut enfeksiyonlarda 3 gün ara ile iki doz uygulaması tavsiye edilmektedir (93). *Corinebacterium cutis* lizati'nın etkinliği ile ilgili araştırmalar mevcut literatürde İPPVO'ya oranla çok daha sınırlıdır. Bununla ilgili ulaşılabilen ilk kaynaktan yenidoğan buzağılarda 2ml/100 kg CCL uygulamasının yaşama kalitelerini (kilo alımı, mortalite ve morbidite oranları üzerine) olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada CCL rinderpest aşısı ile birlikte uygulandığında adjuvan etki gösterdiği görülmüştür (94). CCL bivalent Şap aşısı ile birlikte uygulandığında aşının immünojenitesini arttırmıştır. Enfeksiyona maruz bırakılan sığırlarda morbidite oranının CCL+aşı uygulananlarda, sadece aşı uygulananlara oranla daha düşük şekillendiği bildirilmiştir (91). Gebe koyunlara gebeliğin 140. gününde tek doz olarak 2 ml CCL uygulaması anne, kolostrum ve postpartum dönemde yavrularda Ig G düzeylerini arttırmıştır (92). Ancak kolostrum kalitesini etkileyen yaş, laktasyon öncesi bakım ve besleme, ırk, genetik faktörler, doğum öncesi yaşanan hastalıklar, doğum sonrası enfeksiyon durumları gibi birçok faktör de hayvanlarda kolostrum kalitesini etkilemektedir (95). Bu çalışmada 2,5-5 yaş arası kıvrıcık melezi koyunlar kullanılmıştır. Ayrıca koyunların takibine gebeliklerinin son 6. haftasından itibaren başlanmıştır. Aynı çalışmada postpartum 1 aylık süreçte CCL uygulanan annelerden doğan yavrularda ölüm oranı kontrol grubuna göre daha az rapor edilmiştir (92). Bununla birlikte mandalar üzerinde yürütülen çalışmada doğumdan yaklaşık 60 gün önce immün aktivatör olarak CCL uygulaması ile kolostrum IgG düzeylerinin etkilenmediği, bununla birlikte yalnız

Vitamin E-Selenyum (Viteselen) uygulamasının daha yüksek oranda etkili olduğu gözlenmiştir (96). *Corynebacterium cutis* lizatu'nın koyunların savunma sistemi üzerine etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada *Corynebacterium cutis* lizatu (Ultra-corn® Inj. Susp.) subkutan yolla uygulanmıştır. Uygulama sonrası elde edilen serumlarda TNF α , IL-1 β , IL-6 ve IL-10 düzeyleri sırası ile 12, 4, 24 ve 12. saatlerde oldukça yüksek düzeylerde belirlenmiştir.. *Corynebacterium cutis* lizatu'nın immun stimulan etkisinin belirlenmesi için daha detaylı moleküler düzeyde araştırmalar yapılması gerektiği yine bu çalışma ile ifade edilmiştir (97) Yukarıdaki raporlara bakıldığında CCL'nin immün parametreler üzerine etkinliği ve etki mekanizması yeterince açık değildir. Ayrıca CCL'nin immün sistemi nasıl aktive ettiğine ilişkin bilgiler de yetersizdir (93). insan ve hayvan sağlığı için immunmodölatörlerin potansiyel kullanımları giderek yaygınlaşmaktadır. Bu yazarlar *corynebacterium cutis* lizatu gibi bir nonspesifik immünoestimülantın genellikle hayvanların immun sistemini kuvvetlendirdiği ve onları hastalıklara karşı daha dirençli bir hale getirdiğini belirtmektedirler. Çeşitli kullanımları arasında süt ineklerinde somatik hücre sayısının azaltılmasında da etkili olduğu belirlenmiştir (98).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu proje, bir saha çalışması olup oluşturulan deneme gruplarında kontrol grubuna karşı aşı ve aşı+immunstimulan uygulamasının kolostrum IgG düzeyleri üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi amacıyla planlandı. Proje Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSY-12- 4049 nolu proje ile desteklenmiştir. Çalışmalara başlanabilmesi için gerekli Etik Kurul Onayı Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 13.02.2013 tarih 13/34 karar no ile alınmıştır.

3.1. Kullanılan Denek Cinsi Sayısı ve Dağılımı

Bu proje Nevşehir ili Avanos ilçesinde 300 başlık damızlık Holstein ırkı sığırların bulunduğu özel bir işletmede 1 Kasım 2013 ve 30 Ocak 2014 tarihleri arasında yürütülmüştür. Pedigri cetvellerine göre doğum yapması beklenen düveler bu çalışmaya dahil edildiler. Deneme sürecinin daha sağlıklı yürütülebilmesi ve örneklerin en uygun şekilde toplanabilmesi için doğum zamanı aynı olan düveler eş zamanlı çalışılıp, her grupta gerekli sayıya ulaşıldığında grup denemeleri tamamlandı.

Projede herhangi bir sağlık sorunu bulunmayan ilk doğumlarını yapacak gebe düveler kullanılmıştır. Doğumu yaklaşan düvelerin bakımı ve beslemesi ile denemeler yine aynı işletmede gerçekleştirilmiştir. Denemede kullanılacak düvelerin ortalama

ağırlıkları Grup I'de 277.25 ± 15.50 kg, Grup II'de 283.25 ± 23.13 kg, Grup III'de 278.54 ± 18.65 idi. Ortalama yaşları; Grup I'de 28.75 ± 3.80 ay, Grup II'de 27.85 ± 2.47 ay, Grup III'de 26.6 ± 5.10 ay idi.

Tüm grupların ortalama vücut kondüsyon skorları 3 (üç) idi. Tüm hayvanların genel klinik muayeneleri yapıldı.

Gebe düvelerin beslenmesi; 19 ham proteinli kesif yem, yonca, saman, pancar küspesi, pamuk tohumu küspesi ve arpa ile yapıldı. Su ad libitum olarak verildi.

Toplamda 30 adet olan aynı özellikteki düveler üç gruba ayrılmış, gruplardan birine kontrol olarak serum fizyolojik (SF), diğer gruba üçlü inaktif E.coli, rotavirus ve coronavirus aşısı ve son gruba da E.coli, rotavirus ve coronavirus aşısı ile beraber CCL enjeksiyonları yapılmıştır. İlk doğumunu yapması beklenen, aynı şartlarda bakım ve beslemesi yapılan düvelerin oluşturduğu çalışma grupları oluşturuldu. Toplam 30 adet düve rastgele örnekleme yöntemi ile 3 gruba ayrıldı. Gruplardan birine prospektüsde belirtildiği gibi doğumlarına 6 hafta ve 3 hafta kala iki kez aşı (inaktif E. coli, rotavirus ve coronavirus) uygulandı. Son deneme grubuna ise aşı uygulamaları ile birlikte ve eş zamanlı toplam 2 uygulama şeklinde CCL enjeksiyonları yapıldı. Bu enjeksiyonların bağışıklıktaki etkinliği yalnız aşı yapılan diğer deneme grubu ve ne aşı ne de CCL enjeksiyonu yapılan kontrol grubu hayvanlarının verileri ile karşılaştırıldı.

Deneme grupları aşağıdaki gibi düzenlendi.

Grup I (n=10): Kontrol grubu: Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada aşı ve CCL preparatlarının uygulama hacimleri ile aynı oranda deri altı serum fizyolojik enjeksiyonları yapılanlar.

Grup II (n=10): Aşı grubu: Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada deri altı 2 ml aşı enjeksiyonları yapılanlar.

Grup III (n=10): İmmunstimülant+Aşı grubu: Aktif bağışıklık grubu: Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada deri altı 2 ml aşı enjeksiyonları yapıldı. Bu enjeksiyonlarla eş zamanlı 2 ml/100 kg dozunda deri altı CCL (Ultra-corn) tedavisi yapıldı.

3.2. Kan ve kolostrum örneklerin toplanması

Enjeksiyonlardan önce (6. Hafta) tüm düvelerin kuyruk venasından serum örnekleri için 10 ml EDTA'sız deney tüplerine kan örnekleri toplandı. Enjeksiyonların yapılması ile birlikte düzenli olarak grupların klinik muayeneleri yapıldı (T, P, R) ve enjeksiyonlara karşı oluşabilecek reaksiyonlar gözlemlendi. Daha sonra veriler kaydedildi. İkinci aşı enjeksiyonundan hemen önce (3. Hafta) serumda biyokimya ve IgG analizleri için kan örnekleri alındı. Daha sonra doğumla birlikte ana kanı ve kolostrum örnekleri son kez toplandı.

3.3. Hematolojik Analizler

EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden kan sayım cihazında hematolojik analizler yapıldı. Tüm örneklerde WBC, RBC, PCV, Hb, MCV, MCHC, MCH değerleri, total ve differansiyal lökosit, trombosit değerleri İç hastalıkları kliniğinde bulunan MINDRAY BC-2800 VET Hematoloji cihazında belirlendi.

3.4. Biyokimya Analizleri

Antikoagulant bulunmayan vakumlu tüplere alınan kan örnekleri pıhtılaştıktan sonra kenarından yöntemine uygun çizilerek 3000 rpm de 10 dak. santrifüj edildi ve serum örnekleri ayrıldı. Serumda glikoz, total protein, albümin analizleri, aspartat amino transferaz (AST), gama-glutamilttransferaz (GGT), laktat dehidrogenaz (LDH), kan üre nitrojen (BUN), kreatinin aktiviteleri ERÜ Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında bulunan tam otomatik otoanalizör sistemlerinde (Cobas c701) hizmet alımı ile analiz edildi.

3.5. Kolostrum Dansitesi Analizleri

Kolostrumun gama globulin içeriği ile kolostrumun yoğunluğu arasında önemli ($P<0.01$) ilişki vardır. Bu nedenle çalışmamızda, kolostrum kalitesi kolostrum yoğunluğu esas alınarak belirlendi. Bu amaçla, sahada kullanım için geliştirilmiş “kolostrometre” (Kruuse) adı verilen aletten yararlanıldı. Alet, kolostrumdaki Ig miktarı ile özgül ağırlık arasındaki ilgiyi esas almaktadır. Her inekten doğumu takiben elde edilen kolostrum ilk 2 saat içerisinde 200 ml'lik bir behere alınıp dijital bir termometre ile derecesi ölçüldükten sonra ve 35 °C olduğunda kolostrometre ile özgül ağırlığı ölçüldü.

Kolostrumun sınıflandırılmasında özgül ağırlıklar esas alınarak derecelendirildi. Buna göre özgül ağırlığı:

- > 1.045 g/ml olan kolostrum iyi kaliteli (+++, Yeşil Band),
- 1.035-1.045 g/ml olan kolostrum orta kaliteli (++ , Sarı Band)
- < 1.035 g/ml olan kolostrum ise düşük kaliteli (+, Kırmızı Band) olarak sınıflandırıldı (99, 100).

3.6. Serum ve Kolostrum Immunglobulin G Analizleri

Denemeye alınan düvelerden doğumlarını yaptıktan sonraki 2 saat içerisinde tüm kolostrum sağıldı ve kolostrum hafifçe karıştırıldı. Daha sonra buzağılara kolostrumlar yeterli miktarlarda verildi. Kolostrum örnekleri her düveden iki örnek olacak şekilde 25 ml'lik iki tüpe alındı. Örnekler laboratuara buz içerisinde taşındı. Laboratuvarda örneklerin santrifüj işlemlerine tabi tutulması (2000 rpm de 10 dak.) sonucu elde edilen kolostrum serumları -20 °C de analiz işlemlerine kadar saklandı.

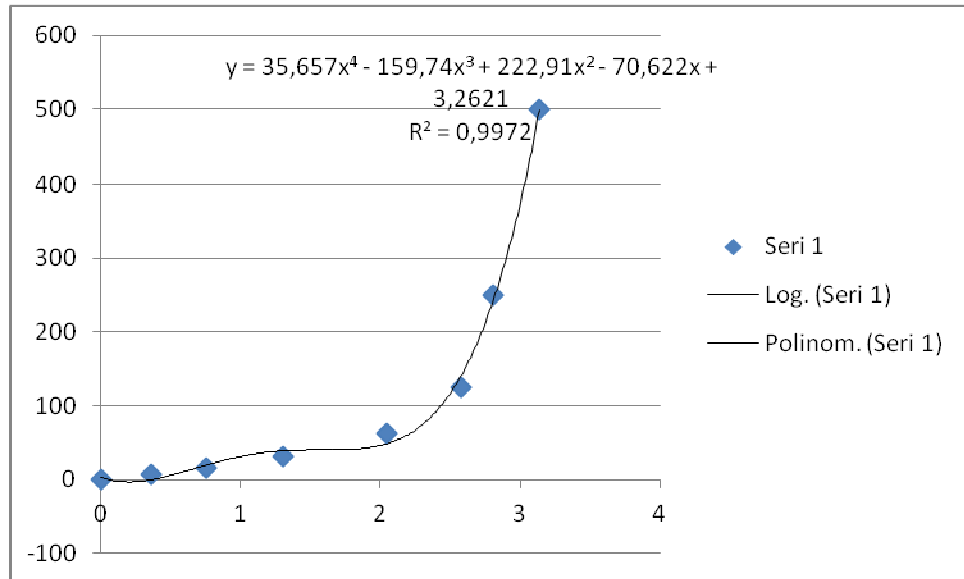
Kan örneklerinden ve kolostrumlardan elde edilen serumlarda IgG tayinleri bir ticari ELİSA kiti (Bovine IgG, Immunoperoxidase Assay for Determination of IgG in Bovine Samples, Catalog Number: MBS564150) ile analiz edildi. Kitin protokolünde belirtilen analiz metodu ile bir ELİSA cihazında (Promega-Glomag Multidetecion System E9032) IgG tayinleri yapıldı. Kolostrum IgG düzeylerinin ölçümleri de aynı potokole göre yapıldı (92, 99-101).

Hematolojik analizler örneklerin alındığı gün, biyokimyasal analizler ise derin dondurucuda -20 °C de dondurulan serum örneklerinde, kolostrum IgG analizleri ise kolostrum serum örnekleri analiz edilinceye kadar saklandı. Örnekler alındığı gün donduruldu ve daha sonraki iki gün içinde analizler yapıldı. Biyokimyasal analizler bir ay içerisinde tamamlandı.

3.7. ELİSA Analiz Protokolü

Öncelikle tüm örneklerin sulandırılmaları yapıldı. Tek adım değerlendirmelerde pek çok serum/plazma örneği için 1/400.000 oranındaki dilüsyonlar uygun bir orandır. Bu amaçla 2 µL örnek, 1.998 µL 1xsulandırma solüsyonuna ilave edildi. Bu 1/1000 lik bir sulandırma sağladı. Daha sonra bu sulandırmadan 2 µL alınarak 798 µL 1xsulandırma solüsyonuna ilave edildi. Böylece örneğimizin 1/400.000 oranındaki sulandırması

yapıldı. Her bir sulandırma adımında karıştırma işlemi uygulandı. Sulandırılmış örnekler hazırlandı. Bütün ayıraçlar kullanımdan önce oda ısısına getirildi. Tüm standart solüsyonlardan 100 µL pipete alındı. Önceden hazırlanan kuyucuklara 100 µL örnekler bırakıldı. Tüm standart ve örnekler dublike hazırlandı. Mikroplateler oda ısısında 30 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresi boyunca platein üzeri kapalı tutuldu. İnkübasyonu takiben kuyucukların içeriği aspire edildi ve her bir kuyucuk dilüe yıkama solüsyonu ile dolduruldu ve aspire edildi. Toplam dört kez bu işlem tekrarlandı. Kuyucuklara 100 µL dilüe enzim-antikor konjugatı ilave edildi. Oda ısısında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben tekrar kuyucukların içeriği aspire edildi ve herbir kuyucuk dilüe yıkama solüsyonu ile dolduruldu ve aspire edildi. Toplam dört kez bu işlem tekrarlandı. 100 µL TMB substrat solüsyonu konuldu. Oda ısısında karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 100 µL stop solüsyonu ilave edildi. Stop solüsyonu ilavesinden hemen sonra standartlar ve çalışma örnekleri ELİSA okuyucusunda 450 nm absorbansda okundu. Bilgisayar programı vasıtasıyla standart eğri elde edildi (Şekil 3.1.)



Şekil 3.1. ELİSA analizleri için elde edilmiş standart eğri

3.7. İstatistik Analizler

Elde edilen verilerin istatistiki analizleri SPSS 13.0 (2000) paket programı ile bilgisayar

ortamında yapılmıştır. Verilerin analizleri için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Deneme süresince alınan değerleri karşılaştırmak için Dunnett testi, farklı grupların eş zamanlı verilerini karşılaştırmak için Tukey testi uygulandı. Gruplar arası farklılığın ve zamana göre değişimlerin önem derecesi $p<0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Muayene Bulguları

Çalışma kapsamına alınan düvelerin düzenli sağlık kontrolleri yapılmış ve fizyolojik verileri alınmıştır. Düvelerin tamamının yapılan klinik muayenelerinde sağlıklı oldukları gözlemlenmiştir. Aşı uygulanan düvelerde ve aşı ile birlikte immun modülatör uygulanan hayvanlarda aşı uygulamasına ve immünmodülatör uygulamasına ait herhangi bir lokal ya da genel yan etki gözlenmemiştir.

4.2. Biyokimya Analiz Bulguları

Proje kapsamındaki üç çalışma grubundaki düvelerin preparturient dönem ve doğumda elde edilen serum örneklerinde ortalama glukoz, kan üre nitrojeni (BUN), kreatinin, gama glutamil transferaz (GGT), laktat dehidrogenaz (LDH), aspartat amino transferaz (AST), total protein (TP) ve albümin analizlerine ait bulgular Tablo 4.1’de verilmiştir

Tablo 4.1. Çalışma gruplarında preparturient ortalama Glukoz, BUN, Kreatinin, GGT, LDH, AST, Total Protein ve Albumin Düzeyleri değişimleri

Parametreler	Gruplar	Doğum Öncesi Haftalar		
		-6.	-3	Doğum
GLUKOZ mg/dl	Grup I	34.80±3.56	44.40±2.79	62.00±6.68
	Grup II	49.90±3.78	59.80±0.84	58.60±7.23
	Grup III	63.60±3.78	47.40±9.86	68.20±9.18
BUN mg/dl	Grup I	9.40±2.07	7.20±1.79	9.75±2.63
	Grup II	9.00±1.66	8.20±3.11	8.80±1.64
	Grup III	8.60±1.34	7.80±0.84	9.40±1.14
KREATİNİN mg/dl	Grup I	1.25±0.16	0.96±0.11	0.86±0.12
	Grup II	1.16±0.09	1.21±0.22	0.83±0.11
	Grup III	1.01±0.06	0.84±0.09	0.86±0.06
GGT mg/dl	Grup I	20.80±5.54	19.00±4.24	29.75±1.89
	Grup II	17.20±1.48	17.60±2.97	19.80±6.18
	Grup III	15.00±2.45	13.60±2.97	17.60±4.16
LDH IU/L	Grup I	887.00±150.80	792.20±57.07	781.75±46.71
	Grup II	875.20±83.70	790.00±77.36	857.00±86.13
	Grup III	873.20±53.81	1032.80±220.27	917.40±101.02
AST IU/L	Grup I	72.60±4.10	69.80±6.26	75.00±6.00
	Grup II	73.30±5.76	73.80±8.84	85.20±18.70
	Grup III	69.80±11.21	74.20±12.38	73.00±12.02
TOTAL PROTEİN mg/dl	Grup I	7.07±0.32	6.64±0.37	6.16±0.34
	Grup II	7.04±0.34	6.37±0.50	7.38±0.94
	Grup III	7.11±0.58	7.12±0.53	7.29±0.42
ALBÜMİN mg/dl	Grup I	3.51±0.35	3.42±0.29	3.19±0.19
	Grup II	3.46±0.24	3.39±0.17	3.49±0.26
	Grup	3.46±0.14	3.25±0.16	3.40±0.32

	III		
--	-----	--	--

Grup I (n=10): Kontrol grubu: Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada aşı ve CCL preparatlarının uygulama hacimleri ile aynı oranda deri altı serum fizyolojik enjeksiyonları yapılan grup. **Grup II (n=10): Aşı grubu:** Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada deri altı aşı enjeksiyonları yapılan grup. **Grup III (n=10): İmmunstimülant+Aşı grubu:** Aktif bağışıklık grubu: Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada deri altı aşı enjeksiyonları yapılan grup. BUN: Kan üre nitrojen, GGT: Gama glutamil transferaz, LDH: Laktat dehidrogenaz, AST: Aspartat amino transferaz.

Çalışmada tüm gruplardan elde edilen ortalama Glukoz, BUN, Kreatinin, GGT, LDH, AST, Total Protein ve Albumin düzeylerinde bazı sayısal değişimler görülmekle birlikte bu değişimlerin sınırlar için bildirilen normal referans aralıklarında olduğu ve istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde farklı olmadığı görülmüştür. Tüm elde edilen verilerin normal düzeylerde olduğu değerlendirilmiştir (Tablo 4.1).

4.3. Hematolojik Analiz Bulguları

Tablo 4.2. Gruplardaki ortalama total lökosit, lenfosit, monosit ve granülosit değerlerinin doğum öncesi değişimleri

Parametreler	Gruplar	Doğum Öncesi Haftalar		
		-6. X ± Ss	-3. X ± Ss	Doğum X ± Ss
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Grup I	8.26 $\pm$ 3.5 2 b	7.6 $\pm$ 0.89 b	6.16 $\pm$ 0.9 2 a*
	Grup II	9.06 $\pm$ 1.1 1 b	8.16 $\pm$ 0.8 7 b	5.72 $\pm$ 0.9 0 a *
	Grup III	8.52 $\pm$ 1.8 9	8.10 $\pm$ 1.8 0	7.17 $\pm$ 2.0 9
Lenfosit ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Grup I	2.64 $\pm$ 1.4 9	2.00 $\pm$ 0.3 5	2.08 $\pm$ 0.3 9
	Grup II	1.92 $\pm$ 0.3 3	2.9 $\pm$ 1.17	2.34 $\pm$ 0.6 7
	Grup III	4.06 $\pm$ 1.1 3 b	6.10 $\pm$ 1.7 9 a	6.22 $\pm$ 2.6 1 a *
Monosit ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Grup I	0.96 $\pm$ 0.23	0.90 $\pm$ 0.10	0.76 $\pm$ 0.25
	Grup II	1.17 $\pm$ 0.22	1.06 $\pm$ 0.11	0.40 $\pm$ 0.14
	Grup III	1.06 $\pm$ 0.27	1.11 $\pm$ 0.99	1.16 $\pm$ 1.16

Granülosit ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Grup I	4.66 $\pm$ 2.32	4.70 $\pm$ 2.12	3.32 $\pm$ 1.06
	Grup II	5.56 $\pm$ 0.94	4.34 $\pm$ 1.15	2.98 $\pm$ 0.61
	Grup III	3.40 $\pm$ 1.40	4.51 $\pm$ 1.54	5.84 $\pm$ 5.04

Grup I (n=10): Kontrol grubu: Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada aşı ve CCL preparatlarının uygulama hacimleri ile aynı oranda deri altı serum fizyolojik enjeksiyonları yapılan grup. **Grup II (n=10): Aşı grubu:** Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada deri altı aşı enjeksiyonları yapılan grup. **Grup III (n=10): İmmünstimülant+Aşı grubu:** Aktif bağışıklık grubu: Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada deri altı aşı enjeksiyonları yapılan grup. WBC: Total lökosit. Aynı satırdaki * işareti zamana bağlı farklılıkların önem derecesini göstermektedir. *: $p<0.01$.

Çalışmadan elde edilen serum örneklerinde ortalama total lökosit (WBC), lenfosit, monosit, granülosit düzeylerindeki değişimler Tablo 4.2’de verilmiştir

Çalışmada tüm gruplarda ortalama WBC değerlerinde doğuma kadar zamana bağlı sayısal tedrici azalmalar gözlemlendi. Grup I ve Grup II de doğumda elde edilen değerlerin 6. haftada alınan değerlerden daha istatistiksel açıdan anlamlı oranda daha düşük olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). Gruplar arasında tüm zamanlarda herhangi bir fark gözlemlenmedi.

Lenfosit değerlerinde grup I ve II de zamana bağlı herhangi bir değişim gözlemlenmedi, bununla birlikte grup III de zamana bağlı sayısal bir tedrici artış vardı. Lenfosit değerleri açısından da gruplar arasında tüm zamanlarda anlamlı farklılıklar görülmedi.

Ortalama monosit ve granülosit değerlerinde de tüm zamanlarda gerek grup içi gerekse gruplar arasında istatistiksel açıdan herhangi bir anlamlı değişim gözlemlenmedi (Tablo 4.2).

4.3. Kan serumunda İmmünglobulin G Analiz Bulguları

Periferal kan serumlarından elde edilen tüm gruplara ait grup içi ve gruplar arası IgG düzeyleri Tablo 4.3’de verilmiştir. Bazı ortalama değerlerde istatistiksel açıdan önemli değişiklikler gözlemlenmiştir. Söz konusu değişimler özellikle grup II ve grup III’den elde edilen ortalama konsantrasyonlarda görülmüştür. Buna göre yalnız aşı uygulanan ve aşı ile birlikte CCL uygulanan düvelerde doğuma doğru tedrici olarak istatistiksel açıdan önemli oranda serum IgG düzeyleri yükselme ile seyretmiştir. Bu artışlar doğuma 6 hafta kala alınan ilk değerlerden istatistiksel açıdan önemli oranda ($p<0.01$) daha yüksekti ve doğumda alınan ortalama değerler ise istatistiksel açıdan önceki değerlerden daha önemli oranda yüksek olduğu görüldü ($p<0.001$). Gruplar arası

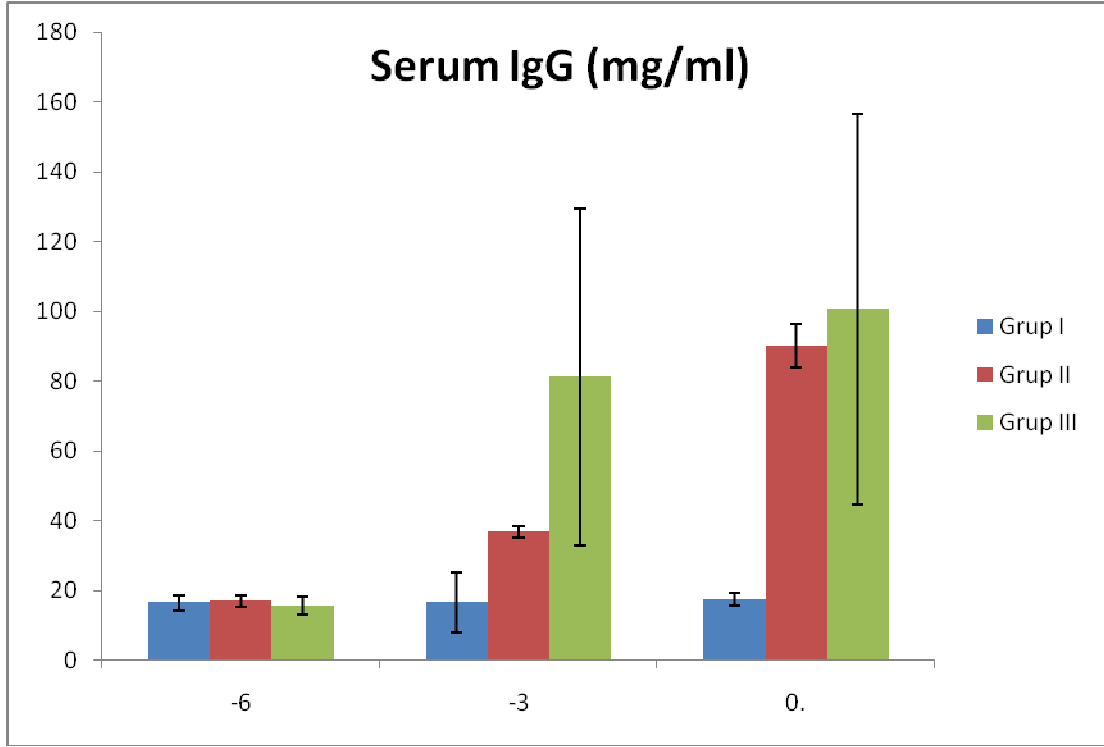
değişimlerin incelenmesi sonucunda, yalnız aşı uygulananların 3. ve 0. saat ortalama IgG düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel açıdan önemli oranda yüksekti. Bununla birlikte aşı ve CCL uygulanan grupta hem kontrol hem de yalnız aşı uygulananlara göre aynı zamanlardaki ortalama değerlerin istatistiksel açıdan önemli oranda ($p<0.01$) daha yüksek olduğu belirlendi.

Tablo 4.3. Doğum öncesi ortalama serum immünoglobulin G değişimleri

Parametreler	Gruplar	Doğum Öncesi Haftalar		
		-6. X ± Ss	-3. X ± Ss	Doğum X ± Ss
Serum IgG Düzeyi (mg/ml)	Grup I	16.37±2.2 6	16.40±8.68 a	17.35±1.93 a
	Grup II	16.85±1.7 5	36.69±1.70 b*	90.01±6.34 b**
	Grup III	15.54±2.4 8	81.06±48.2 7 c**	100.59±56.0 5 c**

Aynı sütundaki farklı harfler her bir parametre için gruplar arası farkı göstermektedir. Aynı satırdaki * işareti zamana bağlı farklılıkların önem derecesini göstermektedir. *:0.01, ** 0.001. **Grup I (n=10): Kontrol grubu:** Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada aşı ve CCL preparatlarının uygulama hacimleri ile aynı oranda deri altı serum fizyolojik enjeksiyonları yapılan grup. **Grup II (n=10): Aşı grubu:** Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada deri altı aşı enjeksiyonları yapılan grup **Grup III (n=10): İmmunstimülan+Aşı grubu:** Aktif bağışıklık grubu: Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada deri altı aşı enjeksiyonları yapılan grup.

Grumlardan elde edilen kolostrometre analizlerinde ise elde edilen ortalama kolostrom kalitesi değerlerinin Grup I ve Grup II de + düzeyinde ve Grup III de ise ++ düzeyinde olduğu değerlendirildi.



Şekil 4.1. Çalışma gruplarında periferal kan serumunda IgG düzeylerinin grafik ile gösterimi

Grup I (n=10): Kontrol grubu: Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada aşı ve CCL preparatlarının uygulama hacimleri ile aynı oranda deri altı serum fizyolojik enjeksiyonları yapılan grup. **Grup II (n=10): Aşı grubu:** Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada deri altı aşı enjeksiyonları yapılan grup **Grup III (n=10): İmmünstimülant+Aşı grubu:** Aktif bağışıklık grubu: Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada deri altı aşı enjeksiyonları yapılan grup.

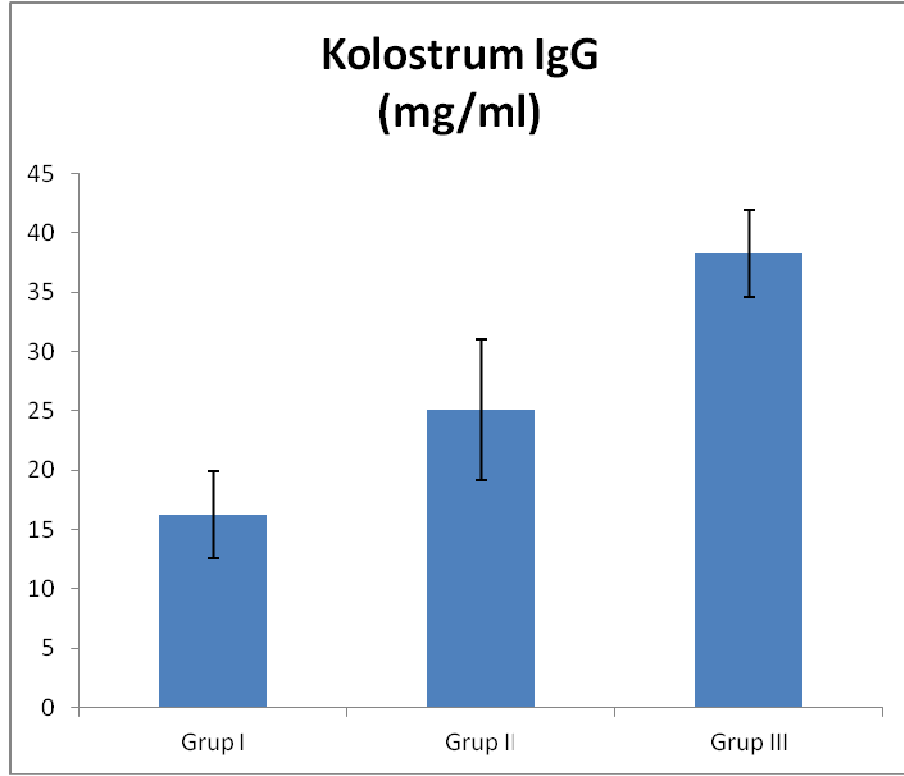
4.4. Kolostrum örneklerinde İmmünglobulin G Analiz Bulguları

Kolostrumların serum örneklerinden elde edilen ortalama IgG düzeyleri Tablo 4.4’de verilmiştir. Bulgular gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli farklar olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte grup I’de elde edilen kolostrum düzeyinin tüm gruplarda doğuma 6 hafta kala ilk alınan kan serumu örneklerinde (Tablo 4.3) ortalama IgG değerleri ile benzer olduğu görülmüştür. Kolostrum örnekleri IgG düzeyleri aşı uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli oranda daha yüksek, aşı ile birlikte CCL uygulananlarda ise her iki gruptan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Kolostrum IgG düzeyleri ve gruplar arası istatistiki önem düzeyleri tablo 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4.4. Kolostrum immünoglobulin G değişimleri ve gruplar arası istatistiki farkın önem dereceleri.

Par am etre	Grup I X ± Ss	Grup II X ± Ss	Grup III X ± Ss
Kol ostr um IgG Dü zey i (mg /ml)	16.23±3.72	25.09±5.98	38.25±3.66
Gru plar ara sı p değ erle ri	Grup I-II: 0.0148	Grup II-III: 0.0023	Grup I-III 0.000008

Grup I (n=10): Kontrol grubu: Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada aşı ve CCL preparatlarının uygulama hacimleri ile aynı oranda deri altı serum fizyolojik enjeksiyonları yapılan grup. **Grup II (n=10): Aşı grubu:** Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada deri altı aşı enjeksiyonları yapılan grup **Grup III (n=10): İmmunstimülant+Aşı grubu:** Aktif bağışıklık grubu: Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada deri altı aşı enjeksiyonları yapılan grup.



Şekil 4.2. Çalışma gruplarında kolostrum IgG düzeylerinin grafik ile gösterimi

Grup I (n=10): Kontrol grubu: Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada aşı ve CCL preparatlarının uygulama hacimleri ile aynı oranda deri altı serum fizyolojik enjeksiyonları yapılan grup. **Grup II (n=10): Aşı grubu:** Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada deri altı aşı enjeksiyonları yapılan grup. **Grup III (n=10): İmmunstimülant+Aşı grubu:** Aktif bağışıklık grubu: Doğumdan önceki 6. haftada ve 3. haftada deri altı aşı enjeksiyonları yapılan grup.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışma kapsamına alınan düvelerde çalışma süresince herhangi bir sağlık problemine rastlanmamıştır. Bu süre içerisinde düzenli sağlık kontrolleri yapılan düvelerin hematolojik analizlerinde ve biyokimyasal bulgularında önemli değişimler gözlenmemiştir. Mevcut değişimler ise düvelerde normal kabul edilen hematolojik (102) ve biyokimyasal (103) aralıklar içerisinde kabul edilebilir oranlarda olduğu belirlenmiştir (Tablo 4,1; 4,2). Çalışma süresince örnek alma zamanlarında belirlenen fizyolojik parametrelerin de sığırlar için belirtilen normal aralıklarda olduğu da gözlenmiştir (104).

Bu çalışmada üç farklı hastalık ajanına ait antijenleri içeren aşının kullanılması sonucunda herhangi bir yan etki gözlenmemiştir. Bunun temel sebebinin kullanılan antijenlerin inaktif ve taşıt maddesinin de saponin olmasına dayandırılmaktadır. Yenidoğan ishallerinin korunmasında gebe ineklere uygulanan ve ticari Kolinbin RC Neo (İnterhas-Türkiye) aşısının, gebe ineklerde güvenli bir şekilde kullanılabileceği görülmüştür. Aynı şekilde CCL içeren ticari Ultra-corn (Virbac, Fransa) isimli nonspesifik immunmodulatorün de aşıyla birlikte hayvanların sağlığını olumsuz yönde etkilemediği herhangi bir abort olayına dahi neden olmadan güvenli biçimde kullanılabileceği de ortaya konulmuştur.

Bu çalışmada ile elde edilen en önemli bulgular serum ve kolostrumda belirlenen IgG düzeylerinde gerçekleşmiştir.

Yeni doğan buzağılarda ishal ve buna bağlı bozukluklar en önemli buzağı kaybı nedenleri arasında yer alır. Çoğu zaman gerek ağır seyreden vakalar, gerekse geciken

tedavi uygulamaları nedeniyle ülkemizdeki damızlık işletmeleri için önemli oranda ekonomik kayıp nedenidir. Saha şartlarında çoğu zaman yapılan yanlış ve gereksiz tedavi uygulamaları maliyetlerin artmasına ve ölümlere yol açar. Bu nedenle buzağı ishalleri henüz oluşmadan gerekli koruyucu uygulamaların alınması önemlidir. Alınması gereken tedbirler gebelik döneminde başlar. Ananın mutlaka sağlıklı bir gebelik dönemi geçirmesi, uygun besleme programları ve kuru dönem uygulamalarının gerçekleştirilmesi zorunludur. Son yıllarda kuru dönem aşılama ile özellikle buzağı ishallerinin oluşumunda rol alan başlıca etkenlerden *E. coli*, Rotavirus ve Coronavirus'lara bağlı ishallerle karşı anada aktif bağışıklığın sağlanması ile kolostral spesifik Ig'lerin buzağı tarafından alınması sayesinde buzağılarda pasif immünitinin oluşturulması amaçlanmaktadır.

Kolostral immunglobulinlerin miktarının artırılması buzağılarda daha fazla oranda antikor titresi temini ve daha kuvvetli bir bağışıklığın sağlanmasına neden olacaktır. Bu nedenle, söz konusu projede buzağılarda yaygın oranda ishal tablosu ile seyreden ve etiyolojik olarak çoğunlukla *E. Coli*, Rotavirus, Corona virüs antijenlerini içeren ticari bir aşı ile birlikte nonspesifik immun stimülan etkili *Corynebacterium cutis* Lizatı'nın (CCL) birlikte kullanılması ile aktif bağışıklığın kuvvetlendirilmesi ve bu sayede kolostruma daha fazla IgG geçişi sağlanmıştır.

Ayrıca bu uygulama ile oluşması muhtemel kolostrum kalitesindeki değişiklikler de araştırılmıştır. Aşılamalara paralel belli sürelerle ticari Ultra-corn uygulamasının araştırılması bu projenin temel konusunu oluşturmuştur. Yapılan literatür taramalarında bir aşıyla birlikte CCL'nin etkinliğini belirleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle immünoterapi amacıyla temel aşı uygulamaları ile birlikte kullanımının bağışıklık üzerine yapacağı katkılar önemli görülmektedir.

CCL'nin sığır vebasası aşısı ile birlikte kullanımında adjuvan etki gösterdiği ortaya konulmuştur (94). Ayrıca bivalent Şap aşısı ile birlikte uygulanmasında ise aşının immünojenitesini arttırmaktadır. Enfekte sığırlarda morbiditenin CCL+aşı uygulaması ile önemli oranda düştüğü bildirilmiştir (91). Fakat nonspesifik bir immunstimülan olan *Corynebacterium cutis* Lizatı'nın (CCL) damızlık düvelerde buzağı ishallerinin önlenmesi amacıyla kuru dönem sonunda yapılacak rotavirus, coronavirus ve *E. coli* içeren inaktif bir aşı ile birlikte kullanımı daha önce literatürde yer almamaktadır. Bu nedenle mevcut proje bu konudaki çalışmalar arasında ilk olma özelliğindedir.

Önceki araştırmalarda; daha yaşlı ineklerin kolostrumları ile karşılaştırıldığında, ilk doğumunu yapacak düvelerin kolostrumlarında düşük IgG düzeylerine sahip olduğu belirtilmektedir. Fakat bazı raporlarda ise bu bilgilerin 20 yıl öncesine dayanan küçük örneklerin kullanıldığı ve tek bir çiftlikte yapılan sürü sağlığı, kuru dönem besleme ve aşılama protokollerinin çok az tanımlandığı çalışmalar olduğu rapor edilmiştir. (62, 63, 105)

Muller and Ellinger (62) bir üniversite çiftliğinde 19 Holstein inek üzerinde yürüttükleri bir çalışmada ilk doğumda elde edilen kolostrum IgG düzeylerinin (26.4 mg/mL) ikinci (55.2 mg/ml), üçüncü (76.9 mg/ml) ve dördüncü (69.0 mg/ml) doğumlarda elde edilen IgG düzeyleri ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Fakat, araştırmacılar örnek sayılarının yetersiz olduğunu, ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu da belirtmişlerdir. Oyeniyi and Hunter (106) ise 4. (41.6 mg/ml) laktasyondaki Ig düzeylerinin 7. (31.4 mg/mL) laktasyona göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Tyler et al. (63) 77 Holstein inekten topladıkları örneklerde 3. ve daha ileri laktasyonlarda ise daha fazla Ig konsantrasyonu olduğunu fakat ilk ve ikinci laktasyon arasında fark olmadığını belirlemişlerdir (sırasıyla 66 and 75 mg/mL). Diğer bir çalışmada ise 87 örnekte birinci ve ikinci laktasyonlarda 4. ve daha ileri laktasyonlara göre belirgin oranda daha az IgG konsantrasyonları belirlenmiştir (107). Binonyedi adet Norveç Kırmızı ineklerinde ise, Gulliksen et al. (108), ilk ve ikinci laktasyona giren ineklerin 4. ve daha ileri laktasyonlara göre daha az IgG ürettiğini belirlemişlerdir. Kehoe ve Heinrichs. (44) de yukarıdaki çalışmalara benzer olarak ilk laktasyondan sonraki laktasyonlarda kolostrum IgG seviyelerinin giderek arttığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca bu çalışmada belirlenen bir diğer husus da kolostrum miktarının yüksek olmasının Ig düzeylerini azaltabileceğidir. Fakat çalışmanın tüm laktasyon gruplarında kolostrum hacimlerinin aynı olması ve Ig düzeylerinin de değişken olması nedeniyle tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu nedenle; mutlaka bütün kolostrumlar laktasyon sayısı veya ilk sağımdaki hacim dikkate alınmaksızın kalite yönünden IgG düzeyleri yönünde kontrol edilmelidir. Bu çalışmada tüm düvelerden elde edilen kolostrumların IgG düzeyleri kolostrometre ile belirlenen kalite yönünden uyumlu bulunmuştur. Bu nedenle mutlaka kolostrometre ile saha şartlarında kolostrum kalite tayinlerinin yapılması ve bu şekilde buzağların beslenmesi uygun olacaktır.

Yukarıdaki çalışmalar hep birlikte değerlendirilecek olursa, ilk laktasyondaki düvelerin sonraki laktasyonlara göre daha az oranda IgG ihtiva ettiği görülecektir. Ülkemiz inekleri üzerinde fazla sayıda örneğin kullanıldığı kontrollü çalışmalar belirlenmemiştir. Ancak yetiştirme şekilleri incelendiğinde ve çoğunlukla damızlık işletmelerde Holstein ineklerin kullanıldığı da düşünülecek olursa yukarıdaki yargının Türkiye’deki inekler içinde kuvvetli oranda geçerli olması beklenir. Bu çalışmada tek doğum yapan ineklerle çoklu doğum yapanların kolostrumları karşılaştırılmamıştır. Bu ayrı bir çalışmanın konusu olabilir. Bu çalışmanın ileri sürülen hipotezinde ilk laktasyonda düşük oranda IgG üreteceği düşünülen düvelerde aşı uygulamasına paralel CCL enjeksiyonlarının uygulanmayanlara oranla daha yüksek oranda kolostral IgG’ye sahip olabileceği ileri sürülmüştür. Bu nedenle çalışma planlanmıştır. Çalışmanın yürütüldüğü çiftlikteki her üç gruptaki elde edilen kolostral IgG düzeylerinin kolostrum için belirtilen eşik değerin (50 mg/ml) altında olduğu da görülmektedir (99, 100). Tüm gruplarda yapılan kolostral dansite analizleri de IgG konsantrasyonları ile uyumlu olduğu görülmüş ve kolostrumların yeterli kalitede olmadığı gözlenmiştir. Kolostrum kalitesinin bu çiftlikte düşük olmasının nedenleri; buzağların doğum sezonunun soğuk bir dönemde olması, anaların yaşı veya ilk gebeliklerinin olması, bakım ve yönetimle ilgili yeterli tedbirlerin bu çiftlikte uygulanmaması olarak sayılabilir.

Güngör ve Baştan (109) tarafından yapılan bir çalışmada Burdur ilinde en az bir kez doğum yapmış ve klinik olarak sağlıklı, gebeliğinin son 2 ayındaki 40 adet Holstein inek ve bunlara ait 40 baş buzağı kullanılmıştır. Bu çalışmada son aylarda gebe ineklere uygulanan aşılardan kolostrum ve buzağı IgG düzeylerine etkileri araştırılmıştır. Çalışma grubundaki 20 hayvana inaktif Rota ve Coronavirus antijenleri ile E. coli bakteri toksoidini içeren bir ticari aşı 2 hafta arayla 2 kez uygulanmıştır. Yeni doğan buzağların uygun oranlarda kolostrum alması sağlanmıştır. Kontrol ve çalışma grubundaki ineklerin ortalama kolostrum IgG düzeyleri sırasıyla 3542 ± 1368 mg/dl ve $5500 \pm 1204,3$ mg/dl idi ($p < 0.0001$). Araştırma sonuçlarına göre, gebeliğin son döneminde yapılan aşı uygulamalarının kolostrum IgG seviyesini artırdığı görülmüştür. Bu çalışmadaki kolostrum düzeyleri ile mevcut çalışmanın kolostrum düzeyleri karşılaştırıldığında IgG düzeylerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Bu farklılığın temel nedenleri farklı illerde yürütülen bir çalışma olması, kuru dönem rasyon farklılıklarının ayırt edilememesi ve önceki çalışmada kullanılan ineklerin en az

ikinci laktasyonda inekler olması nedeniyledir. Zira rasyon ve laktasyon sayılarının kolostrum IgG düzeylerini etkileyeceği açıktır. Bununla birlikte görüleceği gibi bu çalışmanın bulguları bizim yürüttüğümüz çalışmanın 2. grubunda yalnız aşı uygulanan hayvanlarda aşı uygulanmayanlara göre daha yüksek kolostrum IgG düzeylerinin elde edilmesi nedeniyle en azından bu açıdan çalışmalar birbirini destekler niteliktedir. Immunglobulin G'nin pasif transferinin başarıyla sağlanabilmesi için buzağların ilk olarak mutlaka kolostrumda yeterli miktarda bulunan Ig'leri tüketmesi gerekir. Daha sonra bu moleküllerin başarıyla barsaklardan emilip dolaşım sistemine karışması gerekmektedir. Kolostrum, geniş spektrumlu immun savunma mekanizmalarını içeren besin değeri yüksek bir gıdadır. Kolostrumdaki Ig'lerin % 85'inden fazlası IgG'dir. Aynı zamanda kolostrum kalitesinin değerlendirilmesi için de önemli bir parametredir. Yüksek kaliteli kolostrum serumları 50 mg/ml'nin üzerinde IgG ihtiva eder (58). Bununla birlikte inekler arasında kolostrum IgG düzeyleri oldukça değişkenlik gösterir. Bir çalışmada ortalama IgG 76 g/L olmakla birlikte bireysel Holstein ineklerde 9 ile 186 g/L arasındaki değerler belirlenmiştir Bu tez projesinde elde edilen kolostrum düzeyleri rapor edilen ortalamanın altında olmakla birlikte belirtilen aralığın içerisinde (110).

Kolostrum kalitesini etkileyen başlıca faktörler; ırk, ananın yaşı, üreticilerin bilgi ve becerileridir. Bunun yanında uygulayıcılar ve üreticiler tarafından yönetilebilen diğer önemli faktörler ise; preparturient dönem aşılama, kuru dönemin uzunluğu, kolostrum toplama zamanı ve verilme şekilleridir (40). Karşılaştırmalı çalışmalarda ırk faktörü incelendiği zaman kolostrum kalitesinin etkilendiği görülmüştür (62). Bir çalışmada IgG₁ konsantrasyonu besi sığırlarından elde edilen kolostrum sekresyonlarında (113.4 g/L) sütçü ineklerdekinden daha fazla (42.7 g/L) idi (111).

Bir diğer çalışmada ise Holsteinlar total Ig içeriği % 5.6 olan kolostrumlar üretirken, Guernsey'lerde bu oran (% 6.3), Brown Swiss'lerde (% 6.6) ile sayısal açıdan daha yüksek bulundu. Fakat kolostrum kalitesi açısından Holsteinlar'ın, Ayrshire (% 8.1) ve Jersey (% 9.0) ırkı ineklerden istatistiksel açıdan anlamlı oranda daha düşük olduğu belirlendi (62). Bu farklılığın genetik farklılıklardan ve/veya dilüsyonal etkilerden olabileceği bildirilmiştir (40). Bu çalışmada kullanılan Holstein düvelerde farklı bir ırkla kıyaslama yapılmakla birlikte bu çalışmadan elde edilen düşük kolostrum IgG değerlerinin sebeplerinden birisi de ırka bağlı genetik yatkınlık olabilir.

Kolostrum kalitesi üzerinde ananın yaşı da önemlidir, fakat her şey değildir. Çalışmalar daha yaşlı ineklerin daha kaliteli kolostrum üreteceğini rapor etmiştir. Muhtemel sebebin ise uzun hayat süreci boyunca çiftliğe özgü patojenlere maruz kalınması olduğu belirtilmiştir. Holsteinlerde yaş arttıkça daha fazla IgG konsantrasyonu elde edilirken, Guernsey’lerde ilk, ikinci ve üçüncü laktasyonlarda bir farklılık gözlenmemiştir (62, 63, 105, 106).

Doğum öncesi maternal besleme ile ilgili çalışmalarda genellikle kolostrum IgG içeriğinin beslemeden etkilenmeyeceği gözlenmiştir (112). Bir çalışmada protein ve enerji ihtiyaçlarının kolostrum ve buzağı IgG konsantrasyonlarını etkilemeyeceği belirtilmiştir (113). Lacetera et al. (114) son dönem gebe ineklerde Vit E ve Selenyum enjeksiyonlarının yapılmayanlara göre daha fazla miktarda kolostrum üretimine yol açtığını bildirmişler, fakat kolostrum IgG konsantrasyonu bu enjeksiyonlara bağlı olarak etkilenmemiştir. Bununla birlikte gebe ineklerde mutlaka dengeli rasyonlarla beslenmeden kaçınılmamalıdır. Zira düşük protein ve enerjili yemler kalitesiz kolostruma neden olabilir. Projenin yürütüldüğü çiftlikte verilen rasyonların dengeli olduğu ve içeriklerinin de uygun olduğu görülmektedir. Bu nedenle düvelerde kolostral IgG düzeylerinin genel ortalamasının altında olmasının nedenlerini yeme bağlamak mümkün olmayacaktır. Yetiştirme şekli, mevsim, genetik ve yaş gibi diğer faktörlerin suçlanması daha doğru bir yaklaşım olabilir. Buzağılama döneminin bazı çalışmalarda kaliteyi etkileyeceği vurgulanmıştır. İleri gebelikte yüksek çevre ısisına maruz kalma sonucunda kötü kaliteli kolostrum elde edilmiştir. Yüksek çevre ısisı; düşük IgG ve IgA ile total protein, kasein, laktalbumin, yağ ve laktozun yüzde ortalamalarının da azalmasına neden olmaktadır (105, 115).

Ayrıca mevsim; stres ve kaba yem kalitesini etkileyebilmektedir. Ekstrem ısılar önemli bir problem olabilir. Kuzey yarım kürede uzun süren kış dönemleri çoğunlukla kötü kaliteli kolostruma neden olurken, güneyde ise yaz sıcağı ve yüksek ısılar kolostrum kalitesini azaltır. Tez projesi 2013 yılı 12. ayı ile 2014 yılının 1. ve 2. aylarında düvelerin doğum dönemlerine uygun bir dönemde gerçekleştirilmiştir. Nevşehir ve çalışmanın yürütüldüğü Avanos ilçesinde günlük sıcaklıkların düşük olduğu ve kış şartlarının oldukça ağır seyrettiği bir dönemde denemeler yapılmış ve numuneler alınmıştır. Dolayısıyla kolostral örneklerde düşük IgG düzeylerini düşük çevre sıcaklığının etkilemesi mümkündür.

Üretilen kolostrum miktarının da kolostrum IgG düzeylerini etkileyebileceği belirtilmiştir. Pritchett et al. (116) 5.5 kg'dan daha az kolostrum üretiminin daha fazla IgG konsantrasyonuna yol açtığını belirtmişlerdir. Bu bulgunun dilüsyonal etkiler nedeniyle gelişeceğine işaret edilmektedir. Fakat daha yeni çalışmalarda ise kolostrum IgG konsantrasyonu ve ilk sağımdaki üretilen kolostrum ağırlığı arasında bir korelasyon olmadığı ifade edilmiştir (117). Bu nedenle tez projesinde ilk sağım kolostrum miktarı bu projede tayin edilmemiştir.

Farklı ineklerden kolostrum toplanarak havuz oluşturulmasından genellikle vaz geçilmektedir. Çünkü yüksek hacimli düşük kaliteli kolostrum, küçük hacimli yüksek kaliteli kolostrumları dilüe edebilir (9). Ayrıca pastörize edilmemiş kolostrum, havuzu kolostrum kaynaklı patojenler nedeniyle enfekte edebilir. Fakat pratik çoğu uygulamalarda aynı işletmede sağılan aynı kalitedeki kolostrumların pastörize edilerek depolanması uygun olan yöntemdir. Projenin yürütüldüğü çiftlikte bir kolostrum havuzu oluşturulmamaktadır. Her ananın kolostrumu kendi buzağısına verilmektedir.

Meme bezlerine ananın dolaşım sisteminden Ig'lerin sekresyonu buzağılama öncesi yaklaşık 5. haftada başlar. Bir gözlemsel çalışmada bu ilişki tam olarak ortaya konulmamıştır (116). Fakat kontrollü başka bir çalışmada (118) 28 ve 56 günlük kuru dönem periyodlarının farklı kolostrum üretmediği ortaya konulmuştur. Fakat 21 gün gibi kısa kuru dönem süresinin veya kuru dönem uygulanmamasının düşük IgG düzeyine neden olduğu görülmüştür (118). Kuru dönem uzunluğu kolostrum miktarını etkilemektedir. Mevcut çalışmada düveler kullanıldığı için kuru dönem etkisi bu çalışmada değerlendirilememiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda kolostrum Ig düzeyleri artarken, kan Ig düzeylerinin ise doğuma doğru azaldığı rapor edilmektedir. Herr et al. (119) tarafından yapılan bir çalışmada periparturient immun durumun değerlendirilmesi amacıyla süt ineklerinden periferik kan ve kolostrum örneklerinde IgG ve IgM düzeyleri değerlendirilmiştir. Kan serum IgG konsantrasyonları doğum öncesi 8. haftada ve doğumdan 1 gün önce alınmıştır. İlk örnekte 36.8 ± 11.6 mg/ml ve ikinci örnekte 18.0 ± 9.1 mg/ml düzeyinde IgG değerleri ELİSA analizleri ile ortaya konulmuştur. Özellikle kuru dönemin başından itibaren doğuma doğru çok önemli bir azalma gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızın sonuçları ile karşılaştırıldığında doğumdan bir gün önce IgG değerleri ile doğum esnasında alınan periferik kan IgG değerlerinin herhangi bir

uygulamanın yapılmadığı kontrol grubunun değerleri ile uyumlu olduğu görülmektedir (17.35 ± 1.93 mg/ml). Bununla birlikte aşı uygulanan ve aşı ile birlikte CCL uygulanan gruptaki doğumla birlikte alınan kanlardaki IgG düzeylerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu yüksek değerlerin immun sistem aktivasyonuna neden olarak humoral bağışıklık üzerinde etkili olduğu bu nedenle daha fazla antikör sekresyonuna yol açtığı ileri sürülebilir. Özellikle doğuma 5 ve 4 hafta kala kolostral Ig'lerin yoğun geçişi söz konusudur. Bu durum ana kanındaki IgG'lerin azalmasına neden olabilir. Herr et al. (119) yaptıkları çalışmada elde edilen doğum öncesi yüksek olan ortalama IgG bulgularının doğumla birlikte azaldığını bildirmektedirler. Bu sonuçların mevcut çalışmanın bulgularından farklı olduğu görülmektedir. Önceki çalışmadan farklı olarak bu çalışmada doğum döneminde ana kanında IgG düzeylerinde azalma değil artış gözlenmiştir. Fakat mevcut çalışmada 6. ve 3. haftalarda elde edilen değerlerden farklı olması örnekleme zamanlarındaki farklılıklara dayandırılmaktadır. Ayrıca bu çalışmada düvelerin kullanılması, yetiştirme farklılıkları ve tür farklılıkları gibi nedenlerin doğum öncesi alınan değerlerin uyumsuzluğuna neden olabilir.

Springer (120) tarafından yapılan bir master tezinde yüksek ve düşük enerjili prepartum diyetlerin kolostrum kalitesi, doğum sonrası infertilite parametreleri ve buzağı sağlığına etkileri araştırılmıştır. İlk doğumunu yapan ineklerin metabolik ve immun parametreleri araştırılmıştır. Geçiş döneminde verilen bu diyetlerin invitro testlerle immun sistemi baskıladığına dair herhangi bir delile rastlanmamıştır. Ayrıca prepartum enerjinin en azından kolostrum kalitesini de arttıracak düşünölmüş fakat bu çalışmada kolostrum protein ve IgG içeriğı üzerinde prepartum dönemde verilen yüksek enerjili diyetlerin bir etkinliğı görölmemiştir. Ayrıca düşük enerjili diyetlerin ineklerin sağlığı üzerinde herhangi bir zararlı etkisi de görölmemiştir. Bu çalışmada elde edilen kolostral IgG düzeyleri de aynı zamanda mevcut çalışmamızın sonuçları ile de örtüşmektedir. Aşı uygulamalarının paralelinde yapılan CCL enjeksiyonlarının analardaki aktif bağışıklığın geliştirilmesi ve kuvvetlendirilmesi üzerindeki etkinliğı ortaya konulmuştur. Özellikle kolostrum kalitesi içeriğindeki IgG düzeyi ile doğru orantılıdır. Bu nedenle aşılama ile birlikte immun modölatör bir ilacın kullanımı kolostrum IgG düzeyini arttırarak kolostrum kalitesini artırmıştır. Bu sayede daha kaliteli kolostrum alınması ile buzağılardaki kaliteli maternal antikör geçişi sayesinde buzağıların hastalıklara karşı korunması daha etkili bir biçimde sağlanabilecektir. Her

ne kadar bu proje ile doğumdan sonra buzağların takibi bırakılmakla birlikte ilerleyen süreçte yetiştiriciden alınan bilgiler söz konusu çalışma kapsamındaki hayvanların diğer hayvanlara göre daha dirençli oldukları ve hastalanmadıkları yönünde olmuştur.

Gerek beşeri (İmmunex: *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarından elde edilen polisakkarit) gerekse veteriner hekimliği alanında (Zylexis: İnaktif Parapoxvirüs ovis D1701 suju ve Ultra-corn: *Corynebacterium cutis* lizati) patojenik etkinliği düşük bakteri veya virus antijenleri ile hazırlanmış çeşitli preparatlar kullanılmaktadır. Nonspesifik immune stimulant *Corynebacterium cutis* lizatının (Ultra-corn) veteriner hekimliğinde kullanımı hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Özellikle anaların aktif bağışıklığındaki nonspesifik immune stimulant etkisi bilinmemektedir. Buzağı ishallerinin özellikle hayatın ilk günlerinde ortaya çıkmasında bu hayvanlardaki immun yetmezliğin önemli oranda rol aldığı bilinmektedir. Bu nedenle bu proje ile birlikte anaların immun sisteminin de güçlendirilmesi sağlanmıştır.

Buzağı ishalleri çoğu zaman anaya bağlı, buzağıya bağlı ve çevresel faktörler nedeniyle ve başlıca pasif maternal yetmezliğe bağlı; bakteriyel, viral, paraziter gibi yapıcı etkenler sonucu ortaya çıkar. Yapılan başlıca antibiyotik ve sıvı tedavileri etkili olabildiği gibi çoğu zaman ishalin tekrar oluşması nedeniyle kayıplara da yol açar. Veteriner hekimlerce nonspesifik immun tedavilere şüpheli yaklaşılmakta ve bu tip uygulamaların etkileri bilinmemektedir. Bu nedenle projenin buzağı ishallerinden korunmada anaların ve immünoterapi ile bağışıklığa önemli oranda yardımcı olacak bir uygulamanın kazandırılması ve bu projeden elde edilecek veriler yardımıyla yazılacak makalenin buzağı bağışıklığında immünoterapi hakkındaki literatür bilgilerine yeni bir uygulamanın katılması nedeniyle katkı sağlaması açısından da önem arz etmektedir.

Corynebacterium cutis lizati da nonspesifik bir immünmodülatördür (90-92). Gebe koyunlarda, domuzlarda, sığırlarda ve kanatlı hayvanlarda immün sistemin nonspesifik uyarımını sağlar. CCL'nin etkinliği ile ilgili bir çalışmada yenidoğan buzağlarda 2ml/100 kg CCL uygulamasının yaşama kalitelerini (kilo alımı, mortalite ve morbidite oranları üzerine) olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir. Gebe koyunlara gebeliğin 140. gününde tek doz olarak 2 ml CCL uygulaması ile anne, kolostrum ve postpartum dönemde yavrularda IgG düzeylerini arttırmıştır. Bu çalışma ile ayrıca ilaca bağlı herhangi bir yan etkiyle karşılaşmadan kuzuların canlı ağırlıklarının arttırılması, güç doğumların azaltılması sağlanmıştır. Bu uygulamanın postpartum ve neonatal

hastalıkların oranlarının azaltılmasında bu ilacın etkili olabileceği vurgulanmıştır. Kıvırcık melezi 2.5-5 yaş arası koyunlarda postpartum 1 aylık süreçte CCL uygulanan analardan doğan yavruarda ölüm oranı kontrol grubuna göre daha az şekillenmiştir (92). Bu tez projesi de koyunlardan elde edilen bulguları desteklemektedir. Her ne kadar çalışma kapsamındaki hayvanların doğum sonrası problemleri ve neonatal buzağı sağlığı takibi proje kapsamına alınmasa da postpartum buzağı problemleri hakkında yetiştiriciden alınan çalışma kapsamındaki hayvanlarda ve yavrularında herhangi bir problemin görülmediğine dair bilgiler de bu öngörüü desteklemektedir.

Projede ulaşılan amaçlar doğrultusunda neonatal buzağı ishallerinin profilaksisinde önemli bir yeri olan gebelerdeki aşılamların etkinliğinin artırılması kolostruma daha fazla IgG geçişinin sağlanması ile yukarıda belirtilen ve gebe koyunlar üzerinde yapılan çalışmalara (91) paralel biçimde kolostrumun kalitesinin artırılması sağlanmıştır.

Kontrol ve yalnız aşı uygulaması yapılan gebe düvelerde özellikle doğum zamanında alınan kanlarda aşı ile birlikte CCL uygulaması yapılanlarda serum IgG düzeyinin aynı zamanda alınan diğer verilerden istatistikî açıdan önemli oranda ($p<0.01$) yüksek olduğu ($100,59\pm56,05$ mg/ml) ortaya konulmuştur.

Aşı protokollerine paralel CCL uygulamalarının da immunstimülan amaçlı kullanımları ile sahadaki veteriner hekimlerin damızlık işletmelerinde kullanabilecekleri bir preparatın farklı bir etkinliği de kanıtlanmıştır.

CCL rinderpest aşısı ile birlikte uygulandığında adjuvan etki göstermektedir (94). Ayrıca CCL bivalent Şap aşısı ile birlikte uygulanmasında ise aşının immünojenitesini arttırdığı bildirilmiştir. Enfeksiyona maruz bırakılan sığırlarda morbidite CCL+aşı uygulananlarda, sadece aşı uygulananlara oranla daha düşük olduğu bildirilmiştir (91). Bu aşı çalışmaları ile uyumlu biçimde mevcut çalışmanın bulguları da özellikle aşı uygulamalarına paralel nonspesifik bir immun stimulantın hem ana kanında hem de kolostrum içeriğindeki immunglobulin düzeylerinin ortaya konulması ile bu projenin bir diğer amacına da ulaşılmıştır. Aşı ve CCL uygulamalarının kolostrum kalitesine olumlu yöndeki etkisi önceki çalışmaları desteklemiştir.

Ancak mandalarda yapılan bir çalışmada ise doğumdan takribi 60 gün önce 10 ml CCL uygulamasının annelerde kolostrum IgG düzeylerini üzerine belirgin etkinliği

görülmemiştir. Vitamin E-Selenyum (Viteselen) uygulaması CCL'ye oranla daha etkin bulunmuştur. Vitamin E-selenyum+CCL uygulanan grupta kolostrum IgG düzeyleri yalnızca Vitamin E-Selenyum uygulanan gruba göre daha düşük olarak rapor edilmiştir (96).

Bu durumun temel nedenleri; kolostrum kalitesini etkileyen başka faktörlerin de çalışma sonuçlarını etkileyebileceğidir. Zira yaş, laktasyon öncesi bakım ve besleme, ırk, genetik faktörler, doğum öncesi yaşanan hastalıklar, doğum sonrası enfeksiyon durumları gibi birçok faktör de hayvanlarda kolostrum kalitesini etkileyen en önemli faktörler olabileceği ifade edilmektedir (95). Dolayısıyla sonuçlardaki farklılıklar yukarıda açıklanan nedenlerden kaynaklanabilir.

CCL'nin immün parametrelere etkinliğinin araştırıldığı koyunlarda yapılan bir araştırmada 10 adet erkek Merinos tokluya prospektüsün önerdiği dozda (8 mg, 0.4 mL) *Corynebacterium cutis* lizatu (Ultra-corn® Inj. Susp.) subkutan yolla bir kez uygulanmıştır. Uygulamadan önce (0. saat, kontrol) ve sonraki 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde v. jugularisten kan örnekleri alınmış ve serumları çıkarılmıştır. Elde edilen serumlardan tümör nekrozis faktör alfa (TNF α), interlökin (IL)-1 β , IL-6 ve IL-10 düzeyleri ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. TNF α , IL-1 β , IL-6 ve IL-10 düzeyleri sırası ile 12, 4, 24 ve 12. saatlerde pik konsantrasyonlarına çıkmıştır. Süreç boyunca sitokin düzeylerinde dalgalanmalar görülmüştür. Ancak sitokin düzeylerinde belirlenen değişimlerin istatistiki fark oluşturacak düzeyde olmadığı rapor edilmiştir. CCL'nin immun stimulan etkisinin belirlenmesi için daha detaylı moleküler düzeyde araştırmalar yapılması gerektiği ifade edilmiştir (97).

Yukarıdaki raporlara bakıldığında CCL'nin immün parametreler üzerine etkinliği ve etki mekanizması yeterince açık değildir. Ayrıca CCL'nin immün sistemi nasıl aktive ettiğine ilişkin bilgiler de yetersizdir (95).

Uzun bir süredir buzağılamadan önce yapılan aşılama ile spesifik antijenlere karşı kolostral antikorları arttıracak düşünülmekteydi. Bu düşünce en iyi şekilde *Escherichia coli*, rotavirus, and coronavirus. neonatal ishal patojenlerine karşı anaların aşılama ile gösterilmiştir (121). Modifiye canlı virus aşılarının kolostral antikorları arttırdığı görülmüştür (122). Kolostral antikorların arttırılmasında aşı ile beraber CCL uygulaması da etkili olmuştur.

İnaktif viral aşılar ise aynı etkiyi göstermemiştir (123). Aşılar antikorların kolostral transferini artırmak için dizayn edilmelidir. İşte bu nedenle inaktif aşıların etkinliğinin arttırılması düşünülmüştür. Mevcut olan ve doğumdan hemen önce kullanılan ticari aşıların etkinliğini artırmak için çeşitli iz element ve vitaminler (Se, C vit, A, D, E vit) ve gıdasal uygulamalar yapılabilirse de aşıyla eşzamanlı immunmodülatörlerin kullanımı saha veteriner hekimliği açısından yeni bir uygulamadır. Böylece özellikle inaktif E. coli, rotavirus ve coronavirus aşısının immünojenik özelliği bu çalışma ile arttırılmıştır. Verilen immunmodülatör ile hem ana kanında hem de kolostrumda IgG düzeylerinin anlamlı oranda arttırılabileceği gösterilmiştir. Kolostrum kalitesinin arttırılmasında özellikle kolostrumda yeterli IgG ihtiva etmeyen düvelerin veya diğer sığırların kolostrum kalitesinin yükseltilebileceği de bu çalışma ile ilk kez gösterilmiştir.

Bu tez projesinde de immunmodülatör etkili ilacın IgG düzeylerini arttırmasında hangi mekanizmaları aktive etkilediği belirlenmemiştir. Bu nedenle immünojenik aktivitede rol oynayan ara mekanizmaların araştırılması ileride yapılacak çalışmalar için tavsiye edilebilir.

Bundan sonraki konuyla ilgili yapılacak çalışmalarda, mevcut immun modülatör ilaçların immun sistem aktivasyonunda nasıl rol aldıkları ve ilgili ara mekanizmaların da araştırılması ve en uygun immunmodülatörün ortaya konulması da amaçlanmaktadır.

Sonuç olarak; Bu yüksek lisans tez projesinde; henüz çoklu doğum yapan inekler kadar kolostral IgG düzeylerine tam olarak ulaşamayan düvelerde kan ve kolostrum IgG düzeylerinin arttırılmasında CCL enjeksiyonlarının güvenle kullanılabileceğine,

Herhangi bir nedenle immun sistemi baskı altında olan gebelerde kolostrum kalitesinin arttırılmasında CCL'nın kullanılabileceğine,

Gebe hayvanlarda CCL'nın herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadığına karar verilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Amer HA, Badr AM. Influence of antepartum administration of immunopotentiators on reproductive efficacy of buffalo and viability of their newborn. Vet Ital 2008; 44: 373-382.
2. Eid G, Zaghioul WA, Awaad AHH. Role of *Corynebacterium cutis* as an immunostimulant on the response of chickens against fowl pox virus. Vet. Med. J. Giza 1995; 43: 219-229.
3. Lee WC, Kim TH, Lee SM, et al. An Observative Study on the Application of *Corynebacterium cutis* lysate (Ultra-corn_) in Decreasing of Somatic Cell Count of the Bulk Milk from a Herd of Dairy Cows for Milk Hygiene. Korean J. Vet. Publ. Hlth 1996; 20: 349-353.
4. Pretorius C. The effect of corynebacterium cutis lysate to control somatic cell counts in dairy cows Magister Scientiae Agriculturae University of the Free State, Bloemfontein, November 2008
5. Arguello A, Castro N, Capote J. Evaluation of a color method for testing immunoglobulin G concentration in goat colostrum. J Dairy Sci 2005; 88: 1752-1754.
6. Abel Francisco SF, Quigley JD. Serum immunoglobulin concentrations after feeding maternal colostrum or maternal colostrum plus colostrum supplement to dairy calves. Am J Vet Res 1993; 54: 1051-1054.
7. Courtney AK, Epperson WB, Wittig TA, et al. Defining failure of passive transfer in South Dakota beef calves, AES 113th Annual Report, 2000
8. Hopkins FM, Dean DF, Greene W. Failure of passive transfer in calves: comparasion of field diagnosis methods. Modern Veterinary Practice 1984; 65: 625-628.
9. Weaver DM, Tyler FW, Vanmetre DC, et al. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. J Vet Intern Med 2000; 14: 569-577.

10. Wattiaux AM, Howard TW 1997. Dairy Essentials. Babcock Institute for International Dairy Research and Development. WI 53706, USA.
11. Anonim 2003. Colostrum frequently asked questions. <http://www.metafoods.com/colostrum/MFfaq.htm>. Erişim Tarihi:06.06.2016
12. Blowey RW. A Veterinary Book for Dairy Farmers (2nd ed.), Farming Press Ltd. Great Britain, 1993: 15-77.
13. Townsend HGG. Environmental Factors and Calving Management Practices that Affect Neonatal Mortality in Beef Calf. Vet Clin North Am Food Anim Pract 1994; 10; 119-127.
14. Wells SJ, Garber LP, Hill GW. Health Status of Prewaned Dairy Heifers in the United States. Preventive Veterinary Medicine 1996; 29; 185-199.
15. Collery P, Bradley J, Fagan J, et al. Causes of Perinatal Calf Mortality in the Republic of Ireland. Ir Vet J 1996; 49; 49-496.
16. Donovan GA, Dohoo IR, Montgomery DM, Bennett FL. Associations between Passive Immunity and Morbidity and Mortality in Dairy Heifers in Florida, USA. Preventive Vet Med 1998; 34: 31-46.
17. Andrews AH, Read DJ. Disease Levels in Calves up to Five Weeks Old Kept under Commercial Conditions and Different Management Systems, Proceedings [of the] XIIth World Congress on Diseases of Cattle September 7-10, 1982 Internationaal Congrescentrum RAI, Amsterdam, the Netherlands.
18. Sivula NJ, Ames TR, Marsh WE, Werdin RE. Descriptive Epidemiology of Morbidity and Mortality in Minnesota Dairy Heifer Calves. Preventive Vet Med 1996; 27: 155-171.
19. Dutil L, Fecteau G, Bouchard E, et al. A questionnaire on the Health, Management, and Performance of Cow-Calf Herds in Quebec. Can. Vet. J. 1999; 40: 649-656.
20. French NP, Tyrer J, Hirst WM. Smallholder dairy farming in the Chikwaka communal land, Zimbabwe: birth, death and demographic trend. Preventive Vet Med 2001; 48: 101-112.

21. Arda M. Neonatal Buzağlarda İshaller ve Neonatal Bağışıklık. Etlik Vet. Mikrob. Derg 1988; 6; 143-169.
22. Burgu İ, Öztürk F. Neonatal Dönemdeki Buzağların Viral Hastalıkları. Neonatal Buzağı Kayıpları Sempozyumu, Sf: 50-59, 1986, S.Ü. Veteriner Fakültesi, Konya
23. Tzipori SR, Smith ML, Halpin C, et al. Intestinal changes associated with rotavirus and enterotoxigenic Escherichia coli infection in calves. Vet Microbiol 1983; 8: 35-43.
24. Foster DM, Smith GW. Pathophysiology of diarrhea in calves. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2009; 5: 13-36.
25. Besser TE, Gay CC. Septicemic colibacillosis and failure of passive transfer of colostral immunoglobulin in calves. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract 1985; 1: 445-459.
26. Curtis CR, Scarlett JM, Erb HN, White ME. Path model of individual-calf risk factors for calfhoo morbidity and mortality in New York Holstein herds. Prev Vet Med 1988; 6: 43-62.
27. Frank NA, Kaneene JB. Management risk factors associated with calf diarrhea in Michigan dairy herds. J Dairy Sci 1993; 76: 1313-1323.
28. Lorenz I, Mee JF, Early B, More SJ: Calf health from birth to weaning. I. General aspects of disease prevention. Ir Vet J 2011; 64: 10.
29. Mateu E, Martin M. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2001; 48: 569-581.
30. Constable PD. Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. J Vet Int Med 2004; 18: 8-17.
31. Todd CG, Millman ST, McKnight DR, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy for neonatal calf diarrhea complex: Effects on calf performance. J Anim Sci 2010; 88: 2019-2028.
32. Constable PD. Treatment of calf diarrhea: antimicrobial and ancillary treatments. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2009; 25: 101-120.
33. Victora CG, Bryce J, Fontaine O, Monasch R. Reducing deaths from diarrhea through oral rehydration therapy. Bull World Health Organ 2000; 78: 1246-1255.

34. Michell AR, Brooks HW, White DG, Wagstaff AJ: The comparative effectiveness of three commercial oral solutions in correcting fluid, electrolyte and acid-base disturbances caused by calf diarrhoea. *Br Vet J* 1992; 148: 507-522.
35. Smith GW: Treatment of calf diarrhea: Oral fluid therapy. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 2009; 25: 55-72.
36. Berchtold J. Treatment of calf diarrhea: intravenous fluid therapy. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2009; 25: 73-99.
37. Gutzwiller A. Effect of colostrum intake on diarrhoea incidence in newborn calves. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2002; 144: 59-64.
38. Alpan O, Arpacık R. *Sığır Yetiştiriciliği* (2. Baskı), Şahin Matbaası, Ankara, 1998: 20-30.
39. Reber AJ, Lockwood A, Hippen AR, Hurley DJ. Colostrum induced phenotypic and trafficking changes in maternal mononuclear cells in a peripheral blood leukocyte model for study of leukocyte transfer to the neonatal calf. *Vet Immunol and Immunop* 2006; 109: 139-150.
40. Godden S. Colostrum Management for Dairy Calves. *Vet Clin Nort AmFood Anim Pract* 2008; 24: 19–39.
41. Kirk JH. Colostrum Key to Control Early Calfhood Diseases and Death Loss. *Arkansas Agriculture Newsletters* 2005; 13 (9).
42. Stott GH, Marx DB, Menefee BE, Nightengale GT. Colostral Immunoglobulin Transfer in Calves. III. Amount of Absorption. *J Dairy Sci* 1979; 62: 1902-1907.
43. Selk, G.E. 1995. Disease Protection for Baby Calves. Okla. Oklahoma Cooperative Extension Service. Fact Sheet ANSI-3358..
44. Kehoe SI, Heinrichs AJ. Bovine colostrum composition. *CAB reviews: Perspectives in Agriculture. Vet. Sci. Nutr. Nat. Res* 2007; 2: 1-9.
45. Larson BL, Heary HL, Devery JE. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. *J Dairy Sci* 1979; 63: 665-671.
46. Larson BL. Transfer of specific blood serum protein to lacteal secretions near parturition. *J Dairy Sci* 1958; 41: 1033.

47. Barrington GM, Besser TE, Davis WC, et al. Expression of immunoglobulin G1 receptors in bovine mammary epithelial cells and mammary leukocytes. *J Dairy Sci* 1997; 80: 86-93.
48. Brandon MR, Watson DL, Lascelles AK. The mechanism of transfer immunoglobulin into mammary secretion of cows. *Aust J Exp Biol Med* 1971; 49: 613-623.
49. Mach JP, Pahud JJ. Secretory IgG: A major immunoglobulin in most bovine external secretions. *J Immunol* 1971; 106: 552.
50. Pike RM. Antibody heterogeneity and serological reactions. *Bact Rev* 1967; 31: 157-174.
51. Butler JE, Kiddy CH, Pierce CS, et al. Quantitative changes associated with calving in the levels of bovine immunoglobulins in selected body fluids. 1. Changes in the levels of IgA, IgG, and total protein. *Can J Comp Med* 1972; 36: 234-242.
52. Duncan JR, Wilkie BN, Hiestand F, et al. The serum and secretory immunoglobulins of cattle: Characterization and quantitation. *J Immun* 1972; 108: 965-976.
53. Waldman TA. Disorders of immunoglobulin metabolism. *New Engl J Med* 1969; 281: 1170-1177.
54. Ziparsky AE, Brown EJ, Bienenstock J. Lack of opsonization potential of 11s human secretory α A. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973; 142: 181-184.
55. Williams RC, Gibbons RJ. Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A. A mechanism of antigen disposal. *Science* 1972; 177: 697-699.
56. Gay CC. Colostrum research says feed 4 quarts for healthier calves. *Hoard's Dairyman* 1994; 139: 256.
57. Besser TE, Gay CC. The importance of colostrum to the health of the neonatal calf. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1994; 10: 107-115.
58. McGuirk SM, Collins M. Managing the production, storage and delivery of colostrum. *Vet Clin of North Am Food Anim* 2004; 20: 593-603.
59. Morin DE, McCoy GC, Hurley WL. Effects of quality, quantity, and timing of colostrum feeding and addition of a dried colostrum supplement on immunoglobulin G1 absorption in Holstein bull calves. *J Dairy Sci* 1997; 80: 747-753.

60. Matte JJ, Girard, Seoane JR. Absorption of colostral immunoglobulin G in the newborn dairy calf. *J Dairy Sci* 1982; 65: 1765-1770.
61. Bush LJ, Staley TE. Absorption of colostral immunoglobulins in newborn calves. *J Dairy Sci* 1980; 63: 672-680.
62. Muller LD, Ellinger DK. Colostral Immunoglobulin Concentrations Among Breeds of Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* 1981; 64: 1727-1730.
63. Tyler JW, Steewens BJ, Hostetler DE, et al. Colostral immunoglobulin concentrations in Holstein and Guernsey cows. *Vet. Res* 1999; 60: 1136-1139.
64. Kaygisiz A, Köse M. Siyah Alaca İneklerde Kolostrum Kalitesi ve Kolostrum Kalitesinin Buzagı Gelisme Özelliklerine Etkisi. *Tarım Bilimleri Dergisi* 2007; 13 4: 321-325.
65. Mohamed EM, Ibrahim ES, Mohammed FS. Effect of administration of ultra-corn with bivalent Foot and Mouth disease oil vaccine in calves. *Vet World* 2013; 6: 486-492.
66. Kumar S, Gupta P, Sharma S, Kumar D. A review on immunostimulatory plants. *Journal of Chinese Integrative Medicine* 2011; 9: 117–128.
67. Yılmaz ÖT, Kaşıkçı G, Gündüz MC. Benefits of pregnant sheep immunostimulation with *Corynebacterium cutis* on post-partum and early newborn's life IgG levels, stillbirth rate and lamb's weight. *Small Rum Res* 2011; 97: 146-151.
68. Kaymaz AA, Bakırel U, Bilal T. Enzootik pnömonili buzağılarda Parapoxvirus ovis D1701 suşu ve enrofloxacin kombinasyonunun tedavi etkinliği üzerine bir araştırma. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg* 2001; 27: 1-6.
69. Gökçe G, Irmak K, Sural E, Uzlu E. Koyun çiçeğinde immunomodülatörlerin sağaltıcı ve koruyucu etkileri üzerine klinik gözlemler II. Koyun çiçeğinin sağaltımı ve korunmasında PIND-ORF (Baypamun) kullanımı. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 1997; 3: 217-221.
70. Pekmezci G, Pekmezci GZ, Guzel M. Efficacy of amitraz plus inactivated parapoxvirus ovis in the treatment of canine generalised demodicosis. *Veterinary Record* 2014; 174: 556 – 556.

71. Gül Y, Aksoy G. Sindirim sistemi hastalıkları. In: Geviş getiren hayvanların iç Hastalıkları (2. Baskı), Gul Y, medipress matbacılık, Malatya, 2006: 17-162.
72. Erduram M, Aydın M, Can İ, Başdelioğlu K. Bir orf olgusu. Balıkesir Sağlık Bil Derg 2012; 1: 16-18.
73. Forster R, Wolf G, Mayr A. Highly attenuated poxviruses induce functional priming of neutrophils in vitro. Arch. Virol 1994; 136: 219–226.
74. Fachinger V, Schlapp T, Saalmüller A, Evidence for a parapox ovis virus- associated superantigen. Eur. J. Immunol 2000a; 30: 2962–2971.
75. Fachinger V, Schlapp T, Strube W, et al. Poxvirus-induced immunostimulating effects on porcine leukocytes. J. Virol. 2000b; 74: 7943–7951.
76. Mayr A, Büttner M. Paraspezifisches Immunsystem, Paramunisierung, Paramunität. Vet 1992; 7: 31–33.
77. Büttner M, Czerny CP, Lehner KH, et al. Interferon induction in peripheral blood mononuclear leukocytes of man and farm animals by poxvirus vector candidates and some poxvirus constructs. Vet Immunol Immunop 1995; 46: 237–260.
78. Haig DM, Mercer AA. Ovine diseases. Orf. Vet Res 1998; 29, 311–326.
79. Büttner M. Principles of paramunization. Option and limits in veterinary medicine. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1993; 16: 1-10.
80. <https://www.zoetisus.com/products/horses/zylexis.aspx> (08.05.2016).
81. Ziebell KL, Kretzdorn D, Auer S. The use of Baypamun N in crowding-associated infectious respiratory disease: efficacy of Baypamun N (freeze dried product) in 2-week-old veal calves. Zentralbl Veterinärmed 1997a; 44: 415–424.
82. Ziebell KL, Steinmann H, Kretzdorn D, et al. The use of Baypamun N in crowding associated infectious respiratory disease: efficacy of Baypamun N (freeze dried product) in 4–10 month old horses. Zentralbl Veterinärmed 1997b; 44: 529–536.
83. Gültiken N, Vural R. Köpeklerdeki malign meme tümörlerinin operasyona ek olarak uygulanan Baypamun ile tedavisi. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2004; 51: 99-103.

84. Schutze N, Raue R, Buttner M, Alber G. Inactivated parapoxvirus ovis activates canine blood phagocytes and T lymphocytes. *Vet Microbiol* 2009; 137: 260-267.
85. Weber O, Siegling A, Friebe A, et al. Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus. *J Gen Virol* 2003; 84: 1843-1852.
86. Friebe A, Siegling A, Friederichs S, et al. Immunomodulatory effects of inactivated parapoxvirus ovis (ORF virus) on human peripheral immune cells: induction of cytokine secretion in monocytes and Th1-like cells. *J Virol* 2004; 78: 9400-9411.
87. Biuk-Rudan N, Sver L, Valpotic I, et al. Effect of Baypamun treatment on Aujeszky's disease virus (ADV) transmission in pigs. *Acta Vet Brno* 2004; 73: 59-68.
88. Terzić S, Jemeršić L, Lojkić M. Leukocyte subsets and specific antibodies in pigs vaccinated with a classical swine fever subunit (e2) vaccine and the attenuated orf virus strain d1701. *Acta Vet Hung* 2004; 52: 151-161.
89. Büttner M. Safety and efficacy of a combined parapox/BVD vaccine. *Dev Biol Stand.* 1986; 65: 221-226.
90. Er A, Dik B, Corum O. Effect of *Corynebacterium cutis* lysate on serum oxidative stress and plasma prostaglandin F₂ α metabolite levels. *Acta Scientiae Veterinariae* 2014; 42: 1-6.
91. Mohamed EM, Ibrahim EES, Mohamed FS. Effect of administration of ultra-corn with bivalent Foot and Mouth disease oil vaccine in calves. *Veterinary World* 2013; 6: 486-492.
92. Yılmaz ÖT, Kaşıkçı G, Gündüz MC. Benefits of pregnant sheep immunostimulation with *Corynebacterium cutis* on post-partum and early newborn's life IgG levels, stillbirth rate and lamb's weight. *Small Rum Res* 2011; 97: 146-151.
93. Ultr-corn, Enjekttable süspansiyon, Veteriner Non-Spesifik İmmünostimülan, <http://www.selfarma.com.tr/?p=995>, 06.06.2016
94. Shalaby M, Saleh SM, el-Atrash S, et al. Application of *Corynebacterium cutis* lysate as an immune stimulant in cattle. *Molecular biotherapy* 1992; 4: 147-50.

95. Yılmaz Ö, Kaşıkçı G. Factors affecting colostrum quality of ewes and immunostimulation. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2013; 37: 390–394.
96. Amer HA, Hashem MA. Reproductive performance and viability of newborns in Buffaloes treated antepartum with viteselen and/or ultra-corn. *Slov Vet Res* 2008; 2: 53–60.
97. Er A, Çorum O, Dik B. Determination of the effect of *Corynebacterium cutis* lysate treatment on the cytokine levels in sheep. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences* 2015; 31: 209–2013.
98. Won-Chang L, Tae-Jong K, Sabg-Mok L, et al. An Observative Study on the Application of *Corynebacterium cutis* lysate (Ultra-corn) in Decreasing of Somatic Cell Count of the Bulk Milk from a Herd of Dairy Cows for Milk Hygiene. *Korean J Vet Publ Hlth* 1996; 20: 349-353.
99. Kehoe SI. Colostrum components and their impact on digestive function and growth of dairy calves, PhD Thesis, The Pennsylvania State University 2006: 3-4.
100. Chigerwe, Munashe. Effect of colostral administration practices on serum immunoglobulin concentration in dairy calves. Diss. University of Missouri—Columbia 2008.
101. Morrill KM. Modifying current laboratory methods for rapid determination of colostral IgG concentration and colostral IgG absorption in the neonate. PHD dissertations, Iowa State University 2011.
102. Turgut K. Klinik Enzimoloji, Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis (2. Baskı) Bahçivanlar Basım Sanayi A.Ş. Konya, 2000: 185-189.
103. Kaneko JK. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, (5th ed), Academic Press, San Diego, 1997: 413.
104. Lumsden JH, Mullen K, Rowe R. Hematology and biochemistry reference values for female Holstein cattle. *Can J Comp Med* 1980; 44: 24–31.
105. Morin DE, Constable PD, Maunsell FP, et al. Factors associated with colostral specific gravity in dairy cows. *J Dairy Sci* 2001; 84: 937–943.
106. Oyeniyi OO, Hunter AG.

- Colostrum constituents including immunoglobulins in the first three milkings postpartum. J. Dairy Sci. 1978; 61: 44.
107. Rook JA, Campling RC. Effect of stage and number lactation on the yield and composition cow's milk. J Dairy Res 1965; 32: 45–55.
 108. Gulliksen SM, Lie KI, Sølverød L, Østerås O. Risk factors associated with colostrum quality in Norwegian dairy cows. J Dairy Sci. 2008; 9: 704-712.
 109. Güngör Ö, Baştan A, Gebe İneklerde uygulanan aşların kolostrum ve buzağıda IgG konsantrasyonu üzerine etkileri. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2004; 51: 7-11
 110. Swan H, Godden S, Bey R, et al. Passive transfer of immunoglobulin g and preweaning health in Holstein calves fed a commercial colostrum replacer. J Dairy Sci 2007; 90: 3857–3866.
 111. Guy MA, McFadden TB, Cockrell DC, et al. Regulation of colostrum formation in beef and dairy cows. J Dairy Sci 1994; 77: 3002–3007.
 112. Blecha GK, Bulls RC, Olson DP. Effects of prepartum protein restriction in the beef cow on immunoglobulin content in blood and colostrum whey and subsequent immunoglobulin absorption by the neonatal calf. J Anim Sci 1981; 53: 1174–1180.
 113. Hough RL, McCarthy FD, Kent HD, et al. Influence of nutritional restriction during late gestation on production measures and passive immunity in beef cattle. J Anim Sci 1990; 68: 2622–2627.
 114. Lacetera N, Bernabucci U, Ronchi B, et al. Effects of selenium and vitamin E administration during a late stage of pregnancy on colostrum and milk production in dairy cows, and on passive immunity and growth of their offspring. Am J Vet Res 1996; 57: 1776–1180.
 115. Nardone A, Lacetera N, Bernabucci U, et al. Composition of colostrum from dairy heifers exposed to high air temperatures during late pregnancy and the early postpartum period. J Dairy Sci 1997; 80: 838–844.
 116. Pritchett LC, Gay CC, Besser TE, et al. Management and production factors influencing Immunoglobulin G1 concentration in colostrum from Holstein cows. J Dairy Sci 1991; 74: 2336–2341.

117. Grusenmeyer DJ, Ryan CM, Galton DM, et al. Shortening the dry period from 60 to 40 days does not affect colostrum quality but decreases colostrum yield by Holstein cows. *J Dairy Sci* 2006; 89: 336.
118. Rastani RR, Grummer RR, Bertics SJ, et al. Reducing dry period length to simplify feeding transition cows: Milk production, energy balance and metabolic profiles. *J Dairy Sci* 2005; 88: 1004–1014.
119. Herr M, Bostedt H, Failing K. IgG and IgM levels in dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology* 2011; 75: 377–385.
120. Springer HR, Effect of pre-calving diet energy content on immunologic and metabolic parameters in the transition dairy cow. A thesis submitted to the graduate faculty in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science, Biomedical Sciences (Physiology) Program of Study Committee: Iowa State University, Ames, Iowa 2008
121. Saif LJ, Smith KL, Landmeier BJ, et al. Immune response of pregnant cows to bovine rotavirus immunization. *Am J Vet Res* 1984; 45: 49–58.
122. Ellis JA, Hassard LE, Cortese VS, et al. Effects of perinatal vaccination on humoral and cellular immune responses in cows and young calves. *J Am Vet Med Assoc* 1996; 208: 393–399.
123. Osterstock JB, Callan RJ, Van Metre DC. Evaluation of dry cow vaccination with a killed viral vaccine on post-colostral antibody titers in calves. In: *Proceedings of the American Association of Bovine Practitioners*. Columbus 2003; 163–164.