

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMİ ERI ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

742052

Brucella melitensis DIŞ MEMBRAN ANTİJENİNİN LİPOZOM
FORMÜLASYONLARININ FARELERDE OLUŞTURDUĞU SIVISAL
BAĞIŞIK YANITIN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Fatma KAYNAK

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

Prof. Dr. Ufuk ABBASOĞLU

ANKARA

2005

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesindeki büyük katkılarından dolayı danışman hocam Prof. Dr. Ufuk ABBASOĞLU'na, Prof. Dr. Nedim SULTAN'a, Doç. Dr. Tuncer DEĞİM ve Doç. Dr. Zeliha Gül DEĞİM' e,

Deneylerim sırasında emeklerini esirgemeyen Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi çalışanlarından Bio. İsmail KUTLU'ya,

Bütün misafirperverlikleri ile yardımlarını eksik etmeyen Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Özgür KAYNAR ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Gülsen GÜNEŞ ve Yrd. Doç. Dr. Barış OTLU'ya,

Maddi ve manevi tüm desteklerinden dolayı annem, babam, Gözdem ve Fatih'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
Üreme ve Biyokimyasal Özellikler	5
Antijenik Yapı	8
Patogenez ve Klinik Bulgular	10
Brusella İnfeksiyonuna Karşı İnsan Bağışık Yanıtı	12
Laboratuvar Tanı	28
Tedavi	38
Epidemiyoloji	39
Korunma	41
Poliakrilamid Jel Elektrophorezi	45
İnce Tabaka Kromatografisi	48
Lipozomlar	50
3. GEREÇ ve YÖNTEM	53
4. BULGULAR	72
5. TARTIŞMA	80
6. KAYNAKLAR	91
7. ÖZET	102
8. YABANCI DİLDE ÖZET	104
9. ÖZGEÇMİŞ	106

TABLÖLAR

Tablo 1. Brusella bakterilerinin karakteristik özellikleri	7
Tablo 2. PAGE sisteminde uygulama sınırları (proteinler için)	46
Tablo 3. SDS-PAGE jellerinin kompozisyonları	60
Tablo 4. Protein Standartındaki Moleküler Ağırlık Dağılımları	62
Tablo 5. Elektroforez sonrası, jelin gümüş boyama yöntemi ile boyanması	64
Tablo 6. Kullanılan lipidler ve oranları	67
Tablo 7. Standart proteinlerin ve ekstrakta yer alan proteinlerin moleküler ağırlıkları ve Rf değerleri	74
Tablo 8. Grup 1 de yer alan farelerin ağırlıkları, dalak ağırlıkları ve antikor titreleri	77
Tablo 9. Grup 2 de yer alan farelerin ağırlıkları, dalak ağırlıkları ve antikor titreleri	77
Tablo 10. Grup 3 de yer alan farelerin ağırlıkları, dalak ağırlıkları ve antikor titreleri	78
Tablo 11. Grup 4 de yer alan farelerin ağırlıkları, dalak ağırlıkları ve antikor titreleri	78
Tablo 12. Grup 5 de yer alan farelerin ağırlıkları, dalak ağırlıkları ve antikor titreleri	79
Tablo 13. Grup 6 da yer alan farelerin ağırlıkları, dalak ağırlıkları ve antikor titreleri	79
Tablo 14. T-hücre proliferasyonuna ve farelerde koruyucu bağışık yanıtı neden olan Brusella antijenleri	84

SEKİLLER

Şekil 1. Lipozomun şematik ve mikroskopik görüntüsü	50
Şekil 2. Fosfotidilkolin molekülü	52
Şekil 3. Kolesterol molekülü	52
Şekil 4. Gram Boyama Yöntemi	56
Şekil 5. <i>Brucella melitensis</i> 'in mikroskop görüntüsü	56
Şekil 6. Cam plakaların biraraya getirilmesi	58
Şekil 7. Ayırıcı jelin eklenmesi	58
Şekil 8. Jelin yüzeyine suya doyurulmuş bütanol eklenmesi	59
Şekil 9. Tarağın yerleştirilmesi	59
Şekil 10. Akrilamid ve N,N'-metilen bisakrilamid' in kimyasal yapısı	60
Şekil 11. Poliakrilamid jelin kimyasal yapısı	60
Şekil 12. Örneklerin yüklenmesi	62
Şekil 13. Başlangıç anında elektroforez aleti ve jelin görüntüsü	63
Şekil 14. Otuzdördüncü dakikada elektroforez aleti ve jelin görüntüsü	63
Şekil 15. Birbuçuk saat sonra elektroforez aleti ve jelin görüntüsü	63
Şekil 16. İki buçuk saat sonra elektroforez aleti ve jelin görüntüsü	64
Şekil 17. Üç buçuk saat sonra elektroforez aleti ve jelin görüntüsü	64
Şekil 18. Sabitleme	65
Şekil 19. Yıkama	65
Şekil 20. Duyarlılaştırma	65
Şekil 21. Durdurma	65
Şekil 22. TLC' ne uygulanacak numunelerin işlenmesi	68
Şekil 23. Fareden kan alınması	70

Şekil 24. Farelerin dalaklarının çıkartılması	70
Şekil 25. Wright aglütinasyon testinin şematik olarak gösterimi	71
Şekil 26. <i>Brucella melitensis</i> REV-1 membran proteinlere ait SDS-PAGE elektroforetogramı	73
Şekil 27. Proteinlerin moleküler ağırlıklarının hesaplanmasında kullanılan standart grafiği	75
Şekil 28. İnce tabaka kromatografisi sonucunda numunelerin görünümü	76



GİRİŞ

Bruselloz dünyanın pek çok ülkesinde yaygın ve ekonomik yönden önemli bir zoonotik hastalıktır. Hastalık; abortuslar, süt verimi kaybı, damızlık değeri kaybı, infertilite gibi nedenlerle hayvansal üretimde kayıplara neden olurken infekte hayvanlarla direk temas veya kontamine süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi sonucu da önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. *Brucella melitensis*'in brucella türleri içinde insan için en patojenik tür olması ve kırsal kesimde insanların hayvanlarla yakın temasta olmaları nedeniyle koyun brusellozu ülkemizde insan sağlığına olumsuz etki bakımından daha büyük öneme sahiptir¹.

Ülkemizde brusellozla mücadele, hayvanların aşılması ile yapılmaktadır. Koyunlar için *Brucella melitensis* REV-1 aşısı kullanılmaktadır. Aşıların hem insanlarda hem de hayvanlarda infeksiyon oluşturma riski uygulayıcılar ve hayvan yetiştiricilerinde büyük isteksizlik yaratmaktadır¹. Brusella infeksiyonunun aşılama ile kontrol edilmesine yaygın olarak ihtiyaç vardır ve pek çok çalışma sonucunda olumsuz yan etki oluşturmaksızın, aşılama ile yüksek oranda direnç sağlanabildiği gösterilmiştir. Son zamanlarda kullanılan aşılar canlılığını koruyan zayıflatılmış brucella türlerinin bir taşıyıcı içine konması ile hazırlanmıştır^{2,3}. Taşıyıcı olarak genellikle lipozomlar kullanılmaktadır. Lipozomlar immünolojik adjuvan olarak, içlerine yerleştirilmiş (enkapsüle edilmiş) antijene karşı oluşturulacak bağışık yanıtın modüle edilmesinde kullanılabilirler^{4,5}. Çünkü lipozom yapısında bulunan fosfolipitler ve yumurta sarısından elde edilen lesitin gibi maddeler bulunur. Bunlar insan vücudu ile

uyumlu (bio-compatible) maddelerdir. Lipozomlar hem içlerine aldıkları maddeler için koruyucu bir özellik gösterirken, hem de cevap oluşturulması istenen mikroorganizmanın biyolojik membran çeperleri gibi cansız bölümlerini içerseler bile daha yüksek cevap oluşturdıkları için, aşı olarak değerlendirilebilmesi söz konusu olabilecektir. Literatürde, benzer şekilde, lipozom içine alınmış brusella türlerinin membran parçaları ile hazırlanan aşının kullanıldığı başarılı çalışmalar mevcuttur⁶. Ancak, lipozomların yapısını oluşturan lipit karışımının ve oranlarının değiştirilmesi ile daha yüksek etkiye sahip aşının hazırlanması mümkündür.

Kullanılmakta olan aşının kabul edilebilen koruyucu etkilerinin yanında temel olarak diagnostik testlerde girişim yaparak olumsuz sonuçlara yol açabilen aşılama sonrası antikor seviyesinin yüksek olması veya artık virülans bulunması ile ilgili bazı problemler de vardır⁷. Bu nedenlerden dolayı daha yüksek etkili, yan etkisi en az, insanlara da uygulanabilecek olan yeni ve etkili aşı türlerinin araştırılmasına ve geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada brusella dışı membran antijenlerinin, optimum etkiye sahip lipozom formülasyonu ile birleştirilerek uzun etkili antijenik uyarım sağlamaya, yüksek immunolojik değerde brusella aşısı hazırlanması ve geliştirilmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Brusellalar, insanlarda ve hayvanlarda kronik bir hastalık olan bruselloza neden olur⁷. Bruselloz, temelde bir hayvan hastalığı olup (koyun, keçi, sığır, manda, domuz vs.); bunların etleri, sütleri, idrar, gebelik materyali, infekte süt ile hazırlanan süt ürünleri aracılığı ile insanlara bulaşan bir meslek hastalığıdır ve hayvanlarda yavru atımına, süt ve et veriminin düşmesine neden olan bir zoonozdur^{7,8,9}. İnsanlarda enfeksiyona yol açtığı bilinen başlıca brusella türleri ve en sık rezervuarları şunlardır¹⁰ :

TÜR

REZERVUAR

Brucella melitensis

Keçi, koyun, sığır

B. abortus

Sığır, at

B. suis

Domuz, sığır

B. canis

Köpek

Dünya genelinde olguların çoğundan en invazif ve patojenik olan *B.melitensis* sorumludur. Patojenite yönünden *B.melitensis*'i, *B.suis* ve *B.abortus* izler. *B.canis* ve *B.abortus* ile insan enfeksiyonu ise nadirdir¹.

Sayılan türlerden başka; çöl farelerinden izole edilen *B.neotomae*, koç epididimitlerinden sorumlu olan *B.ovis* ve ren geyiklerinde gösterilmiş olan *B.rangiferi* türleri de bilinmektedir^{8,11-14}. Son zamanlarda deniz memelilerinden izole edilen *B.maris* ile de laboratuvar bulaşı sonucu gelişmiş bir insan enfeksiyonu bildirilmiştir¹⁵. Kural olarak farklı brusella türleri belli konaklarda hastalık yapma eğilimindedir. Bununla birlikte, *B.melitensis* ve *B.suis* sığırlarda da bulunabilmektedir. Sığırlar enfeksiyondan korunmak için yaygın olarak

B.abortus aşısı ile aşılanırlar, ancak bu aşı *B.melitensis* infeksiyonuna karşı koruyucu değildir. Brusella bakterileri evcil hayvanlar dışında; yaban domuzu, yabani geyik, tilki, antilop ve bizon gibi birçok yabani hayvanlarda da bulunabilir¹⁶.

Hastalığın ilk bilimsel etüdünü yapan Dr. Bruce'un adına izafeten genel olarak hastalık "bruselloz" olarak anılırsa da seyrettiği hayvan türüne göre ayrı şekilde de adlandırılabilir. Bang, "abortus bang" veya "sığırların bulaşıcı yavru atma hastalığı" olarak bilinen sığır brusellozu dünyanın hemen her yerinde görülen zoonotik bir hastalıktır. Malta humması olarak da bilinen koyun ve keçi brusellozu ise özellikle Akdeniz ülkeleri ve Arap Yarımadası başta olmak üzere dünyanın güney ve güneydoğu ülkelerinde varlığını yaygın olarak sürdüren en önemli zoonotik infeksiyonlardan birisidir¹.

Türkiye'de ilk bruselloz vak'ası 1915 yılında Dr. Kural ve Akalın tarafından Kuleli Askeri Hastanesi'nde tedavi edilen bir askerde tespit edilmiştir. Koyunlarda *B.melitensis* ilk defa Aktan ve Köylüoğlu tarafından 1944 yılında Bandırma Merinos Çiftliği'nde saptanmıştır¹.

Brusellalar, temel olarak retiküloendotelial sistem hücrelerinde, bazen de eklem yerleri ve plasenta gibi hedef organlarda lokalize olan, 0.6 µm eninde, 1.5 µm boyunda, Gram negatif boyanan, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, aerob, tek tek ve bazen de uç uca zincirler oluşturabilen kokobasillerdir^{17,18}. Brusella bakterileri; hücre içinde ürerler ve böylece organizmanın koruyucu etkinliklerinden kaçınabilirler. Bakteriler, küçük olduklarından moleküler hareket nedeni ile yerlerinde titreşirler (Brawnien hareket)¹⁸.

Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri

Brusella türleri, hücre içinde yaşadıklarından, beslenme ihtiyaçları komplekstir. Özellikle ilk izolasyonlarında kompleks besiyerlerinin kullanılması gerekir. Serumlu, gliserinli, glukozlu ve yumurtalı besiyerlerinde üretilirler. Bazı türler için tiamin, niasin, nikotinik asit, vitaminler ve biotin de gerekebilir. Triptozlu agar ya da sıvı besiyerinde 3 günde, kan kültüründe ise yaklaşık 21 günde ürerler. Organizmadan yeni ayrıldıklarında 30 günün üzerinde uzun bir inkübasyon periyodu gerekebilir. Birçok hayvanın plasenta dokusunda brusellalar için bir gelişme faktörü olan eritritol yapısında bir madde izole edilmiştir. Bu durum gebe hayvanların brusellaya karşı neden daha duyarlı olduklarını açıklamaktadır. Aerobik olarak üreme gösterirler ancak *B.abortus* mikraerofildir ve *B.abortus* ve *B.ovis* ilk izolasyonları için %10 CO₂'li ortama ihtiyaç duyarlar. Optimal üreme sıcaklığı 37°C (10-40°C), optimal pH: 6.7-7.4'tür. Inkübasyondan 2-3 gün sonra kolonileri görülebilir. Zengin besiyerlerinde, düzgün kenarlı, konveks, nemli, parlak (şebnem tanesi) koloniler oluştururlar. Kolonileri hemolizsiz ve pigmentsizdir. *B.melitensis* ve *B.abortus*'un bazı türlerinin kolonileri, eski kültürlerde esmer görünebilir. S şeklinde ve mukoid koloni oluşturan suşlarda kapsül gösterilebilir. Pasajlarla ve R koloni şekillerinde bu kapsül kaybolur^{8,14,18,19}.

Brusella cinsi bakterilerin identifikasyonu için konvansiyonel yöntemler olan; üreme için CO₂'e gereksinim duyma, üreaz ve H₂S yapma, boyalara karşı duyarlılık gibi özelliklerin saptanması ve spesifik antiserumların

kullanılması sözkonusudur^{13,14} . Bu yöntemler kullanılarak *B.abortus* için 7, *B.melitensis* için 3 ve *B.suis* için 5 biyovar tanımlanmıştır^{1,18}.

Organik kükürtlü bileşikleri parçalama sonucunda brusellaların üç türü H₂S oluştururlar. Ancak bunlar arasında *B.suis* en uzun süre (3-5 gün) ve en fazla miktarda, *B.abortus* orta süre (2 gün) ve miktarda *B.melitensis* ise en az süre (1 gün kadar) ve miktarda kükürtlü hidrojen yaparlar^{18,19}. Oksidaz ve katalaz testleri brusella cinsi tüm bakterilerde pozitifdir⁸. Karbohidratlardan asit ya da gaz yapmamakla birlikte glukozu az miktarda kullanırlar. Sütte hafif alkali reaksiyon yapar, jelatini eritmez ve indol oluşturmazlar. Ayrıca nitratları nitrite çevirirler⁸. Metil kırmızısı ve Voges Proskauer testleri negatiftir¹⁸.

Tablo 1. Brusella bakterilerinin karakteristik özellikleri^{8,13,20}.

Brusella tipleri	Biyovar	CO ₂ 'e ihtiyaç	H ₂ S oluşturma	Üreaz oluşturma	Boya maddelerinin bulunması halinde üreme				
					Tiyonin			Bazik Fuksin	
					a	b	c	b	c
<i>B.melitensis</i>	1	-	-	D	-	-	+	+	+
	2	-	-	D	-	-	+	+	+
	3	-	-	D	-	-	+	+	+
<i>B.abortus</i>	1	+-	+	X	-	-	-	+	+
	2	+	+	X	-	-	-	-	-
	3	+-	+	X	+	+	+	+	+
	4	+-	+	X	-	-	-	+	+
	5	-	-	X	-	+	+	+	+
	6	-	++	X	-	+	+	+	+
	7	-	++	X	-	+	+	+	+
	8	+	-	X	-	+	+	+	+
	9	++	+	X	-	+	+	+	+
<i>B.suis</i>	1	-	++	Y	+	+	+	-	-
	2	-	-	Y	-	+	+	-	-
	3	-	-	Y	+	+	+	+	+
	4	-	-	Y	+	+	+	+	+
<i>B.canis</i>	1	-	-	Y	+	+	+	-	-
<i>B.neotomae</i>	1	-	+	Y	-	-	+	-	-
<i>B.ovis</i>	1	+	-	-	+	+	+	+	+

D: Değişken, a: 1/25.000, b: 1/50.000, c: 1/100.000, X: 1-2 saatte, Y: 0-30 dakika

Antijenik Yapı

Gram negatif bakterilerin lipolisakkarit tabakası hidrofobik lipid A kısmı, kor bölgesi ve O-zincirinden oluşur²¹. *Brusella* cinsi bakterilerden pek çok dış ve iç membran, sitoplazmik ve periplazmik antijenler identifiye edilmiş ve özellikleri saptanmıştır. Klinik olarak immünodominant olan antijen, lipopolisakkarit (LPS)'tir ve pek çok serolojik tanı testinin temelini oluşturmaktadır²². Brusellaların ve diğer Gram negatif bakterilerin smooth (S) LPS tabakası yapısal ve serolojik olarak 3 bölgeden oluşan kompleks moleküllerdir. Bu bölgeler lipid A adı verilen glikolipid kısım, kor oligosakkariti ve O-polisakkarit (OPS) zinciridir⁸. Ancak *brusella* türlerinde mevcut olan LPS tabakası diğer bakterilerin LPS tabakasından farklılık gösterdiğinden “klasik olmayan LPS” adını alır. *B.abortus*'un lipid A bölgesi glukozamin yerine diaminoglukoz kuyruğu içerir, açıl grupları daha uzundur ve kor oligosakkarit kısmına ester ve amid bağları yerine sadece amid bağlarıyla bağlanır. Brusellaların bu “klasik olmayan LPS” yapıları *E.coli* ve diğer enterik bakterilerin LPS yapısı ile kıyaslandığında yüzlerce kez daha az toksiktir. Brusellaların bu düşük endotoksin aktivitesi *Bartonella* ve *Legionella* gibi diğer hücre içi bakterilerle ortaktır ve hücre içinde yaşama adapte olmak amacıyla gelişmiş olduğu düşünülmektedir²¹.

Brusella türleri, majör yüzey antijeni olarak hangi tip LPS içerdiğine bağlı olarak S (S-LPS) ya da R (R-LPS) tipi koloniler oluştururlar. *B.ovis* ve *B.canis* R-LPS içerirken *B.abortus*, *B.melitensis*, *B.neotomae* ve *B.suis* S-LPS içerirler. S-LPS ve S-LPS'in O zinciri, S koloni yapan brusellarda bulunan

en güçlü antijenik yapıdır¹⁰. S-LPS içeren brucella türlerinde, A ve M olmak üzere 2 farklı tip O-zinciri bulunmaktadır. Her iki tip O-zinciri de 4,6-dideoksi-4-formamido-d-mannopiranoz homopolimeridir. Farklı olarak şeker molekülleri A-zincirinde 2-1 bağı yaparken, M-zincirinde 3-1 bağı yaparlar¹³. A antijeni *B.abortus*'da, M antijeni ise *B.melitensis*'de baskın olan somatik antijenlerdir. Bu suretle aglütinin absorpsiyon testleri kullanılarak *B.melitensis*'i diğerlerinden serolojik olarak ayırmak olanaklı olduğu halde *B.abortus* ile *B.suis*'i birbirinden ayırmak olanaksızdır. Daha çok *B.abortus* suşlarında bulunmuş olan L yüzeyel antijeni ise ilk izolasyonda mevcut olup bakterilerin bağışık serumlarla aglütinasyonuna engel olmakta ancak 100°C'de yarım saat ısıldıktan sonra ortadan kalkmaktadır⁸.

Brucella cinsine ait LPS; 4-amino, 4,6 dideoksimannoz içermektedir ve bu yapı nedeniyle *E.coli* O116, *E.coli* O157, *Francisella tularensis*, *Salmonella* O30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio cholera* O1 ve *Yersinia enterocolitica* O9 LPS'leri ile çapraz antijenite gösterir. S-LPS'in bir virülans faktörü olduğu düşünülmektedir; *B.melitensis*'in transpozonlarıyla ilgili bir çalışmada, LPS'in O yan zincirini ekspresse etmeyen bir mutant identifiye edilmiştir. Bu transpozon, *E.coli* O157:H7 ve *Vibrio cholera* O1'in perozamin sentetaz genleri ile belirgin homoloji gösterir. Mutant organizmalar farelerde yaşamını sürdürmez iken sığır makrofajları içerisinde etkilenmemektedirler; organizmaların invivo olarak yaşamını sürdürmelerinde LPS'in O yan zincirinin olası rolü bulunduğu düşünülmektedir²².

Patojenik bakterilerdeki proteinlerin karakterizasyonu, bakteri ve konak arasında birçok ilişkiyi anlamak ve infeksiyon sırasında ortaya çıkan sıvısal

ve hücrese1 bağışık yanıtı araştırmak açısından önemlidir. Bununla birlikte, proteinler, bakteriyel infeksiyonların serolojik tanısında antijen olarak ve kemoterapötik ajanların ve ilaçların tasarlanması da hedef olarak da kullanılırlar¹¹.

Brusella dış membranı; molekül ağırlıkları 25-27kDa, 31-34kDa ve 36-38kDa olan ve isimleri sırasıyla OMP25, OMP31 ve OMP2b olan 3 majör protein içerir. Daha sonra tanımlanan ve minör dış membran proteinleri olarak bilinen proteinler ise sırasıyla; 10, 16.5, 19 ve 89-kDa ağırlığındadır. OMP16 birçok Gram negatif bakteride varken, OMP10 ve OMP19'un homologları başka bakterilerde henüz gösterilmemiştir^{8,12,17,23,24}.

Patogene z ve Klinik Bulgular

Brusellaların vücuda giriş kapısı ağız, konjunktiva, solunum yolu ya da deri olabilir¹³. Girdiğı yerde üreyen bakteriler, lenf kanallarını izleyerek bölgesel lenf bezlerine gider ve yerleşirler. Bölgesel lenf bezlerinden ductus thorasicus yoluyla kana karışarak bakteriyemi meydana getirirler ve retiküloendotelial sisteme tropizm göstererek organlara yayılırlar. Retiküloendotelial sisteme, yani lenf düğümleri, karaciğer, dalak ve kemik iliğine yerleşir. Brusellalar bu organlarda apseleşebilen granülo matöz nodüller yaparlar ve hücre içi yerleşim gösterirler. Birçok organizma makrofajlar tarafından öldürölürse de bazıları bu hücrelerin içinde hayatta kalır ve böylece antikorlardan korunmuş olur. Konak yanıtı, fokal apse ve kazeinleşmeye kadar ilerleyebilen lenfositler ve epiteloid dev hücreler içeren granülo mlardır. Olaya endotoksinin

katılması hariç tutulursa bu organizmaların kullandığı fizyopatolojik mekanizma iyi tanımlanamamıştır; yani endotoksinin dış parçasından O antijen polisakkaritleri kaybolduğunda organizma virülansını yitirir^{19,25}.

Brusellozun komplikasyonlarında oluşan steril apselerin, infeksiyonun vücutta yapmış olduğu allerjiden ve otolizden ileri geldiği bildirilmiştir. Nekropside gözle görülebilen önemli bir doku değişimi bulunamaz. Dalak büyümüş kanlı ve yumuşaktır. Karaciğerde aynı bulgular nadirdir. Kemiklerde, özellikle lomber vertebralarda cerahatli lezyonlar görülür. Bazı kronik hastalarda, lenf nodüllerinde hodgkin hastalığına benzeyen histopatolojik değişimler göze çarpar. Ölümle sonuçlanan melitensis brusellozunda endokardit ve menenjitte ait patolojik bulgulara da rastlanabilir⁸.

Kuluçka süresi 1-3 hafta arasında değişirse de bazen 6-7 haftayı bulmaktadır. 1-3 hafta süren inkübasyon döneminden sonra influenzaya benzeyen özgül olmayan belirtiler ortaya çıkar. Ateş yükselmesi bazen titreme ile olur. Hastalık gece terlemeleri, bitkinlik, daha çok diz, bel ve dirsek gibi büyük eklemlerde ağrılar ve kilo kaybı ile kendini belli eder. Her hasta değişebilen farklı klinik tablolar gösterebilir. Sıklıkla lenf düğümleri, karaciğer ve dalakta büyüme olur. Brusellozda klinik sendromlar sorumlu olan türe göre değişir. *B.melitensis* en patojenik ve en ağır semptomlara, en büyük doku hasarına neden olan türdür. *B.melitensis* infeksiyonları, daha şiddetli ve uzun süreli olma eğilimindedir. Ateş, özellikle *B.melitensis* infeksiyonlarında 10-15 gün 38-39°C'tir. Bazen daha yükseğe çıkar ve sonra basamak basamak inip 2 hafta içinde normale döner. 3-5 bazen 10 günlük ateşsiz bir devreden sonra yeni bir dalga şeklinde tekrarlar (ondülan ateş). Ondülan ateş hastaların çok azında görülür. Hasta ateşsiz

dönemlerde kendini iyi hisseder. Klinik olarak; subklinik, akut, subakut ve kronik bir seyir saptanır. Genellikle *B.melitensis* ile oluşan infeksiyonlarda hastalar sabahları uyandıklarında kendilerini dinç hissederken 1-2 saat sonra yorgun ve bitkin hisseder. Romatizmal tabloyu çok taklit eder^{8,25,26}.

Hastalık bir yıldan uzun sürdüğü takdirde hastalığın kronikleştiği kabul edilir. Kronik brucelloz 4 şekilde ortaya çıkabilir:

1. Hastalık sinsi seyir gösterebilir.
2. Akut hastalığı izleyerek tekrarlayan nüks atakları olabilir.
3. Hastalık lokalize organ tutulumları gösterebilir.
4. Hastalık antimikrobik tedaviye yanıtı vermez olabilir.

Brucellozda; merkezi sinir sistemi tutulması %2-5, endokart tutulumu %84, ürogenital yerleşme %2-20, karaciğer tutulumu %15-25, deri belirtileri %5, oranında gelişebilmektedir. Ayrıca göz tutulumu sonucu oftalmidler, keratit, retinopati ve üveit gelişebilir. En sık rastlanan komplikasyonu osteomyelittir^{8,25,27}. Omurganın osteoartiküler tutulumu brucellozun yaygın komplikasyonudur ve en fazla tutulum omurgada görülür²⁷. Nörobrucelloz nadir bir (%5'ten daha az) komplikasyondur ve nörobrucellozun en sık görülen klinik formları menenjit ve myelittir^{28,29}.

Brucella İnfeksiyonuna Karşı İnsan Bağışık Yanıtı

Brucellanın birçok antijenine karşı insanda oluşan bağışık yanıt hem sıvısal hem de hücresel bağışık yanıt kapsadığından oldukça komplekstir. Birçok durumda bu kompleks bağışık yanıt bakteriyel infeksiyonu yok etmek ya

da sınırlamak açısından başarılı olsa da bazen virulan bakteri, bağışık yanıtı atlatarak fokal ya da kronik infeksiyonlara neden olabilmektedir. Brusella infeksiyonuna karşı oluşan bağışık reaksiyonlar; infeksiyonunun gelişimi ve çok değişik klinik tabloların oluşması bakımından oldukça önemlidir. Bu nedenle son yıllarda yapılan çalışmalarda brusella bağışık yanıtı incelenirken genellikle klinik tabloyla korele olup olmadığına dikkat edilmektedir³⁰.

A. Hücresel Bağışıklık

Bağışık sistemin uyarılmış T lenfositleri tarafından organizmaya kazandırılan ve antikordan bağımsız olan bağışık cevabı tanımlamak için hücresel bağışıklık terimi kullanılır^{31,32}.

a. T Hücreleri

İmmatür T hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşması timusta olmakta ve hücre yüzeyinde birçok reseptör kazanmaktadırlar³¹. T lenfositlerin temel göstergesi, hücre membranında bulunan T hücre reseptörü (TCR)'dür³¹. T hücreleri, yüzey zar antijenleri ve çeşitli işlevlerine göre farklı alt gruplara ayrılmıştır. Bağışık yanıtın düzenlenmesinde etkili olan T hücrelerinin bir grubuna düzenleyici T lenfositleri, diğer grubuna ise eylemci (effector) T lenfositleri denilmektedir. Düzenleyici T lenfositleri, yardımcı T lenfositleri (Th) ve baskılayıcı T lenfositleri (Ts) olarak ikiye ayrılırlar. Eylemci T lenfositleri de hedef hücreyi öldüren veya hücreye zarar veren hücre olarak, sitotoksik (Tc)

lenfositleri adını alırlar. Eylemci T lenfositleri içinde, deride geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu meydana getiren T hücreleri (T_{DT}) ayrı bir gruptur³³.

Dendritik hücrelerinin aktivasyonundan sonra naiv T hücreleri (Th_0) eylemci ve hafıza T hücrelerine farklılaşırlar. Th_1 hücreleri, IFN- γ ve β kemokinleri, Th_2 ve Tc_2 hücreleri IL-4 ve IL-5 salgırlar³⁴. Th hücreleri B hücrelerine de antikor yapımında yardım eder; timusa bağımlı antijenlerin uyarımı karşısında B lenfositlerine yardım ederek, onların plazma hücrelerine dönüşmelerini ve antikor sentezlemelerini sağlarlar³¹. Oluşan antikoru hangi sınıf olduğunun belirlenmesinde T-B hücre etkileşiminde hangi T hücrelerinin yardımcı olduğu ve hangi sitokinlerin salındığı önemlidir. IFN- γ sentezleyen Th_1 hücreleri IgG₂'nin, IL-4 sentezleyen Th_2 'lerin ise IgG₁ ve IgE'nin baskın olmasına neden olur³⁴. In-vitro olarak insan hücrelerine ya da in-vivo olarak farelere brusella verilmesini takiben CD4+ ve CD8+ hücrelerin IFN- γ sentezlediği gösterilmiştir. İnsan hücre kültürlerinde, reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile tespit edildiğine göre IFN- γ , 6 saat sonra oluşur ve 18 saatte maksimuma ulaşır. Benzer sonuçlar brusella enjeksiyonunu takiben farelerin dalak hücrelerinde de saptanmıştır. Farelerde, IFN- γ mRNA'ya ek olarak enflamatuvar cevap üzerinde negatif geri dönüşüm etkisi olan IL-10 mRNA oluştuğu da gösterilmiştir³⁴.

Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalar, *B.abortus*'un bir adjuvan olarak Th_1 hafıza hücrelerinin oluşmasını sağladığını göstermiştir³⁴. *B.abortus*'a karşı konak bağışık yanıtı primer olarak Th_1 hücreleri ile kontrol edilir. *B.abortus*, konağın antijen sunucu hücrelerini IL-2 salınımı yönünde uyarır. Bu uyarı Th_0

lenfositlerin Th₁ lenfositlerine dönüşümüne neden olur. Th₁ hücreleri IFN- γ salınımını tetikler ve IFN- γ da makrofaj öldürme mekanizmalarını regüle eder³⁵.

Tc hücreleri, yabancı hücrelerin yıkımında görev alır. Tc hücreleri MHC Sınıf I molekülleriyle sunulan yabancı antijeni tanır. Hedef hücre ile Tc hücrelerinin kontağı lizis ile sonuçlanır. Bu kontak; TCR:Ag-MHC kompleksi ile başlatılır. Hedef hücre ile karşılaşıldığında, T hücrelerindeki granüller, karşılaşma noktasına bırakılır ve granüllerin içeriği boşalır. Bu granüller perforin monomerleri içerir ve bu monomerler hedef hücrenin membranına girerek polimerize olur ve membranda bir por oluşturur. Böylece hücresel komponentler dışarı çıkar ve hedef hücre ölür. Makrofajlarla meydana gelen ölümden farklı olarak T hücreleri ile liziste yabancı antijeni taşıyan hedef hücrenin dışındaki komşu hücrelerin ölümü çok düşük oranlarda gerçekleşir³².

Tc hücreleri IFN- γ salgılayarak *B.abortus* ile makrofajları öldürür ve bu da brusella enfeksiyonu için kritik bir yanıttır³⁵.

b. Doğal Katil (NK) hücreler

Katil hücreler; Tc hücrelerden farklılaşan bir başka lenfosit sınıfıdır. Doğal katil (NK) hücreleri T hücresi ya da B hücresi değildir. Sayıları artmaz ya da stimülasyonun ardından hafıza hücrelerine dönüşmezler. Bununla birlikte NK hücreleri, yabancı hücreyi öldürmeleri bakımından T hücrelerine benzerler. Örneğin NK hücreleri de lizis için perforini kullanır. Bununla birlikte, NK hücreleri spesifik bir antijenle uyarıma gerek olmadan da lizis yapabilme özelliğiyle Tc hücrelerinden ayrılır. NK hücreleri, yabancı antijenle temas

olmadan malign hücreler ve virusla infekte hücreleri in-vitro olarak yok edebilme yeteneğindedir. NK hücreleri normal hücreleri ve onların Sınıf I proteinlerini özgül bir seri Sınıf I reseptörü ile tanır. Bu reseptöre bağlanma gerçekleştiğinde litik mekanizma durur ancak bağlanma olmadığında litik mekanizma aktif durumdadır ve NK hücreleri hedef hücreyi lizise uğratar³².

Brusella, antijen sunucu hücrelerin (ASH) IL-12 salgılamasını sağlayarak NK hücrelerini aktive edebilir. IL-12, NK hücrelerini uyararak katil hücreler haline gelmesini ve IFN- γ sentezlemesini sağlar. IFN- γ sentezi ise Th₁ ya da Tc₁ cevabının oluşmasında önemli bir rol oynar³⁴.

NK hücreleri, IFN- γ sentezleyebilmelerinden ve hedef hücreyi öldürebilmelerinden dolayı, hücre içi bakterilerle oluşan infeksiyonların kontrolünde önemli bir rol oynarlar. Bu nedenle NK hücrelerinin brusella infeksiyonunda da önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, in-vivo olarak, farelerde NK hücrelerinin uzaklaştırılması farenin brusella infeksiyonuna karşı olan mücadelesini değiştirmemektedir. Bu, NK hücrelerinin brusella infeksiyonundan korunmada önemli olmadığını göstermez ancak NK hücrelerinin yokluğunda bile başka bağışık sistem mekanizmaların bu olayda rolü olduğunu düşündürür³⁴.

c. Antijen Sunucu Hücreler (ASH)

Makrofajlar ve dendritik hücrelerin içinde olduğu ASH'ler, NK hücreleriyle birlikte mikroorganizmalara karşı olan bağışık cevapta en erken hücrelerdir. Deri altı ve mukozal bölgelerde yerleşmişlerdir. Bakterilerin hücre

duvarında bulunan lipopolisakkarit, Toll-benzeri reseptörler ile ASH'ler tarafından tanınır. ASH'ler hücreye bağlanma, hücrenin aktivasyonu ve bakterinin internalizasyonu ile sonuçlanır. Bu, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi sitokinlerin salınması ve bunların da tekrar ASH'leri aktive etmesi ile sonuçlanır. Fagosit edilmiş bakteri ve apoptotik hücreler, ASH'ler tarafından işlemiden geçirilerek peptid oluşumu gerçekleştirilir ve bu peptidler yeni sentezlenen MHC Sınıf I ve MHC Sınıf II moleküllerinde bulunan uygun bölgelere yerleşerek hücre yüzeyine ulaşırlar. Fagositoz ve aktivasyonu takiben ASH, MHC ve kostimülator molekülleri (B7.1/2) regüle eder ve periferden lenfoid organlara göç eder. Burada, MHC-peptid kompleksi aracılığıyla T hücrelerini stimüle eder ve bu da T-hücre reseptörü (TCR) ve T hücrelerinin yüzeyinde CD28 stimülasyonunu sağlayan B7.1/2 gibi kostimülator molekülleri tetikler³⁴.

In-vitro çalışmalar göstermektedir ki; *B.abortus* insan monositlerini proinflamatuvar sitokin sekresyonu (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) açısından indüklemektedir. Bu özellik *B.abortus*'tan elde edilen lipopolisakkarit ile replike edilebilmektedir. İlginç olarak, *Brucella abortus* lipopolisakkariti bu sitokinleri sağlamak açısından *E.coli* lipopolisakkaritine kıyasla daha az potenttir. Bu sitokinler ASH'lerin stimülasyonunda otokrin bir rol oynarlar³⁴.

İnfeksiyonu takiben ASH'lerin özellikle de dendritik hücrelerin aktivasyonu IL-12 salımı ile sonuçlanır. IL-12; antijen spesifik efektör hücrelere farklılaşan NK hücrelerinin, T ve B lenfositlerin aktivasyonu ve farklılaşmasında çok önemli bir rol oynar. Diğer hücre içi patojenlere benzer olarak *B.abortus*, IL-12 p40mRNA ve IL-12 p40 proteininin insan monositlerinden salınımını indükler. Bu etki, antiCD14 antikorları ile bloke edilir. Monositlerden salgılanan

sekresyonlarda tespit edilen IL-12 p40, muhtemelen fonksiyonel IL-12 gibi iş görmektedir ve NK hücrelerini katil hücreler şekline dönüştürüp insan T hücrelerini IFN- γ sentezlemek üzere uyarmaktadır. *B.abortus*'un IL-12 sentezini sağlaması; Th₀ hücrelerinin Th₁ efektör ve hafıza hücrelerine dönüşümünü sağlamaktadır³⁶.

Buna ek olarak *B.abortus*, B7.1/2'nin insan monositlerindeki yeniden regülasyonuna neden olmaktadır. Bu etki B7.1 üzerinde B7.2'ye oranla daha fazladır. Bu 2 molekül T hücre yüzeyinde CD28 ile etkileşime girer. Bu yol, MHC-peptid sinyali ile T hücrelerinin TCR'lere dönüşümünü sağlayan ASH'lerin de etkisiyle birlikte T hücrelerinin aktivasyonunda kritik bir rol oynar³⁴.

B.abortus aynı zamanda insan monositlerinde ICAM-1 ekspresyonunu da upregüle eder. Bu molekül, ASH ile T hücrelerinin adheransını kolaylaştırmakta ve ASH ye T hücrelerini aktive ederken kolaylık sağlamaktadır³⁴.

Farelerde *Brucella abortus* enjeksiyonunu takiben T hücreleri ve ASH'lerin de dahil olduğu non-T hücrelerde B7.1/2 ekspresyonu artmaktadır. İnsandakinin aksine farede B7.2, B7.1 molekülünden daha fazla eksprese edilir. Non-T hücrelerinde bu ekspresyon 24 saat içinde gerçekleşirken T hücrelerinde bu süre 48 saattir. İnsanlarda olduğu gibi farelerde de ASH lerde B7.1/2 ekspresyonu T hücreleri için ikinci bir sinyal özelliği taşır. Bununla birlikte, B7.2'nin T hücreleri üzerindeki rolü tam olarak bilinmemektedir. T hücresi üzerindeki B7.2 molekülünün diğer T hücreleri üzerindeki CTLA-4 ile etkileşerek bu T hücrelerine negatif bir sinyal gönderdiği varsayılmaktadır. Bu, *B.abortus*'un IFN- γ 'dan bağımsız olarak Th₂ farklılaşmasını süprese etmesi ile ilişkili olabilir³⁴.

Isı ile inaktive olmuş *B.abortus*'un bağışık cevaba neden olması değişik zamanlarda alınan dalak kısımlarının immunohistokimyasal yöntemlerle

in-vivo olarak çalışılmıştır. Fareye *B.abortus* enjekte edildikten sonra, dendritik hücrelerin “kırmızı pulpa”dan IL-12 salgıladıkları T hücre bölgesine (“beyaz pulpa”) göç ettikleri gözlenmiştir. Bu IL-12 sentezi üçüncü saatte başlar, altıncı saatte optimaldir ve 24 saat sonra kaybolur. IL-10 sentezi yapamayan farelerde IL-12 sekresyonunun daha fazla olması ve daha uzun süreli olması, IL-10’un IL-12 için negatif geri dönüşüm etkisi olduğunu düşündürür. Bu durum, daha önce bildirilmiş olan; farelerde *B.abortus* enjeksiyonunu takiben dalakta IL-10 mRNA’nın arttığı ve *B.abortus* ile infekte farelerde IL-10 eksikliğinde yeterli cevabın oluşmadığını öne süren fikir ile de uyumludur³⁴.

Brusellanın vücutta canlı olarak kalıp kronik enfeksiyona neden olması, makrofajlara fagolizozomal füzyon ile ulaşmak ve burada kalabilmesi ile ilgilidir. Buna ek olarak *B.suis*’in infekte hücrede apoptozisi inhibe ettiği de gösterilmiştir. Bununla birlikte, makrofajların aktivasyonu süperoksit anyon ve hidrojen peroksit ile bakterinin öldürülmesine katkıda bulunur. Makrofajlar, IL-1 β ve GM-CSF ile aktive edilirler. Th₁ sitokini olan IFN- γ makrofaj aktivasyonunda ve in-vivo ve in-vitro olarak *Brusella* enfeksiyonunda önemli bir rol oynar. Bunun aksine, Th₂ sitokini olan IL-10 ise makrofaj fonksiyonunu baskılayabilir ve enfeksiyonun etkisini artırabilir. Bu nedenle, Th₂ bakımından baskın olan BALB/c fareleri *Brusella* enfeksiyonuna daha dayanıksızken, Th₁ bakımından baskın olan C57BL/10 fareleri *Brusella* enfeksiyonuna daha dirençlidir³⁴.

Makrofajlar, hem hücresel bağışık yanıtta hem de sıvısal bağışık yanıtta antijen sunucu hücre olarak görev alır. Makrofajlar, antijene bağlanır ve antijeni T hücrelerine sunar. Bununla birlikte makrofajlar aynı zamanda T hücreleri tarafında stimüle edilerek yabancı hücreyi öldürme yeteneğine de

sahiptir. Aktive olmuş bu makrofajların en önemli özelliği normal çoğalmasını sürdüren hücre içi bakterileri öldürmesidir. Bazı bakteriler makrofajlar içinde normal çoğalmasını devam ettirerek varlıklarını sürdürebilmektedirler ve bakterilerin çoğu makrofajların bu özelliği sayesinde öldürölüp sindirilebilmektedir. Makrofajlarda çoğalabilen bakteriler içerisinde; *Mycobacterium tuberculosis*, *M.leprae*, *Listeria monocytogenesis* ve *Brusella* türleri yer almaktadır. *M.tuberculosis* ile uygun dozda infekte edilen hayvanlar T hücre ile meydana gelen bağışık yanıt sayesinde bu enfeksiyonun üstesinden gelebilmektedir. Bu T hücreleri delayed-type (Td) T hücreleridir. İlginç olarak bu hayvanlar *Listeria* gibi ilgisiz mikroorganizmaları da fagositte edip öldürebilmektedir³².

Makrofajlar sadece yabancı patojenlerine değil aynı zamanda yabancı memeli hücrelerine de zarar verebilmektedir. Bu durum, transplantasyon immunolojisinde en önemli problemidir. Aynı zamanda makrofajlar bazı durumlarda tümör hücrelerine de zarar vermektedir çünkü tümör hücreleri bazen normal hücrelerde bulunmayan antijenlere sahip olabilirler³².

İlk kez organizmaya giren antijen, antijen sunucu makrofajlarda hazırlandıktan sonra, makrofajların MHC sınıf II reseptörleriyle Th lenfositlerinde bulunan CD4/TRC/CD3 kompleks reseptörlerine bağlanarak antijeni lenfositlere sunmakta ve IL-1 salgılayarak Th lenfositlerini uyarmaktadır. Uyarılan bu T lenfositleri, lenf düğümünün parakortikal bölgesinde farklılaşmakta ve IL-2 salgılamaktadır. Bu lenfokin, antijene özgül lenfositlerin çoğalmalarını hızlandırmakta ve uzun ömürlü bellek T lenfositleri ile efektör Tc lenfositlerini oluşturmaktadır. Aynı zamanda IFN-γ ile birlikte makrofajların aktivasyonunu da

sağlayarak antikora bağımlı veya bağımsız fagositozu hızlandırmaktadır. Aynı antijenle ikinci kez karşılaşan konakta, hücresel bağışık cevap reaksiyonları ortaya çıkmaktadır. Antijen tarafından uyarılan Th lenfositleri, antikor sentezinin başlatılması için, B lenfositlerin plazma hücrelerine farklılaşmasına da yardımcı olmaktadır³¹.

Düzenleyici lenfositler, Th ve Ts lenfositlerdir. Th lenfositleri timusa bağımlı antijenlerin uyarımıyla hücresel ve humoral bağışık cevabı başlatan lenfositlerdir. Ts lenfositleri, B lenfositler ile Th lenfositlerinin aktivitelerini düzenlemektedir. İmmun cevabın düzenli çalışması Th ve Ts lenfositlerin arasındaki geri dönüşüm mekanizmasının iyi çalışmasına bağlıdır. Makrofaj tarafından hazırlanan antijen Th lenfositlerine sunulduktan sonra uyarılan bu lenfositler, Tc ve B lenfositlerini fonksiyonel hale getirmektedir³¹. Sirkülasyondaki Ts lenfositlerinin Th lenfositlerine oranı 1.86'dır. Bu oran Ts lenfosit lehine artarsa kazanılmış bağışık yetmezlik sendromuna (Acquired immun deficiency syndrome=AIDS), Th lehine artarsa otoimmün hastalıklarına yol açmaktadır. Eylemciler ise Tc lenfositlerdir. Bu grup içinde Tdh (delayed type hypersensitivity) hücreleri olarak bilinen, deride geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturan lenfositler de bulunmaktadır³².

Hücresel bağışık cevabın etkinlikleri, hücreye bağımlı veya antikora bağımlı sitotoksikite ile hedef hücreyi öldürme şeklindedir. Hücreye bağımlı sitotoksikitede efektör Tc, K ve NK hücreleri, hedef hücreye değişik yollardan yapışmaktadır. Tc lenfositleri, hedef hücrelerdeki MHC Sınıf I antijeni ile birleşmiş antijen reseptörüne, kendi MHC Sınıf I reseptörü ile bağlanmaktadır. K hücreleri yüzeyinde IgG Fc molekülü taşıyan hücrelere karşı sitotoksik etki

yapmaktadır. Hedef hücrelerin antijenik reseptörleriyle Fab kısmı bağlanmış IgG'nin Fc kısmı, K hücresinde bulunan IgG Fc reseptörüne bağlanarak hedef hücre ile K hücresi ilişki kurmaktadır. Hedef hücrenin Fc molekülüne bağlanan K hücresi, bu hücre üzerinde sitotoksik etki göstermesi için, hedef hücre yüzeyindeki antijenlere karşı özgül bir antikorun Fab kısmıyla bağlanması gerekmektedir. Bu nedenle bu hücrenin etkisine, antikora bağımlı hücresel sitotoksik etki denilmektedir. NK hücreleri, virusla infekte veya neoplastik hücrelerde oluşan antijenik determinantlara bağlanarak, sitotoksik mekanizma ile bu hücreleri öldürmektedir³¹.

Lenfositlerin salgıladıkları kemotaktik faktörler makrofaj ve lökositlerin olay yerine göçlerini, IFN- γ ise bu hücrelerin fagositoz hızını artırmaktadır. Ayrıca antikorların Fc kısmıyla makrofajların Fc reseptörlerine bağlanması, buna komplemanın C3b ve C5b parçalarının eklenmesiyle aktive olan makrofajların antijene özgül fagositozu hızlanmaktadır. Tc lenfositlerinin hedef hücrelere bağlanmaları, antijene uygun oluşan reseptörler ve hedef hücrelerdeki MHC Sınıf I antijenlerine karşı taşıdıkları CD8 reseptörleri aracılığıyla olmaktadır. Bağlanmayı takiben hedef hücre erimektedir. Tc ve Tdh hücrelerinin direkt teması ile ve lenfokinlerin salgılanmasıyla hücrelerde erime olmaktadır. Hücre içi paraziti olabilen mikroorganizmalar, makrofajlar tarafından fagosit edildikten sonra yaşamaya devam edebilmektedirler. Böylece aktif özgül bir bağışık cevap gelişebildiği gibi aktive olan makrofajlar hücre içi infeksiyonu yapan diğer mikroorganizmalara karşı etkin kalmaktadır. Tüberküloza karşı tekrar uyarılan konak listeria infeksiyonlarına karşı da dirençli olmaktadır³¹.

Effektör Tc lenfositleri, hücreiçi paraziti olabilen tüberküloz, brusella, listeria gibi bakterilerin, bütün virusların, bazı mantar, protozoa ve helmintlerin infeksiyonlarına, tümör dokusuna ve doku transplantasyonunda grafta karşı hücrel bağışık cevap ürünleridir. Brusella, tularemi, salmonella basilleri ile *Treponema pallidum* gibi spiroketlerin; pox virusları, su çiçeği virusu, herpeks simpleks, Epstein Barr virus, Sitomegalo virus, kızamık, kızamıkçık gibi virusların; *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* ve *Candida albicans* gibi mantarların infeksiyonlarında hücrel bağışık cevap etkin rol oynamaktadır. Ayrıca protozoal infeksiyon etkenlerine karşı genellikle hücrel bağışık cevap çıkmaktadır. Deri leishmaniasisinde hücrel bağışık cevabın oluşması daha kuvvetlidir. Hücrel bağışık cevabın bozulduğu durumlarda *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii* infeksiyonlarına sıklıkla rastlanmaktadır. Lökositler IFN α ve fibroblastlar IFN β salgılamaktadır. Lenfokinlerin makrofajları aktive etmesi ve IFN α ile IFN β 'nın virusların hücre içine girmesini önlemesi hücrel bağışıklığı aktif tutmaktadır. İmmun sistemin aktivasyonunu sağlamak için bazı tümör olgularının immunoterapisinde BCG'den yararlanılmaktadır³¹.

Effektör Tc lenfositleri, hücrel geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonlarında da sorumlu hücrelerdir. Hücrel geç tip aşırıduyarlılık reaksiyonu ile hücrel bağışık cevap çoğu zaman birlikte oluşmaktadır. Tüberkülin (PPD) testi kişinin tüberküloz basiliyle temas edip etmediğini anlamak için uygulanan geç tip bir aşırı duyarlılık testidir³¹.

B.abortus'a karşı oluşan bağışık yanıt; antijene spesifik T hücre aktivasyonunu, CD4+ ve CD8+ T hücrelerini ve sıvısal yanıtı içerir. Bir

infeksiyon sırasında *B.abortus* esas olarak hücre ilişkilidir ve infekte hücreler ya bakteriyi öldürecek ya da kendileri ölecektir bu nedenle *B.abortus*'un ortamdan uzaklaştırılması için antikorlarla yürütülen başka mekanizmalara da ihtiyaç duyulur³⁴. Mikroorganizmanın yüzeyinde bulunan moleküler paternler ilk olarak ASH'yi sinyalleriyle uyaracak olan Toll like reseptörler tarafından tanınırlar. Toll like reseptörler ASH'yi uyarır ve bakterinin fagositozunu kolaylaştırırlar. Bu başlangıç reaksiyonlar, antijen ya da organizmaya spesifik değildir. NK hücreleri mikroorganizmalara karşı oluşan cevabın bu erken safhasında anahtar bir rol oynarlar. Hücre içine alınan bakteri öldürülür ve bakteriyel peptidler ASH ve bununla ilişkili olarak da MHC ClassI ve MHC ClassII moleküllerinin yüzeyinde eksprese edilmesiyle sonuçlanır. T hücreleri bu peptid-MHC komplekslerini spesifik reseptörleriyle tanırlar (CD4+ peptid-classII molekül kompleksini, CD8+ peptid classI kompleksini)³⁴. ASH'ler genellikle, optimal T aktivasyonu için gerekli olan iki sinyal hazırlar. Bunlardan biri TCR/MHC-peptid üzerinden aktarılır, diğeri ise kostimülator moleküller tarafından (ASH üzerinde B7.1/B7.2 ve T hücreleri üzerinde CD28) düzenlenir. Aktive T hücreleri aynı zamanda ASH hücreleri üzerinde bulunan CD40 ile T hücresinde bulunan CD40 reseptörü aracılığıyla ve ayrıca IFN- γ sekresyonu ile ASH'leri aktive eder³⁴.

CD4+ T hücrelerinin aktivasyonu, bu hücrelerin efektör hücrelere ve hafıza hücrelerine dönüşümünü ile sonuçlanabilir. Sitokin sekresyonları ise bu T hücreler aracılığıyla olur. Th1 hücreleri; IL-2 ve IFN- γ , Th2 hücreleri ise IL-4 ve IL-5 salgılar. Sunulan antijenin özelliğine bağlı olarak bu hücrelerden Th1 mi yoksa Th2'nin mi daha baskın olacağı belirlenir. CD4+ hücrelerden salgılanan sitokinler CD8+ hücrelerin ve B hücrelerinin efektör hücrelere; sitotoksik T

hücreleri ve antikor oluşturan hücelere değişimine yardımcı olur. Bununla birlikte B hücreleri T hücrelerinin yüzeyinde bulunan CD40 reseptörü ile uyarılırlar. CD40 reseptör uyarımı ve sitokinler birlikte IgM antikorlarının diğer Ig sınıfı moleküllere ve IgG subclass'larına dönüşümünde olayı başlatmak açısından önemlidirler. Bazı IgG subtiplerinin; örneğin farelerde IgG2a'nın ve insanlarda IgG3'ün, hücre içi bakterilere cevapta sıvısal olarak düzenlenmesi tercih edilir. Çünkü bu antikorlar diğer izotiplerden farklı olarak, infekte hücrenin yüzeyinde bulunan mikrobiyal antijenleri daha kolay tanırlar. Bu özellik, bu tip antikorların menteşe bölgesinin daha uzun ve daha esnek olmasından kaynaklanıyor olabilir³⁴.

CD4+ T hücrelerindeki benzer olarak CD8+ T hücreleri de kendi salgıladıkları sitokinler ile T sitotoksik tip 1(Tc1) ve Tc2 hücrelerine farklılaşırlar. Bununla birlikte, CD8+ T hücre cevabı içinde Tc1'e dönüşüm yolu daha baskındır (IL-4 sentezine karşın IFN- γ salgılayan hücreler). Tc1 efektör hücreleri sitokin salgılayarak (IFN- γ) hedef hücreyi öldürür. Hedef hücreler sitotoksik T hücreleri (CTLs) tarafından antijene özgül MHC class I ile sınırlanan bir mekanizmayla düzenlenir ve perforin ve granzyme ile öldürülürler³⁴.

B.abortus infeksiyonlarının da dahil olduğu birçok infeksiyonda, ASHs, NK, T ve B hücrelerinin birlikte rol oynadığı koordine bir cevap şeklide bağışık sistemin değişik kısımları rol oynar³⁴.

B. Sıvısal Bağışık Yanıt

a. B Hücreleri

Farelerde yapılan bir deneyde, *B.abortus*'un, atimik, neonatal ve CBA/n farelerinde trinitrofenil ile konjuge edildiğinde, T hücrelerine bağımsız tip-1 (TI-1) gibi davrandığı ve anti-trinitrofenil antikorlarının oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir. Atimik farelerde T hücreleri yoktur bununla birlikte neonatal ve CBA/n fareleri ise TI-2 olarak adlandırılan polisakkarit Ag cevabından yoksundur³⁴.

T hücre yokluğunda, *B.abortus*'un antikor oluşturması, *B.abortus*'un HIV-1 ile infekte olan CD4+ T hücrelerinden yoksun bireylerde antikor cevabı oluşturması olasılığını artırmaktadır. Bu olasılığı test etmek amacıyla CD4+ T hücrelerinden yoksun farelerde ya da MHC Sınıf II'den yoksun farelerde çalışmalar yapılmıştır. Her iki koşulda da HIV-1 peptid ile konjuge *B.abortus* esas olarak IgG₂a ağırlıklı olan ve HIV-1'i nötralize etme yeteneğinde olan antikor oluşumuna neden olmuştur³⁴.

Antikorların hastalığın nükslerine karşı korumada rol oynadığı görülmekteyse de, brusellozun bakterisidal fazı hücresel bağışıklığın başlamasıyla birlikte ortaya çıkar. Aynı zamanda spesifik bağışık cevabın oluşmasıyla, bölgede bulunan makrofajlar proliferer olur; diğer makrofajlar dolaşımdaki kan monositlerinden sağlanır. Enfeksiyonun kontrolü, spesifik olarak bulunan ve lenfokin salgılayan T lenfositlerine bağlıdır. T lenfositleri, makrofajların bakterisidal mekanizmasını da aktive eder. Hücresel bağışıklığın gelişmesiyle,

gecikmiş tip aşırı duyarlılık brusellaların protein antijenleri ile gösterilebilir. Gecikmiş tip aşırı duyarlılığın organizmanın yayılımını sınırlayan doku granulomlarının oluşmasında önemli olduğuna inanılmaktadır¹⁸.

Brusellozdaki sıvısal antikor yanıtı başlangıçta, IgM antikorlarında bir artışla karakterizedir. Bu durumu 7-14 gün sonra, IgG antikor sentezine değişim takip eder. Her iki immunglobulin de daha sonra artar, ancak genellikle artan kısım IgG dir. İyileşme sırasında IgG antikor titreleri aylar boyunca düşer. Öte yandan IgM antikorları enfeksiyondan yıllar sonra da düşük düzeylerde serumda kalabilir. Diğer enfeksiyonlardan farklı olarak IgG antikorlarının bulunmaya devam etmesi veya IgG titresindeki ikinci artış genellikle inatçı bir enfeksiyonu veya relapsı gösterir¹⁸.

Anti-brusella antikorlarının tayin edilmesinde kullanılan birçok hassas yöntem (immunfluoresans (IF), Enzimle işaretli immunosorbant yöntemi (ELISA), nefelometrik yöntemler) bulunmaktadır. Bu yöntemlerin yüksek hassasiyeti sayesinde erken tanı veya retrospektif çalışmalar mümkün olmaktadır ve bu da epidemiyolojik çalışmalara yardımcı olmaktadır. Bu tip indirekt primer bağlanma yöntemlerinin bir diğer avantajı; brusella izotiplerinin identifikasyonuna olanak sağlaması ve klinik ile korelasyonlarının anlaşılabilmesine yardımcı olmasıdır³⁰.

IgM, IgG antikorları ile birlikte ya da ayrı ayrı da bulunabilir. Buna ek olarak, klinik tabloyla korele olmasa da yüksek ya da düşük miktarda bağışık yanıt da tesbit edilebilir³⁰.

IgA ve IgE ya da IgG alt sınıfları gibi diğer izotiplerle de ilgilenilebilmektedir: IgA tipi antikorlar 1966 yılında brucellozlu hastaların

serumunda tespit edilmiş ve aglütinasyon reaksiyonlarında bloke edici antikor olarak davranabileceği tespit edilmiştir. Bununla birlikte yapılan bir çalışmada aglütinasyon ve koruma özelliklerine sahip monoklonal anti-brusella IgA tespit edilmiştir³⁰.

IgE antikorları da insan anti-brusella sıvısal yanıtının bir parçasıdır: yapılan bir çalışmada IF ve RIA teknikleriyle akut brucellozlu olguların %76'sında IgE antikorları tespit edilmiştir. IgE Ab'ları; IgM'den sonra ve IgG'den önce meydana gelmektedir³⁰.

Laboratuvar Tanı

A. Bakteriyolojik Tanı

Tüm infeksiyon hastalıklarında olduğu gibi brucellozda da etkene yönelik tanıda bakteri izolasyonu önemli bir seçenektir⁸. Brusellalar kandan, kemik iliğinden veya diğer dokulardan izole edildiğinde kesin tanı konmuş olur yani kültür tanı için altın standarttır^{18,37,38}. Ancak bununla birlikte kan kültürü yönteminin hassasiyeti %15-70 arasında değişen oldukça düşük bir orandır³⁸. Aynı zamanda uzun bir inkübasyon dönemi gerektirdiğinden laboratuvar çalışmaları için infeksiyon riski de oldukça yüksektir³⁸.

Etken kan ve kemik iliği dışında lenf nodülü, dalak ve karaciğer materyalinden, beyin omurilik sıvısından (BOS), genital salgılardan, süttten ve irinden üretilebilir^{8,18}. Ancak kültür ile her zaman sonuca ulaşamaz. Örneğin kan kültürlerinde izolasyon şansı her zaman olmamaktadır. Buna neden olarak

hastanın antibiyotik kullanması, kandaki bakteri sayısının düşük olması gibi faktörler gösterilebilir⁸. Genel kanı, bruselloz düşünülen olgularda kan kültürü negatif kalmışsa kemik iliği kültürü yapılmasıdır⁸.

Kan kültüründe dikkat edilmesi gereken önemli noktalar:

1. Kan kültürü ekimleri 50-100ml sıvı besiyerlerine kan/besiyeri oranı 1/10 olacak şekilde 5-10ml kan eklenerek yapılmalıdır²⁰.
2. Ateşin yüksek olduğu dönemde izolasyon sıklığı fazla ise de bunun dışında da sonuç alınabilir⁸.
3. Kan; antikoagülanlı besiyerlerine, hasta başında alınmalıdır⁸.
4. Castaneda yöntemi en başarılı yöntem olup, kullanılacak besiyerinin agarlı katı şekli yatık olarak, 20-30ml aynı besiyerinin sıvı şeklini bulunduracak biçimde bifazik olarak hazırlanır. Kan ekimi sıvı kısma yapılır. 2-3 günde bir eğmek suretiyle katı besiyerinin yüzeyine bulaştırılıp yine dik duruma getirilerek 37°C'de bekletilerek koloni oluşturmaya beklenir^{8,20}. Sıvı besiyerlerine yapılan ekimlerde ise dördüncü günden başlayarak besiyerleri 2-3 günde bir kontrol edilir. Asepsiye dikkat edilerek pipet ile alınan 0.2ml kültür ekiminden brusella agar plak besiyerlerine damlatma ekimi yapılır ve koloni oluşumu gözlenir²⁰.
5. Bactec ile radyometrik saptama, Du Pont İzolatör gibi hızlı izolasyon yöntemleri de kullanılmaktadır¹⁸.

BOS ekimi de kan kültürü gibi yapılır. Başka bakterilerin de bulunduğu bilinen irin ve diğer salgıların ekimleri için içerisinde antibiyotik ve diğer inhibitör maddeler bulunan plak besiyerlerine yüzeye, eküvyonla ekim yapılır. Lenf bezi ya da diğer biyopsi materyalleri iyice parçalanarak ya da steril

havanda az miktarda tuzlu su ve steril kum ile ezildikten sonra üstteki sıvıdan alınıp plak yüzeyine bolca sürülerek ekim yapılır²⁰.

Joshi ve ark.larının 2005 yılında yayınladıkları bir çalışmada kan kültürü ile tanının oldukça zaman aldığı vurgulanmıştır. Bu araştırmacılar, brusella sıvı besiyeri kültürlerinden beyin-kalp infüzyon agara dört günde bir pasaj yapmış ve aynı zamanda sıvı besiyerinden aldıkları ikişer smear örneği ile hazırladıkları preperatları da modifiye soğuk-ZN boyama yöntemi ile boyamışlar ve mavi zemin üzerinde kırmızı asit-fast kokobasil varlığını pozitif olarak değerlendirmişlerdir. Sonuçta modifiye soğuk-ZN boyama yöntemi ile kültür sonuçları arasında %100 uyum olduğunu tespit etmişlerdir. Bu yöntemle kültür sonucu pozitif olan olgularda, 4. günde brusella varlığını tespit etmişler ve kolay uygulanabilmesi ve zaman kazandırması açısından bu yöntemin tanıda kullanılabilir olduğunu vurgulamışlardır³⁷.

Tanıda kullanılan başlıca besiyerleri katı ve sıvı besiyerleridir. Sıvı besiyerleri daha çok kan ve BOS gibi materyallerin ekiminde kullanılır. Bunun dışındaki örneklerin ekiminde ve sıvı besiyerlerindeki üremeden sonraki pasajlarda katı besiyerleri kullanılmalıdır^{8,18}. Seçici besiyerleri; içlerine basitrasın, polimiksin B, siklohekzimit ve etil viyole gibi maddeler katılarak diğer bakterilerin üremesinin engellendiği besiyerleridir¹⁸. Besiyeri olarak; serumlu dekstrozu agar, gliserolu dekstrozu agar, patates agar, triptoz agar, triptikaz soy agar, brusella K vitaminli agar ve brusella agar kullanılabilir^{8,18}. Nemli ortam brusellaların değişimini hızlandırdığından (S-R) katı besiyerlerini kullanırken iyice kurutulmuş olmasına özen gösterilmelidir^{8,20}.

Ekimler çift yapılarak birisi normal atmosfer koşullarında diğeri %5-10 CO₂'li atmosferde üretilmelidir. İlk izolasyonlarında bakteriler yavaş ürediklerinden 30 gün bekletilmeden kültürler olumsuz diye atılmamalıdır. Bu esnada plakların kurumaması için önlem alınmalı, etüvün nemi kontrol edilmeli, gerekirse plaklar polietilen torbalarda kapakları alta gelecek şekilde tutulmalıdır^{8,20}.

Brusellalar izole edildikten sonra kolonilerden Gram preperatı hazırlanır ve katı besiyerlerine saf kültür ekimleri yapılır. İdendifikasyon için saf kültürden aşağıdaki incelemelerin yapılması uygundur.

1. H₂S üretimi: Bir yatık besiyerine ekim yapılır. Tüp tıkacının arasına tüp içine sarkacak gibi kurşun asetatlı kağıt şerit sarkıtılır. Her gün kağıdın oluşan H₂S etkisi ile siyahlaşıp siyahlaşmadığı incelenir. Siyahlaşmış ise kağıt bir yenisi ile değiştirilir ve kültür tekrar inkübe edilir. Bu şekilde bakterilerin kaç gün H₂S yaptıkları saptanır²⁰.

2. Boya inhibisyon deneyi: Amaç tiyonin ve fuksin gibi boyaların çeşitli konsantrasyonlarını içeren besiyerlerinde brusellaların üreyebilme özelliklerinin araştırılarak tür ayırımı yapılabilmesidir. İstenilen konsantrasyonlarda hazırlanan tiyonin ve fuksin çözeltileri 48°C'ye soğutulmuş brusella agar besiyerine eklenip plaklara dökülür. Denenecek kolonilerden bu plaklara çizgi ekim yapılır²⁰.

3. Üreaz deneyi: Crystensen üre agar besiyerinin yüzeyine saf kültürlerden çizgi ekim yapılarak araştırılır. *B.suis* 15-20 dakikada, *B.abortus* 2 saatten sonra üreaz etkinliği göstererek besiyerinin rengini kırmızıya döndürür. *B.melitensis* olumsuz sonuç verir²⁰.

B. Serolojik Tanı

Brusellozda bakteriyi üretmek için uzun süre inkübe etmek gerektiğinden ve bu süre içinde hasta kanında antikorlar oluştuğundan serolojik reaksiyonlarla hastalığın tanısı konabilir⁸.

Brusellozun serolojik tanısında Rose Bengal Testi (RBT), Wright Agglütinasyon Testi (WAT), ayrıca blokan antikorların gösterilmesi için Coombs testi ve IgG ve IgM antikorlarının ayırt edilmesini sağlayan 2-merkaptotanol testinin yanısıra Radioimmunosorbant yöntemi, IF ve ELISA kullanılmaktadır⁸.

RBT, Rose Bengal ile boyanmış %8 *B.abortus* 99S süspansiyonunun antijen olarak kullanıldığı bir lam agglütinasyon testidir. Ayrıca boya olarak, kristal viyole ve brillant yeşilinin kullanıldığı lam agglütinasyon testleri de bulunmaktadır³⁹. RBT'inde temiz ve üzerinde yaklaşık 1.5 cm çapında yayvan çukurlar bulunan plastik plaklar veya temiz beyaz fayans kullanılabilir. Plak çukurlarından birine ya da fayans üzerine bir damla hasta serumu damlatılır. Buzdolabından çıkarıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletilen antijen, iyice karıştırıldıktan sonra, serumun üzerine 1 damla damlatılır. Bir kürdan ile iyice karıştırıldıktan sonra rotatorda veya elde 4 dakika çevrilir. Sonuçta iri tanecikli çökeltiler ortaya çıkması testin olumlu olduğunu gösterir²⁰. Tam kan kullanılarak yapılan lam agglütinasyon testine SPOT test denir. Özellikle kitle taramalarında, özel yöntemlerle boyanmış yoğun brusella bakteri süspansiyonundan hazırlanmış antijenin bir damlası üzerine parmak ucundan alınan bir damla kan damlatıldığında agglütinasyon görülmesi esasına dayanır⁸.

WAT'inde, antijen olarak *B.abortus*'un S kültürlerinin ısıyla öldürülmüş fenollü süspansiyonları kullanılarak sulandırılmış hasta serumunda brucella antikorlarının varlığı kantitatif olarak araştırılır³⁹. Bruselloz tanısı için titrenin 1:100'den fazla olması ve bir iki hafta sonra titrenin belirgin yükselmesi değer taşır²⁰ bu nedenle WAT ile 1/160 ve üzerindeki titreler anlamlı kabul edilmektedir^{8,25,39}. WAT, bakterinin yüzeyinde veya yüzeyine yakın olarak bulunan antijenlerle (özellikle s-lipopolisakkarit ile) reaksiyona giren aglütine edici antikorların toplam miktarını ölçer¹⁸. Bu antijen *B.melitensis*, *B.abortus* ve *B.suis*'e karşı oluşan antikorlar tarafından aglütine edilir³⁹. Bazı laboratuvarlarda eleme testi olarak önce RBT kullanılır. Eğer bu test pozitif ise WAT yapılır⁸.

2-Merkaptoetanol testi, immunglobulin tiplerini ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, IgM pentamerinin disülfid bağlarının indirgenmesi esasına dayanır. Serum 0.05 M 2-merkaptoetanol veya ditiyoretiyol gibi kimyasal ajanlarla muamele ettikten sonra IgM antikorlarının disülfid bağları parçalanacağından yalnızca IgG molekülü saptanır³⁹. Bu ayırım, IgG antikorlarının IgM antikorlarına göre aktif enfeksiyonun daha iyi bir göstergesi olması bakımından önemlidir¹⁸. Yapılışı açısından WAT'inden tek farkı serumun sulandırımı için serum fizyolojik yerine 0.05M 2-merkaptoetanollü tuzlu suyun (1 kısım 2-merkaptoetanol, 3 kısım tuzlu su) kullanılmasıdır²⁰.

Klinik olarak brucelloz belirtileri belirgin olduğu halde yapılan aglütinasyon deneylerinin olumsuz sonuç vermesi brucellozda sık rastlanan bir durumdur. Olay, antikorların antijenlere bağlandıkları halde aglütinasyon reaksiyonu oluşturmamasını engelleyen mekanizmanın (blokan antikorların) var olmasından kaynaklanmaktadır^{8,20}. Blokan antikorlar Coombs serumu (anti-insan

globulini) kullanılarak ortaya çıkarılırlar⁸. WAT yapıldıktan sonra aglütinasyon vermeyen tüm tüpler santrifüjlenerek bakteriler çöktürülür. Üstteki sıvı dökülüp her tüpe yeniden serum fizyolojik konur. Tüpler yeniden santrifüjlenir. Aynı işlem 3 kez tekrarlanarak bakteriler yıkanır. Coombs serumu tuzlu su ile 10 kat sulandırılır. Bu sulandırmadan her tüpe 0.05ml eklenip karıştırılır. Coombs serumu tüplere eklendiği zaman tüpteki 0.45ml süspansiyon ile karışarak 1:10 oranında sulanmaktadır. Bu nedenle üzerinde yazılı sulandırım titresinden 10 kat daha yoğun sulandırımından 0.05ml eklenmelidir. 37°C’de 24 saat bekletildikten sonra aglütinasyon okunur²⁰.

Allerjik tanı için, bakterilerden elde edilmiş ve saflaştırılmış “Brusellergen” (nükleoprotein kompleksi) deri içine enjekte edilir. 24 saat içinde kızartı, ödem ve sertlik şeklinde görülen reaksiyon pozitif olarak kabul edilir. Bu kişilerin brusellaya karşı aşırı duyarlı oldukları anlaşılır. Deri testi brusellaların öldürülmüş kültürleri veya 21 günlük kültür süzüntüleri (Mellitin-Abortin) ile de yapılır.

Brusella infeksiyonlarının serolojik tanısında opsonositofajik testten de faydalanılır. Bu test, hasta serumundaki, fagositozu kolaylaştıran ve opsonin adı verilen antikorların ortaya çıkarılması için kullanılan bir testtir. Tanı; hasta serumu lökosit ve bakteri süspansiyonunun birbirleriyle karıştırılmasından sonra 15 dakika, 37°C’de inkübe edilmesi ve giemsa ile boyanan preparatın incelenmesi ile konur. Bir lökosit tarafından fagosit edilen ortalama bakteri sayısı fagositik indeksi verir. Bu sayı 6-10 veya daha fazlaysa test pozitifdir⁸.

Hücre sel bağışıklıkta yer alan “delayed tip reaksiyonlar” (DTR) da, melitinin intradermal enjeksiyonu ile, brusella infeksiyonunun tanısında

kullanılmaktadır. Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalar, makrofajların ve T hücrelerinin bruselloza karşı oluşan hücresel bağışık yanıtta oldukça önemli olduğunu vurgulamaktadır. Standart olmayan antijenlerle intradermal enjeksiyon, insanlarda kullanılan bir yöntemdir. Bu nedenle ileri çalışmalarla intradermal enjeksiyon için seçilen bu antijenlerin denenmesi üzerine çalışmalar mevcuttur³⁰.

INRA brusellin: Sitoplazmik fraksiyonları içerir. Deney hayvanlarında denenmiş ve güvenilir sonuçlar elde edilmiştir. İnsan uygulaması henüz hazır değildir³⁰.

PS (Fenolde çözünebilen) fraksiyonu (Merieux): Roumiantzeff tarafından çalışılmıştır ve fenolde çözünen ekstraktların filtrasyonu esasına dayanır. Yalnızca protein içerir, LPS ya da PG içermez. Bertrand'ın gösterdiğine göre melitin ve PS reaksiyonu arasında iyi bir korelasyon vardır³⁰.

İn-vitro testler: Lenfosit transformasyonu ve proliferasyon testleri (TTL) ya da lökosit inhibisyon migrasyon testlerini (TIML) de içeren in-vitro testlerle brusellaya karşı insan DTH (Delayed type reaksiyon)'si tanımlanmıştır. Deney koşulları, antijen fraksiyonunun dozu ve periferik kan lenfositlerinin sayısı testin özgüllüğü açısından önemlidir. 10µg PI (Fenolde çözünemeyen) ya da 1µg SF gibi düşük dozlarla infekte insanların lenfositleri uyarılmaktadır. Bu nedenle bu test brusellozun tanısı ve takibi için uygulanabilir niteliktedir. Bu koşullar altında diğer iki testle korele olarak, erken ve akut brusellozda TTL (Transformasyon ve proliferasyon testleri) ve IDR (Intradermal enjeksiyon) genellikle negatif ya da zayıf pozitifdir. 2 aydan 6 aya kadar geçen sürede sonuçlar miktar olarak artmakta ancak 6 aydan sonra düşmektedir. Bununla birlikte bu genel paterne uymayan bir çok olgu vardır: negatif sonuçlar, antikor seviyesi

ve/veya immun kompleks oluşumuna göre değerlendirilebilir. Böylece Brusella endokarditi olan tüm olgularda antikor ve immun kompleks oldukça yüksek ve TTL ve IDR negatiftir denilebilir³⁰.

Subakut ve fokalize brucellozda, 6 ay kadar süren uzun süreli bir TTL negatifliği gözlenebilir. Ancak, uzun süreli brucelloz hastalarında kronik ya da non-fokalize olduğu farketmeksizin TTL ya da IDR testleri pozitifdir. Sonuç olarak, antijenlerle uygulanan in-vitro testler ID reaksiyonları ile korele olsa da non-fokalize kronik brucellozu tespit etmek açısından in-vivo testlerden daha başarılı değildir³⁰.

C. Moleküler Tanı

Son yıllarda brucellozun hızlı tanısında kemik iliği aspirasyonu ve periferik kan örnekleri ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) çalışmalarının olumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir⁸. PZR, birçok mikroorganizmanın DNA'sının varlığının saptanmasında kullanılan bir yöntemdir. Brusella tanısında da değişik gen hedefleri, primer çiftleri, PZR teknikleri ve ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak brusellanın varlığı tespit edilebilmektedir. PZR, geleneksel tanı yöntemleriyle kıyaslandığında daha hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bununla birlikte Brusella-PZR için hassasiyet ve özgüllükler farklı laboratuvarlar arasında değişiklik göstermektedir ve henüz; örnek hazırlama, hedef genler ya da tespit yöntemleri ile ilgili bir standardizasyon getirilememiştir³⁸. Moleküler tekniklerin uygulanması, Brusella cinsinin % 95'in üzerinde DNA homolojisi gösterdiğini ve monospesifik olduğunu göstermektedir¹⁵. İnsanlarda nadiren

enfeksiyon etkeni olarak bildirilen *Ochrobactrum anthropi*'nin rRNA sekanslamasında bruceella cinsi ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır ve bruceella cinsinin identifikasyonu için dizayn edilen PZR prosedürlerinde pozitif PZR'a neden olabileceği bildirilmiştir. Bruceella türlerinin identifikasyonu için PZR teknikleri geliştirilmektedir, ancak PZR bazlı testlerde en önemli sorunlardan biri bruceella cinsinin üyeleri arasında ayırım yapılamamasıdır^{12,40}.

PZR'da en çok kullanılan örnekler kan ve serum örnekleridir. Bunun dışında; doku, idrar, serebrospinal sıvı ve diğer vücut sıvıları da kullanılabilir³⁸.

Bruceellanın tür düzeyinde identifikasyonu tedaviyi etkilemeyeceğinden genusa özgül bir sekans tanı için yeterli olmaktadır³⁸.

PZR'a dayalı bruceella tanısı ile ilgili ilk çalışma 1990 yılında Fekete ve ark⁴¹.ları tarafından bildirilmiştir. Bu yöntemde *B.abortus* S19 suşunun 43kDa'luk dış membran proteinini kodlayan sekans amplifiye edilmiştir. 1992 yılında Herman ve ark⁴².larının yaptıkları bir başka çalışmada incelenen gen hedefi 16rRNA genidir. Özgüllüğün saptanması için bu yöntem 17 farklı non-bruceella bakteri ile de denenmiş, bruceella ile yakın akraba olan *O. anthropi* dışında hiçbir bakteride amplifikasyon gerçekleşmemiştir. Bailly ve ark.⁴³, *B.abortus*'un 31kDa proteinini kodlayan gen bölgesini kullanarak 1992 yılında yeni bir PZR protokolü geliştirmişler ancak bu gen *B.ovis*'de bulunmadığı için çalışmaya yalnızca *B.melitensis* ve *B.abortus* alınmıştır. Da Costa ve ark⁴⁴.ları, tüm bruceella türleri ve bruceella biovarları ile bu yöntemi tekrar araştırmışlardır. Bu araştırmacılar aynı zamanda 98 non-bruceella bakteriyi de çalışmaya almıştır. Çalışmanın

sonucunda yine *O.anthropi* dışında tüm non-brusella bakteriler negatif sonuç vermiştir.

Tedavi

Brusella bakterileri; tetrasiklin, rifampisin, fluorokinolonlar, 3.kuşak sefalosporinler, trimetoprim sulfometaksazol (TMP-SMZ), streptomisin ve diğer aminoglikozitlere duyarlı, penisilinlere dirençlidirler. Dünya Sağlık Örgütünün önerileri doğrultusunda insan brucellozu için rifampisin+doksisiklin kombinasyonu kullanılmaktadır^{45,46}.

Antibiyotikler brusella mikroorganizmalarına karşı etkilidir. Fakat hastalığın tedavisi güç olabilir. Brusella etkenleri hücre içinde bulunduklarından birden fazla antibiyotiğin uzun süre (en az 6 hafta) uygulanmasını gerektirir. Ayrıca bakterilerin vücutta nereye gizlendiklerinin bilinmemesi ve kemik iliği gibi yerlerde de infeksiyon oluşturmaları nedeniyle uzun süreli bir tedavi uygulanır. Kısa süreli tedavi infeksiyonun nüksetmesine neden olmaktadır. Tedaviye başlama zamanı ve hastalığın şiddetine bağlı olarak iyileşme birkaç hafta ile birkaç ay arasında değişebilir^{3,46}.

Brusellanın hücre içi lokalizasyonu, tedaviyi güçleştirmektedir. Bu nedenle, antibiyotiğin brusella ile infekte fagositlere geçişini sağlamak için etkili bir taşıyıcı olarak lipozomlar kullanılmaktadır. Lipozomlar, vücuda yabancı olduğu için makrofajlar ve monositler gibi mononükleer fagositik sistem hücrelerinde yakalanırlar ve böylece ilaç hücrelere girmiş olur⁴⁷. Lipozomlar, hücre membranı ile uyumlu taşıyıcılar oldukları ve konak için non-toksik

oldukları için, Brusellanın O-polisakkarit (OPS) ve lipopolisakkarit (LPS) antijenleri için aşı taşıyıcıları olarak da kullanılırlar⁶.

Epidemiyoloji

Bruselloz, dünyanın her yerinde rastlanan en yaygın zoonozlardan biri olarak kabul edilmektedir¹. Kuzey Avrupa, Kanada, Avustralya ve Yeni Zelanda da yıllar süren yoğun çabalarla brusellozis büyük ölçüde eradike edilmiştir. Buna karşın Akdeniz Bölgesi, Orta Doğu, Batı Asya'nın gelişmekte olan ülkelerinde, Afrika ve Latin Amerika'nın bir kısmında, insan ve hayvanlarda yaygınlığını sürdürmektedir¹.

Bruselloz, ülkemizde hem hayvanlarda hemde insanlarda ihbarı mecburi bir hastalıktır⁴⁸.

Sağlık Bakanlığı kayıtlarına göre yıllar itibariyle insanlarda tespit edilen vaka sayılarında belirgin bir artış görülmektedir (1970-1980: 937 vaka, 1981-1990: 17920 vaka, 1991-1998: 56349 vaka). Vaka sayısındaki bu artış teşhis imkanlarının daha iyileşmesi, hastalık bildirme oranının artması ve hastalıkla mücadeledeki yetersizliğe bağlı olabilir¹.

Ülkemizde, 1984 yılında, ülkesel bir kontrol ve eradikasyon projesi yürürlüğe konulmuştur. Projenin 26 yıl sürmesi planlanmıştır. Bu projeye göre Türkiye 5 bölgeye ayrılmış ve bu bölgelerden bütün 4-8 aylık dişi danalar *B.abortus* S-19 aşısı ile aşılanacak ve kulak küpesi takılarak kayıt altına alınacak ve bütün kuzu ve oğlaklar *B.melitensis* Rev-1 aşısı ile aşılanacaktır. 1989 yılında ülke çapında yapılan serolojik araştırma sonuçlarına göre, bölgelere göre değişen

%0-10 oranındaki hastalık prevelansı, sığırlarda %3.56 ve koyunlarda %1.26 olarak, 1990 yılında ise %1.2 ve %2.08, 1991 yılında yapılan ülke çapındaki son taramada ise %1.01 ve %1.83 olarak saptanmıştır. Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün isteği doğrultusunda 1996 yılında Türkiye çapında bir serolojik araştırma çalışması daha yapılmış ve bruselloz prevelansı sığır ve koyun populasyonları için sırasıyla %1.43 ve %1.97 olarak tespit edilmiştir¹.

İnsanlar arasında brusellozun belli bir bölgeye yayılması, o yöredeki hayvancılıkla yakından ilişkilidir. Bir ülkede hangi hayvan türü fazla ise insanlar arasında da o hayvan türü ile ilişkili bruselloz olguları daha fazladır⁸. 1982-1986 yılları arasında Türkiye'de bazı illerde yapılan bruselloz vakaları çalışmasında en fazla odağın, en fazla koyun ve keçi populasyonuna sahip olan Konya ilinde olduğu görülmüştür⁸.

İnsan vakalarının çoğu diğer aylara nazaran yaz aylarında daha belirgin olmaktadır. Akut infeksiyon genellikle bu aylarda görülmektedir. Bunun süt ve süt ürünlerinden ileri gelebileceği ve yaz aylarında kişilerin seyahat nedeniyle hijyen koşullarına uygun olmayan yiyecekleri satın almalarından kaynaklandığı düşünülmektedir⁸.

Organizma vücuda ya infekte süt ve süt ürünlerinin alınması veya doğrudan temasla deriden bulaşır^{13,25}. Deri yolu ile bulaşma daha çok veteriner hekimlerde, doğum sırasında infekte hayvanın vajinal sekresyonu, kan veya idrarına temas sonucunda görülür⁴⁹. Veteriner hekimlerde ayrıca hayvan aşılması sırasında kaza ile enjektörü kendine batırma durumunda canlı attenüe aşılar ile de bulaş gerçekleşebilmektedir^{49,50}. Bunların dışında araştırma sırasında laboratuvar bulaşları söz konusu olabilir. Brusellalar vücuda birçok yerden giriş

yolu bulabilirler. Kontamine parmaklar ile ya da laboratuvara yiyecek sokulması ile ağızdan bulaş olabileceği gibi bakteri içeren aerosollerin inhalasyonu ya da konjunktivanın bu aerosollerle kontaminasyonu yolu ile de vücuda girebilirler^{13,51,52}.

İnsandan insana bulaş nadirdir. Kan transfüzyonu ve organ transplantasyonu ile infekte donörden bulaş bildirilmiştir^{53,54}. Anneden bebeğe laktasyonla bulaşabildiği de düşünülmektedir⁵⁵. Seksüel ilişki bir başka olası bulaş yoludur⁵⁶. Transplasental bulaş ya da neonatal bulaş da söz konusudur⁵⁷.

Korunma

İnsanların brusellozdan korunması; doğrudan doğruya özellikle koyun, keçi, sığır ve domuz gibi evcil hayvanların kontrolü ve eradikasyonu ile ilgilidir⁵⁸. İnsan için etkili bir brusella aşısı yoktur^{49,59}.

A. Hayvanlarda Bruselloza Karşı Uygulanan Aşılar

a. S19 aşısı: *B.abortus* S19 suşu sığırların aşılmasında kullanılan kullanışlı bir aşıdır^{60,1}. Ancak insanlar için enfeksiyöz olması ve hayvanlarda düşüklere neden olabilmesi gibi bazı dezavantajları da vardır⁶⁰. Ayrıca bu suş virulan suş ile antijenik olarak benzer olduğu için RBT, kompleman fiksasyon gibi S-LPS'e karşı oluşan antikorları ölçen serolojik testler ikisini ayırt edemezler¹⁷. Bunun sonucunda da yapılan serolojik incelemelerde hayvanın hasta mı yoksa aşı ile korunmakta mı olduğu anlaşılamamaktadır⁶⁰. Bununla birlikte

B.abortus S19, *B.abortus* için kullanılan en popüler aşıdır ve subkutanöz tam doz olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir^{36,60}. Erişkin populasyon aşılandığında ortaya çıkabilecek olumsuzlukları önlemek amacıyla bu aşının hedef popülasyonu daha çok dişi buzağılardır^{10,36}.

b. REV1 aşısı: *B.melitensis* REV 1 suşu hayvan brusellozundan korunmada bugün kullanılan en etkili aşıdır¹⁰. REV 1 aşısı canlı attenüe bir aşıdır^{1,36}. Koyun ve keçilerin aşılınması için kullanılan aşı suşu olan *B.melitensis* Rev1 suşundan hazırlanır^{36,61}. İnsanlar için enfeksiyöz olması ve hayvanlarda düşüklere neden olabilmesi gibi bazı dezavantajları vardır⁵⁸. Bu suş, virulan *B.melitensis* suşlarının tersine penisiline hassas ve streptomisine dirençlidir⁶². 1957’de yapılan pilot çalışmadan bu yana tüm dünyada kullanılan bu aşı ile ilgili olarak *B.melitensis*’in kontrol altına alınması açısından çok iyi sonuçlar elde edilmiştir. Geniş kullanımı nedeniyle birçok üretici aşının ticari olarak piyasaya sürülmesi ile ilgilenmişlerdir. Üreticiler tarafından tohum stokları üretilmiş ancak aşının kalitesi düşmüştür. Sonuç olarak birçok ülkede aşının olumsuz etkileri görülmüş, örneğin Güney Afrika’da aşı, hayvan ve insan brusellozuna neden olmuştur. Buna benzer ancak daha az ciddi bir durumla da İsrail’de karşılaşmıştır. Bu sonuçlar, Orta Doğu ülkelerinde bölgesel bir programla FAO/WHO/OIE dan oluşan bir uzman komite ile aşı uygulanmasının sorgulanmasına neden olmuştur. Bu programa göre küçükbaş hayvanların her 2 yılda bir zayıflatılmış doz ile 10 yıllık bir period için aşılınmasına karar verilmiştir¹⁰.

c. RB51 aşısı: *B.abortus* RB51 suşu (SRB51), inek ve bizonların brusellozise karşı aşılmasında S19 suşuna alternatif olarak geliştirilmiştir⁶³. *B.abortus* RB51 suşunun sığırlarda mükemmel bir koruma sağladığı gösterilmiştir. Bu suş, normal suşların karakterizasyonunu sağlayan S-O halka antijenini içermediğinden anti-S-O halka antijenleri ile reaksiyon vermez ve aşılınmış ve aşılınmamış hayvanların serolojik tanısında ortaya çıkan problemi de çözmüş olur⁶⁴. *B.abortus* RB51, *B.abortus* 2308 suşunun rifampin ve penisilin içeren besiyerinde tekrarlanan in-vitro pasajlarıyla elde edilen R tipi koloni oluşturan bir mutantıdır^{60,64}. *B.melitensis*, *B.suis* ve *B.abortus* genomlarında *wboA* esas *wbk** O-PS genetik bölgesinin dış kısmında yer almaktadır⁶⁰. Bu nedenle RB51 çok az miktarda O-PS içerir. RB51 suşunun *wboA* geni ile tamamlanması sonucunda RB51 O-zinciri sentezleyebilir ancak S koloni oluşturamaz. Bu da başka LPS genlerinin de etkili olduğunu göstermektedir⁶⁰. İneklerde SRB51 ile düşüklerin görülmesi ender olmakla birlikte gebelik esnasında intravenöz olarak verilmesi SRB51 içeren plasental zarların ve sıvıların görülmesine neden olur. Yapılan bir çalışmada; SRB51 verilmiş köpeklerde orofarengeal lenf nodüllerinin oluşması ve karaciğer ve dalak infeksiyonu gelişmesi ile sonuçlanabileceğini göstermiştir. Ancak köpeklerde *B.canis* ya da *B. abortus* infeksiyonu sonucu en çok infekte olan bölgeler prostat bezleri ya da böbreklerde SRB51 bulunmamıştır. Gebe hayvanlarda SRB51'in oral inokülasyonu sonucu plasenta ve fetus infeksiyonu gözlenmiş ama düşüğe sebep olmamıştır⁶³.

d. S2 aşısı: Aşı suşu, *B.suis* S2, domuz fetüsünden izole edilmiştir⁹. Aşı ilk olarak Çin'de bulunduğu için bu ülkede geniş ölçüde kullanılmaktadır⁹. İlk

olarak Çin’de hayvanların içme suyuna katılarak koyun ve keçilerin aşılması için kullanılmıştır⁹. Ancak bu şekilde doz ayarlanması zor olduğu için aşının direkt oral inokülasyonu hazırlanmıştır¹⁰. 1980’li yıllarda aşı Çin dışında İspanya, Türkiye, Libya, İngiltere, Fransa, Almanya gibi birçok ülkede oral ve konjunktival olarak kullanılmaya başlanmıştır. Çin otörleri, S2 aşısının tüm önemli çiftlik hayvanlarını koruması bakımından tercih edilir olduğunu açıklamış ancak Dünya Sağlık Örgütü’nün yürüttüğü farelerle yapılan çalışmalarda Rev1, S19 ve S2 aşılarının kullanıldığı bir deneyde Rev1 aşısının en etkili olduğu bulunmuştur¹⁰.

e. WR201: *B. melitensis* 16M’nin purEK delesyon mutantıdır⁶⁵. purEK delesyonlu mutantlar yeterince attenüedir ve farelerde koruyucu bağışık yanıt oluşturduğu gösterilmiştir⁶⁵. Bununla birlikte Brusella, aynı zamanda bir biyolojik savaş ajanı olduğundan solunum yolu ile bulaşması da önemli bir tehdit oluşturabilir. Farelerin solunum sistemi ile yapılan bir hayvan deneyinde bakterinin dış membran lipopolisakkaritine (LPS) karşı gelişen antikorlar kullanılarak bakterinin mononükleer fagosit sistemi içinde yayılması önlenmiş ancak bakterinin infeksiyonun geliştiği primer bölgeden temizlenmesi artmamıştır⁶⁶. Bunun aksine, *B.melitensis* suşundan hazırlanan pürin oksotrofik canlı attenüe aşı olan WR201 ile immünize edildiğinde hem yayılmanın engellendiği hem de akciğerden bakterinin temizlenmesinin arttığı görülmüştür. İnsan dışı primatlarda, WR201 ana suşa bağlı kalınarak attenüe edilmiştir. WR201 ile immunizasyon, anti-LPS antikorlarının oluşmasına ve Brusella antijenine karşı bir cevap olarak oluşan Th1 sitokinlerini salgılayan mononükleer kan hücrelerinin

sayısının artmasına yol açmaktadır. Bu şekilde immünize edilmiş maymunlar, virulan Brusella ile aerosol saldırısına karşı tam olarak korunmaktadır⁶⁶.

Canlı attenüe aşilar olan *B.abortus* RB51 ve 19 (ABD’de), *B.abortus* 82, 82pn ve 75/79 (Rusya’da) hayvanlarda Brusellozisi önlemek için bugün kullanılan aşılardır⁶⁷. Bruselloz hastalığına karşı; ‘Türkiye’de Sığır ve Koyunlarda Brusellozisin Sero-Epidemiyolojisi’ proje sonuçlarına göre sığırlarda prevalansı % 1 ve daha yukarı olan illerde 4-8 aylık dişi danaların tümüne genç S-19 aşısı, koyunlarda prevalansı % 1 ve daha yukarı olan illerde 3-8 aylık dişi - erkek kuzu ve oğlakların tümüne tam doz Genç Rev-1 aşısı uygulanmaktadır¹.

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)

Elektroforetik yöntemler prensipte kromatografik yöntemlere benzerlik gösterir. Elektroforezde durgun fazı, örneğin üzerine uygulandığı kağıt ya da sentetik jeller oluşturur. Hareketli faz ise elektrik akımıdır. Elektrik akımı, elektrolit bir tampon çözelti yardımıyla uygulanır. Seçilen pH değerine göre aynı özellikteki biyomoleküllerin iyonizasyonu benzer olacağından yürüme yalnız bir kutba doğru oluşur. Böylece ayrışma molekül büyüklüğü ve üç boyutlu yapıya göredir. Yürümeyi yük/kütle oranı doğrudan etkiler. Küçük moleküller önde büyükler ise geride olacak şekilde sıralama oluşur. Elektroforez yöntemleri matriksin tipine ve uygulama pH’sına göre çeşitlilik gösterir.

Poliakrilamid jel elektroforezinde jel sentetik bir madde olan akrilamid ile akrilamid türevi olan N-N’-metilen bisakrilamidin polimerleşmesiyle oluşturulur ve örnekler bu jel üzerinde yürütülür. Proteinler için çok uygun olduğu gibi DNA

ve RNA elektroforezleri için de kullanılabilir. Akrilamid miktarı ve akrilamid/bisakrilamid oranı jelin ayırıştırma kapasitesini belirler. Oran yükseldikçe jelde ısınma fazlaşır, kırılabilirlik artar, daha kolay yıkanır.

Tablo 2. PAGE sisteminde uygulama sınırları (proteinler için)

Jel yüzdesi	Ayırıştırma kapasitesi (dalton)
%5	60000-212000
%10	18000-75000
%15	15000-45000

Polimerleşme reaksiyonunda akrilamid molekülleri yanyana bağlanarak düz zincirler oluştururlar. Bisakrilamid molekülleri ise iki akrilamid zinciri arasında çapraz bağlanmalar oluşturur. Böylece ağimsi bir yapı meydana gelir. Polimerleşme derecesi; sıcaklık, pH, amonyum per sülfat (APS) ve N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED) miktarına göre farklılık gösterir. Polimerleşme için serbest radikal oluşumuna sebep olan APS reaksiyon başlatıcı, TEMED ise katalizör olarak rol oynar.

2 tip poliakrilamid jel elektroforezi vardır:

1. SDS-PAGE (denatüre edici PAGE)
2. ND-PAGE (non-denatüre edici PAGE)

ND-PAGE: Proteinlerin doğal yapılarını bozucu ajanlar kullanmadan yapılan PAGE yöntemidir. Saflık derecesinin tayini için kullanıldığı gibi direk olarak saflaştırma işlemi olarak da kullanılabilir.

Sodyum dodesil sülfat (SDS)-PAGE: SDS anyonik bir deterjan olup iki aminoasitte bir peptid zincirine bağlanarak protein moleküllerini oluşturan alt birimleri birbirinden ayırır. Ayrıca negatif yük taşıdığından peptidlere de yüksek oranda negatif yük kazandırır. Böylece elektrik yükü açısından karışım içerisindeki bütün protein molekülleri eşit duruma getirilir. Jel konsantrasyonu artırılarak protein moleküllerinin molekül ağırlıklarına göre ayrışmaları sağlanır. SDS-PAGE yöntemi proteinlerin saflığının kontrolü, molekül ağırlıklarının saptanması ve konsantrasyon çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır⁶⁸.

Poliakrilamid jel, akrilamid monomerinin serbest fonksiyonel gruplarıyla reaksiyona giren N,N'-metilen bisakrilamid gibi bifonksiyonel bileşikler aracılığıyla karşılıklı bağlanarak polimerize olmasıyla şekillenir.

Akrilamidin polimerizasyonu, amonyum persülfat ilavesiyle başlatılmaktadır. TEMED' in ilavesiyle polimerizasyon oluşumu hızlandırılmaktadır. Amonyum persülfat-TEMED sisteminde TEMED, persülfattan serbest radikallerin oluşumunu katalize eder ve oluşan serbest radikalleri polimerizasyonu başlatmaya yöneltmektedir. TEMED ya da amonyum persülfat konsantrasyonundaki artışlar polimerizasyonu hızlandırmaktadır. Oksijen polimerizasyonu inhibe ettiği için jeller dökülmeden önce degaze edilmektedir.

Poliakrilamid jellerdeki por boyutu, total akrilamid konsantrasyonuna bağlıdır (% 3.5-20). Düşük akrilamid konsantrasyonu büyük porlu, yüksek akrilamid konsantrasyonu küçük porlu jelleri oluşturmaktadır. Porlaşma, polimerizasyon zincirinin uzunluğu ve karşılıklı bağlanma derecesiyle

belirlenmektedir. Karşılıklı bağlanmanın bir molü akrilamidin 29 monomerini içerir.

Poliakrilamid jellerde çok yaygın olarak kullanılan çözücü ajan iyonik bir deterjan olan SDS' dir. Protein karışımı, SDS ve 2-β-merkaptoetanol varlığında ısıtıldığında proteinlerin disülfid bağları kırılarak denatüre edilirler. Bu şartlar altında, bir çok polipeptid ağırlığına göre SDS' i bağlar (Proteinin her gramı 1.4 g SDS bağlar). İndirgeyici ajanların varlığında proteinlere SDS' in bağlanmasının iki önemi vardır. Birincisi proteinin nativ yükünün tamamen yok olmasıdır. Böylece yük/kütle oranı tüm proteinler için sabitlenir. İkinci olarak, negatif yüklü SDS molekülleri arasında elektrostatik geri itme, hem intramoleküler hem de intermoleküler kovalent olmayan tüm protein-protein ilişkilerini bozar. Böylece SDS' in proteine sabit bir yük/kütle oranına sahip değişmez bir yapı kazandırdığı varsayılabilir. Bunun sonucunda SDS-polipeptid komplekslerinin yük dansiteleri aynı olmakta ve polipeptid boyutuna göre poliakrilamid jelde göç etmektedirler.

Proteinler, küçük porlu ayrıştırıcı jelde elektroforezde ayrılmadan önce büyük porlu yığıcı jel boyunca göç sırasında depolanır ve sıkılaştırılırlar. Yığıcı jelde stoklanmış proteinler, rezolving jeldeki moleküler elek etkisine bağlı olarak, iç yük ve polipeptid boyutlarına göre ayrılırlar⁶⁸.

İnce Tabaka Kromatografisi [Thin Layer Chromatography (TLC)]

Kromatografi iki yada daha fazla bileşik içeren karışımların ayırımında yaygın olarak kullanılan bir metottur. Ayırım, karışımın, biri sabit diğeri hareketli olan iki faz arasında dağılımıyla sağlanır. Kromatografi, farklı

bileşiklerin dağılacakları iki faz arasında farklı çözünürlüğe sahip olmaları prensibine dayanır.

İnce tabaka kromatografisi organik bileşiklerin ayrıştırılması için kullanılan kromatografik bir tekniktir ve basit ve hızlı oluşu nedeniyle maddelerin saflığının kontrolü amacıyla sıklıkla kullanılan bir yöntemdir⁶⁹. Plastik, cam ya da metalden oluşan bir durgun faz (SP) ve bir çözücünden oluşan hareketli fazdan (MB) ibarettir. Örnekler sabit faz üzerine noktalar şeklinde koyulduktan sonra hareketli faza batırılır. Çözücünün kapiller hareketi ile komponentler de taşınırlar. Komponentler durgun fazla olan ilişkilerinin kuvvetine göre hızlı ya da yavaş hareket eder. Bir komponentin durgun fazla ilişkisi ne kadar az ise çözücüde o kadar güçlü çözünür ve o kadar hızlı hareket eder⁷⁰. İnce tabaka kromatografisi biri katı (sabit faz) ve diğeri sıvı (hareketli faz) olan iki faz içeren bir sıvı-katı tekniğidir. Bu teknikte kullanılan en yaygın katılar silika jel ($\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$) ve alumina ($\text{Al}_2\text{O}_3 \times \text{H}_2\text{O}$) dır. Bu adsorbentlerin her ikisinde polar olmalarına rağmen alumina daha fazla polar, silika ise daha fazla asidiktir. Ayrıca alüminanın nötral, bazik ve asidik formları da mevcuttur. TLC, duyarlı, hızlı, basit, ucuz bir analitik tekniktir. TLC ayrıca bir mikro tekniktir; 1 den 100×10^{-6} g' a kadar büyüklükteki numune boyutlarına rağmen 10^{-9} g kadar miktardaki her madde tespit edilebilir.

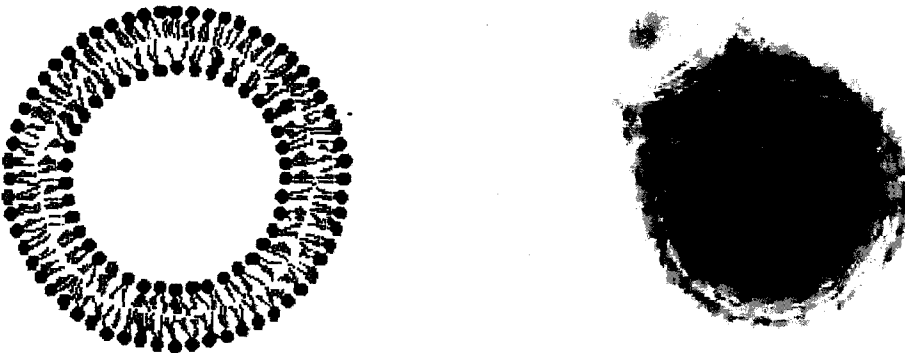
TLC, adsorbent ile kaplanmış cam, plastik yada alüminyum plakaların uç kısmına yakın bir yere analiz edilecek numunenin damlatılmasını gerektirir. Bu plaka dibinde az miktarda solvent bulunan bir kromatografi tankına daldırılır. Plakadaki adsorbanın üst ucuna doğru kapillar etki yardımıyla solventin ilerlemesiyle solventte çözülmüş bileşik karışımının sabit adsorbent faz arasında

ayırıcı dağılımı gerçekleşir. Daha kesin olarak, karışımdaki belirli bileşikler sabit faza tutunurlar, hareketli fazda daha az zaman geçirirler ve plakanın üstüne doğru daha yavaş hareket eder.

Numunenin yürüdüğü solvent plakanın üst kısmına yada yakınına ulaştığında sonra plakalar tanktan çıkarılarak kurutulur ve farklı tekniklerle (yakma gibi) numunedeki bileşikler plaka üzerinde “nokta” şeklinde görünür hale getirilir. Bu noktaların nispi pozisyonları özel bir bileşik yada standart kullanılarak hem tanımlanır hem de daha sonra miktarsal olarak analiz edilebilir (lazer dansitometrik analiz gibi)⁷¹.

Lipozomlar

Lipozomlar, hücre membranı ile uyumlu lipid taşıyıcılardır⁶. Kolloidal taşıyıcı sistemlerden biri olan lipozomlar, yaklaşık 0.02-3.5µm çapında küresel veziküllerdir. Lipid çift tabaka ve sulu faz olmak üzere iki kısımdan oluşurlar. Lipid çift tabaka tek veya çok sayıda olabilir⁷².

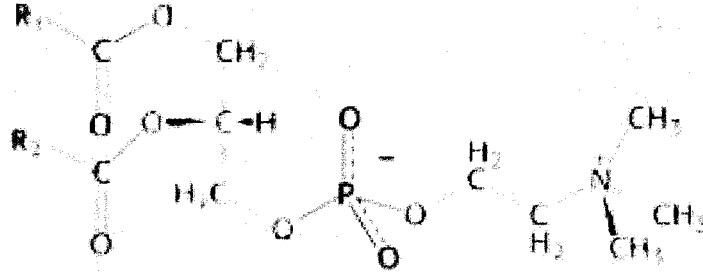


Şekil 1 . Lipozomun şematik ve mikroskopik görüntüsü.

Etkin maddelerin lipozomlanmasının başlıca avantajları şöyle sıralanabilir:

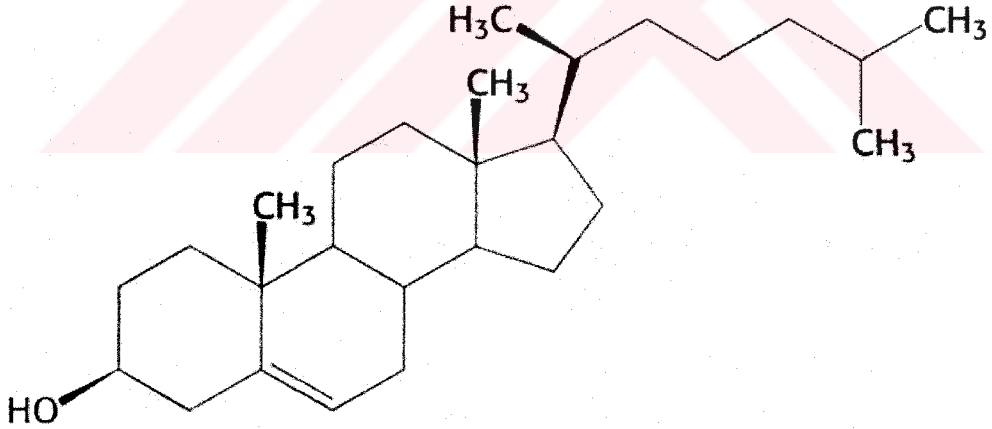
1. Vücudun yapıtaşı olan fosfolipitten oluştukları için biyolojik olarak yıkılırlar, immünojenik ve toksik etki göstermezler.
2. Küçük dozlarla terapötik etki sağlarlar.
3. Etkin madde plazma düzeyini istenilen süre terapötik değerde tutabilirler.
4. Dozlama aralığını uzatırlar.
5. Yan ve toksik etkileri çok azaltır veya ortadan kaldırırılar.
6. Etkin maddeyi enzimatik etkilerden korurlar.
7. Yarılanma ömrü kısa olan maddelerin yarılanma ömrünü uzatırlar.
8. Suda ve yağda çözünen etkin maddeleri taşıyabilirler.
9. İlacı hedef bölgeye götürebilirler⁷².

Lipozomların lipit tabakası başlıca doğal ve sentetik fosfolipitlerden oluşur. Fosfolipitler amfoterik özellikte maddelerdir. Molekülün hidrofilik baş kısmı ve hidrofobik hidrokarbon zinciri vardır. Fosfolipitlerin içerdikleri başlıca doymamış yağ asitleri, oleik asit, linoleik, linolenik ve araşidonik asitler, doymuş yağ asitleri ise laurik, miristik, palmitik, stearik ve araşidik asitlerdir. En çok kullanılan doğal ve sentetik fosfolipitler; yumurta veya soya fosfotidilkolin, dipalmitoilfosfotidilkolin, distearilfosfotidilkolin, fosfotidilserin, fosfotidilinositol, fosfotidiletanolamin ve sfingomyelindir⁷².



Şekil 2 . Fosfotidilkolin molekülü.

Lipit tabakanın özelliklerinde değişiklik yapmak için bazı maddeler ilave edilir. Sterollerin katılması ile lipit tabakanın geçirgenliği azaltılır. Steroller arasında en yaygın kullanılan kolesteroldür. Kolesterol lipit tabakanın kan proteinleri (albumin, makroglobulin) ile birleşmesini engeller. Zira bu proteinler lipozomun stabilitesini bozarak içlerindeki maddelerin salınımına neden olurlar⁷².



Şekil 3. Kolesterol molekülü.

GEREC VE YÖNTEM

Gereçler

KİMYASAL MALZEMELER

Akrilamid (Sigma)	L-α-fosfatidil serin (Sigma)
Amonyum per sülfat (Merck)	L-α-fosfatidil kolin (Sigma)
Asetik asit (Merck)	Galaktoserebrosit (Sigma)
Bakır sülfat (Merck)	Gliserin (Sigma)
Bisakrilamid (Sigma)	Glisin (Sigma)
Brusella Agar besiyeri (Fluka)	Gluteraldehit (Merck)
Brusella Broth besiyeri (Difco)	n-Hexan (HPLC Grade) (Merck)
<i>Brucella melitensis</i> REV1 aşısı suşu (Pendik Veteriner Enstitüsü)	Gümüş nitrat (Merck)
<i>Brucella melitensis</i> tüp aglütinasyonu antijeni (RSHM)	HCl (Merck)
CuSO ₄ (Merck)	Kloroform (HPLC Grade) (Merck)
Dietil eter (HPLC Grade) (Merck)	Kolesterol (Sigma C 8667, 5 gr)
DPPC (Dipalmitoil fosfatidil kolin) (Sigma)	Kolesterol 3-sülfat (Sigma)
Etil Alkol (%96) (Sigma)	Kolesterol oleat (Sigma)
Fareler (RSHM)	Kristal Viyole (Merck)
Formaldehit (Calbiochem)	Lugol (İyot eriyiği)
Fosforik asit (Merck)	Metanol (HPLC Grade) (Merck)

Na ₂ EDTA (Sigma)	Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck)
n-Bütanol (Merck)	Sodyum karbonat (Merck)
2XÖrnek tamponu (Sigma)	Sodyum tiyosülfat (5.H ₂ O) (J.T.Baker)
Palmitik asit (Sigma)	Squalen (Sigma)
Safranin (Merck)	TEMED (Sigma)
Seramid (Sigma)	Triolein (Sigma)
Sığır Serum Albumini (Sigma)	Tris (Trizma base) (Sigma)
Sodyum asetat (Merck)	

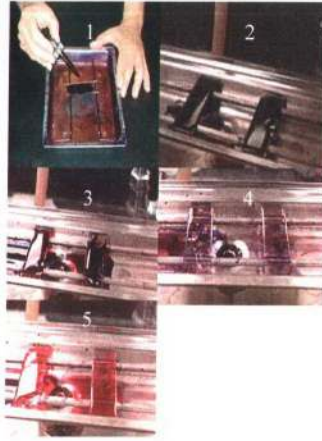
CİHAZLAR

Çalkalayıcı (Memmert)	Pipet tabancası (Powerpette)
EDTA'lı deney tüpü (Becton Dickonson)	Santrifüj (12.000 g) (Jouan)
Elektroforez aleti (BioRad Protean® 2xi Cell)	Santrifüj (100.000 g) (Beckmann)
Güç kaynağı (BioRad Power Pac 1000)	Santrifüj (Hettich Zentrifungen)
Hassas terazi (Denwer Instruments)	Su banyosu (Schwabach FRG)
Etüv (Jouan)	Soğutucu (PMC)
Koruyucu maske 3M (9322 EN149:2001 FFP2)	TLC Plağı (Merck, 20x20 cm, Silica Gel)
Mikroskop (Olympus)	TLC tankı (CAMAG)
Pasteur Fırını (Heraeus)	

Yöntem

Brucella melitensis suşunun üretilmesi, saflık kontrolü ve saklanması

1. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden 200 doz *Brucella melitensis* REV1 aşısı suşu temin edildi.
2. *Brucella* Agar besiyeri uygun miktarda tartıldı ve distile su ile tamamlanarak su banyosunda homojenize edildi. Homojenize edilen besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edildi. Steril besiyeri, Pasteur fırınında 180°C'de 60 dakika süre ile steril edilen petrilere döküldü.
3. *Brucella melitensis* aşısı suşu steril serum fizyolojik ile çözüldükten sonra, *Brucella* agar besiyerlerine tek koloni ekim yöntemi ile ekim yapıldı. 3-4 gün 37°C'de oksijenli ortamda inkübe edildi.
4. Üreyen bakteriler Gram boyama yöntemi ile boyandı. Lam üzerine serum fizyolojik damlatıldıktan sonra saf kolonilerden alınan bakteri serum fizyolojik içinde süspanse edildi ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparat 3-4 kez alevden geçirilerek fikse edildi. Preparatın üzerine kristal viyole dökülerek 1 dakika beklendi ve su ile yıkandı. Preparatın üzerine lugol dökülerek 1 dakika beklendi ve su ile yıkandı. Dekolorizasyon için 1:1 oranında etil alkol:aseton karışımı uygulandı ve 30 saniye sonra su ile yıkandı. Son olarak bazik fuksin ile 30 saniye boyandı ve su ile yıkandı. Boyalı preparat mikroskopta 100X objektifte incelendi.



Şekil 4. Gram Boyama Yöntemi

5. Saf olduğu mikroskopi ile kontrol edilen mikroorganizma kültüründen, Brusella sıvı besiyeri içeren 1.5ml'lik ependorf tüplere alındı ve üzerine otoklavda steril edilen gliserin eklenerek -20°C'de saklandı.



Şekil 5. *Brucella melitensis*'in mikroskop görüntüsü

Brucella melitensis suşunun canlandırılması ve S kolonilerin saptanması

Stoklanmış olan bakteriler, Brusella agar besiyerinde, 37°C’de, oksijenli ortamda canlandırıldı. Her canlandırma işlemi sonrasında koloniler büyüteç ile incelenerek düzgün kenarlı “S” koloniler olduğu ve Gram boyama yapılarak da kültürün saf olduğu konfirme edildi. Düzgün kenarlı olmayan “R” koloni oluşturan bakteriler çalışmaya alınmadı. Bakterinin saf olduğu konfirme edildikten sonra daha fazla sayıda pasajlanarak aynı koşullarda üretildi.

Brucella melitensis suşunun çoğaltılıp dış membranının elde edilmesi⁷³

1. İnkübasyon sonrası bakterilerin üremiş olduğu besiyeri üzerine 1ml steril serum fizyolojik eklenerek yıkandı ve yıkantı, steril santrifüj tüplerine alındı. Bakteri süspansiyonu santrifüj tüplerine alınmadan önce santrifüj tüpünün darası alındı.
2. Her santrifüj tüpüne 10ml yıkantı sıvısı eklendi. Tüpler düşük devirde (2000 rpm) santrifüj edilip süpernatant kısmı atıldı ve tüpler tekrar tartıldı. Böylece bakteri yaş ağırlığı tespit edildi.
3. 30 g yaş bakteri hücresi 300ml serum fizyolojik ile karıştırılarak 12.000 g’de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ayrıldı⁷³.
4. Elde edilen bu süpernatant, 100.000 g’de 5 saat santrifüj edildi ve pellet ependorf tüplere alınıp liofilize edildi⁷³.
5. Böylece bakterinin lipopolisakkarit, fosfolipid ve dış membran proteinlerini içeren, antijenik özellikteki ekstrakt elde edildi ve lipozomla kaplamak amacıyla liofilize şekilde +4°C’de saklandı.

Brucella melitensis dış membran ekstraktının SDS-PAGE ve TLC yöntemleriyle doğrulanması

Elde edilen antijen içinde, amaçlandığı gibi *Brucella* dış membran proteinlerinin ve lipidlerin varlığının doğrulanması için Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve İnce tabaka kromatografisi (TLC) yöntemleri kullanıldı.

1. SDS-PAGE Yöntemi:

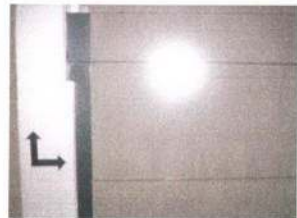
Elektroforezin Yapılışı⁷⁴

Cam plakalar (22x20cm); 1.5mm kalınlığındaki spacerlar, plakaların her iki kenarı boyunca yerleştirilerek bir araya getirildi.

Cam plakaların arasına bir miktar ayırıcı jel eklenip sızdırma olup olmadığı kontrol edildikten sonra 50ml'lik bir enjektör yardımıyla hava kabarcığı oluşturmada cam tabakaların arasına dolduruldu. Doldurma işlemine üst kenara 7cm kalıncaya kadar devam edildi.



Şekil 6. Cam plakaların biraraya getirilmesi.



Şekil 7. Ayırıcı jelin eklenmesi.

50 ml n-bütanol üzerine 5 ml distile su ilave edildi. Solüsyon kuvvetlice çalkalandı ve üst faz alınarak suya doyurulmuş bütanol hazırlandı. Jel döküldükten sonra 1ml'lik enjektör ile jelin yüzeyinde suya doyurulmuş bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Böylece düz bir polimerizasyon hattı oluşturulması amaçlandı.



Şekil 8. Jelin yüzeyine suya doyurulmuş bütanol eklenmesi



Şekil 9. Tarağın yerleştirilmesi

2 saat beklendikten sonra üst kısımdaki su süzgeç kağıdıyla alındı ve yığıcı jel hazırlanıp enjektör ile döküldü. Hemen ardından 1.5mm kalınlığındaki taraklar yerleştirilip, polimerizasyon için 3 saat beklendi.

72g glisin, 2.5g SDS ve 15.15g Tris distile su ile 5 litreye tamamlanarak, pH=8.3 olan tris-glisin-elektrot tamponu hazırlandı. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarılıp polimerizasyon artıklarını uzaklaştırmak için kuyucuklar 3 kez tris-glisin-elektrot tamponu ile yıkandı. Yıkama sonrası kuyucuklar aynı tamponla dolduruldu.

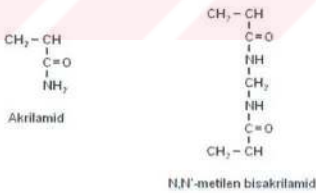
Tablo 3 . SDS-PAGE jellerinin kompozisyonları

	Ayırıcı Jel	Yığıcı Jel
	(% 10)	(%5)
Distile su (ml)	16	18.05
Tris-HCl pH 8.8 (ml)	10	-
Tris-HCl pH 6.8 (ml)	-	7.5
% 10 SDS (µl) *	400	300
Akrilamid stok (ml) **	13.4	4
Degaze edildi		
%10 APS (µl) ***	200	150
TEMED (µl)	20	30

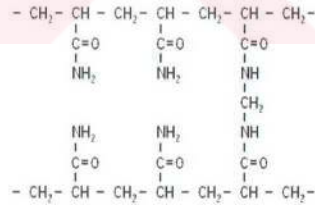
* % 10 (v/v) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS): 10 g SDS 50 ml distile suda hafifçe karıştırılarak çözüldü ve toplam hacim distile su ile 100 ml' ye tamamlandı.

** Akrilamid Stok Solüsyonu (% 30): 14.6 g akrilamid ve 0.4 g N,N'-metilen bisakrilamid 50 ml' ye distile suyla tamamlandı ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 30 dakika süreyle karıştırıldı. Süzgeç kağıdından geçirilerek süzüldü. Koyu renkli şişede +4 °C' de muhafaza edildi.

*** % 10 (v/v) Amonyum Persülfat (APS): 100 mg amonyum persülfat üzerine 1 ml distile su ilave edildi. Kullanmadan hemen önce, taze olarak hazırlandı.



Şekil 10. Akrilamid ve N,N'-metilen bisakrilamid' in kimyasal yapısı.



Şekil 11. Poliakrilamid jelin kimyasal yapısı.

Elektroforez işlemi için numunenin hazırlanması

1.200 µl metanol:su (1:1)'da eritilmiş ve içinde Brusella dış membran antijeni içeren numune alındı. Üzerine 400 µl metanol, 200µl distile su ve 200µl kloroform eklendi. İyice vortekslendi. Numune üzerine tekrar 200µl kloroform eklendi. 30 saniye vortekslendi.

2.1000 g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra metanol ve kloroform fazları ayrıldı. Bu fazların arasında kalan faz numunedeki proteinleri içeren faz olarak ayrıldı.

3.Metanolü uçurmak için 90-100 °C'de su banyosunda bekletildi. Bu işleme, tüp içindeki madde miktarı yarı yarıya azalincaya kadar devam edildi.

4.Metanolü uçurulmuş numune üzerine 2X örnek tamponu eklendi ve vortekslendi.

Numunelere 2X örnek tamponu eklendi ve kuyucuklara uygulandı.

1	2	3	4	5	6	7
---	---	---	---	---	---	---

1 nolu kuyucuk: örnek tamponu (40µl)

2 nolu kuyucuk: numune (25µl)

3 nolu kuyucuk: örnek tamponu (40µl)

4 nolu kuyucuk: 20 ng BSA (40µl)

5 nolu kuyucuk: örnek tamponu (40µl)

6 nolu kuyucuk: marker (30µl) (10 ng BSA)

7 nolu kuyucuk: örnek tamponu (40µl)

Standart protein olarak hem Sığır serum albuminin (BSA) değişik konsantrasyonları hem de moleküler ağırlıkları bilinen proteinler (albumin, ovalbumin, karbonik anhidraz) içeren marker kullanıldı. Örnek tamponu eklendikten sonra disülfid bağlarının açılması için tüm tüpler 100 °C'de 1-2 dakika bekletildi.

Tablo 4. Protein Standartındaki Moleküler Ağırlık Dağılımları.

Protein	Moleküler ağırlık (kDa)
ALBUMİN (BSA)	66
OVALBUMİN	45
KARBONİK ANHIDRAZ	29



Şekil 12. Örneklerin yüklenmesi

Örnekler yüklendikten sonra 40mA/jel sabit akımda yaklaşık 5 saat süreyle elektroforez işlemi yapıldı.



Şekil 13. Başlangıç anında elektroforez aleti ve jelin görüntüsü



Şekil 14. Otuzdördüncü dakikada elektroforez aleti ve jelin görüntüsü



Şekil 15. Birbuçuk saat sonra elektroforez aleti ve jelin görüntüsü



Şekil 16. İki buçuk saat sonra elektroforez aleti ve jelin görüntüsü



Şekil 17. Üç buçuk saat sonra elektroforez aleti ve jelin görüntüsü

Tablo 5. Elektroforez sonrası, jelin gümüş boyama yöntemi ile boyanması⁷⁵.

Adım	Solüsyon	Süre
Sabitleme	Sabitleyici	30 dk
Yıkama	Deiyonize su	30 dk
Duyarlılaştırma	Duyarlılaştırıcı	60 dk
Yıkama	Deiyonize su	4 x 10 dk
Gümüş	Gümüş nitrat	30 dk
Yıkama	Deiyonize su	30 sn
Geliştirme	Geliştirici	5 dk
Yıkama	Deiyonize su	5 x 20 sn
Durdurma	Durdurma ayırıcı	5 dk
Yıkama	Deiyonize su	2 x 10 dk

Sabitleme solüsyonu: %40 etanolden 400ml, %10 asetik asitten 100ml eklenip distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Yıkama: Distile su ile yapıldı.



Şekil 18. Sabitleme



Şekil 19. Yıkama



Şekil 20. Duyarlılaştırma



Şekil 21. Durdurma

Duyarlılaştırma solüsyonu: %30 etanol(v/v)'den 300ml, %6.8'lik sodyum asetat(w/v)'dan 68gr ve %0.2 sodyum tiosülfat.5H₂O(w/v)'dan 2gr eklenip distile su ile 1 litreye tamamlandı. Son anda %25 glutraldehitten %0.125 (her 100ml'lik stok için 0.5ml olacak şekilde) eklendi.

Gümüş solüsyonu: %0.25 (w/v)'lık 25 gr gümüş nitrat distile su ile 1 litreye tamamlanıp son anda %37'lik formaldehitten %0.015 (her 100ml'lik stok için 40µl olacak şekilde) eklendi.

Geliştirme solüsyonu: %2.5 (w/v)'lık 25 gr sodyum karbonat distile su ile 1 litreye tamamlanır ve son anda %37'lik formaldehitten %0.0074 (her 100ml'lik stok için 20µl olacak şekilde) eklendi.

Durdurma ayracı: %1.5 Na₂EDTA'dan 15gr distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Proteinlerin molekül ağırlıklarının hesaplanması, molekül ağırlıkları bilinen standart proteinlerin, molekül ağırlıkları ve jeldeki göç mesafeleriyle ilişkili olarak semi-logaritmik kağıt üzerine çizilen doğrusal bir grafik yardımıyla örnek proteinin molekül ağırlığının saptanması esasına dayanır:

- A. Örnek tamponunun uygulama noktasından elektroforez sonunda göç ettiği noktaya kadar olan mesafesi ölçüldü.
- B. Molekül ağırlıkları bilinen standart proteinlerin uygulama noktasından elektroforez sonunda göç ettiği noktaya kadar olan mesafeleri ölçüldü.
- C. Her standart protein için Rf değeri hesaplandı. Bunun için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$R_f = \frac{\text{Proteinin göç ettiği mesafe}}{\text{Boyanın göç ettiği mesafe}}$$

- a. Semi-logaritmik kağıt üzerinde, X eksen Rf, Y eksen moleküler ağırlık olmak üzere değerler işaretlendi.
- b. Bir cetvel yardımıyla en fazla noktadan geçecek şekilde bir doğru çizildi.
- c. Bilinmeyen proteinin Rf değeri hesaplanarak grafik yardımıyla molekül ağırlığı hesaplandı.

2. Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması:

10mg kolesterol ve 10mg dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC), 10ml metanolde yuvarlak dipli bir balon içinde çözüldükten sonra 45°C’de rotavaporda uçuruldu. Bu şekilde cam balonun çeperinde ince bir lipid tabakası elde edildi. Daha sonra Brusella dış membranını içeren 10ml çözelti yine rotavaporda 45°C’de bu ince film üzerine yavaş yavaş ilave edildi ve hepsi ilave edildikten sonra vortekste 5 dakika karıştırıldı. Bu şekilde çok tabakalı lipozom elde edildi.

Tablo 6. Kullanılan lipidler ve oranları

	Kolesterol	DPPC
Kontrol	-	-
Formül	10mg	10mg

3. İnce Tabaka Kromatografisi:

İnce tabaka kromatografisi, 20X20 cm Silika Jel 60 F254 TLC plakası kullanılarak gerçekleştirildi. Yürütme sırasında çözücü olarak metanol:kloroform:su (20:95:1) kullanıldı. Plak üzerindeki noktalar %8 fosforik asit içerisindeki %3’lük CuSO_4 kullanılarak ve sıcak plakada yakılarak görünür hale getirildi.

Örneğin İşlenmesi

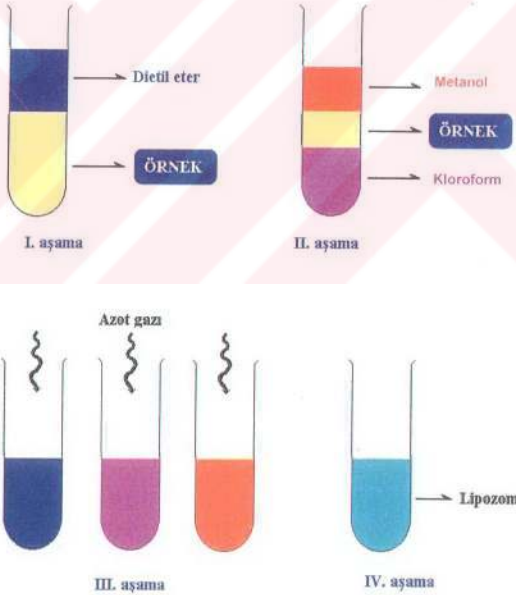
1. Aşama: Örnek üzerine 2 ml dietil eter eklendi ve tüp kapağı kapatılarak kuvvetlice çalkalandı. 1dakika beklendikten sonra üst faz olan eter fazı ayrı bir tüpe alındı. Bu işlem 3-4 defa tekrarlandı.

2. Aşama: 0.5 ml örnek üstüne 2 ml metanol, 1 ml distile su ve 1 ml kloroform eklendi ve tüp kapağı kapatılarak kuvvetlice çalkalandı. Kısa bir santrifügasyondan sonra ($2000 \times g$ de 1') üst faz olan metanol fazı ve alt faz olan kloroform fazı ayrı ayrı tüplere alındı. Bu işlem 3-4 defa tekrarlandı.

3. Aşama: Tüplerin içerikleri (Eter, metanol ve kloroform) azot gazı altında uçuruldu, ve aynı solventte (100 ul) çözüldü.

4. Aşama: Boş lipozom 200 ul metanol ve 200 ul distile su eklenerek parçalandı.

5. Tüm numuneler Şekil 28' deki sıra ve miktara göre TLC plağına uygulandı.



Şekil 22. TLC' ne uygulanacak numunelerin işlenmesi

Hayvan Deneyleri

Çalışmamızda, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı'nın B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/77-17292 sayılı izni ile, bağışık yanıtın daha kısa sürede oluştuğu dişi fareler kullanılmıştır. Fareler 20 ± 2 g ağırlığında ve 6 (altı) haftalıktır.

Rodentia takımı, Myomorpha alttakımı, Muroidea ailesi, Muridea cinsine ait *Mus musculus* türü fareler, 1 (bir) hafta süre ile karantinada tutulmuş ve sağlıklı olduğu gözlenen ve bu hafta süresince ağırlıklarında azalma olmayan fareler çalışmaya alınmıştır.

Çalışmaya alınan fareler ile 8 (sekiz) fareden oluşan toplam 6 (altı) deney grubu oluşturulmuştur. Deney gruplarındaki fareler tartıldıktan sonra Kruskal-Wallis testi uygulanıp gruplar arasında fare ağırlıkları bakımından anlamlı bir farklılık bulunmadığı ($p=0.245$) saptanarak deneye devam edilmiştir.

Birinci grup: Elde edilen dış membran antijeninin verildiği grup

İkinci grup: Boş lipozom verilen grup

Üçüncü grup: Canlı attenüe *Brucella melitensis* REV-1 aşısının verildiği grup

Dördüncü grup: Lipozomla kaplanmış dış membran antijeninin verildiği grup

Beşinci grup: Lipozomla kaplanmış Canlı attenüe *Brucella melitensis* REV-1 aşısının verildiği grup

Altıncı grup: Serum fizyolojik verilen kontrol grubu

İnokülasyon

1. Farelere verilecek olan maddeler 200µg/fare olacak şekilde subkutan olarak verildi⁷³.
2. Fareler 3 hafta süre ile sabit sıcaklık ve ortam koşullarında tutuldu.

Kan alma

1. 3 hafta sonra eter ile bayıtılan farelerin kalbinden steril enjektör ile EDTA'lı tüplere kan alındı.



Şekil 23. Fareden kan alınması

2. Alınan kanlar 2500 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edilip serumları ayrıldı.

Dalakların Çıkartılması

1. Fareler servikal dislokasyon ile öldürüldü ve aseptik koşullarda dalakları alınarak formol içinde saklandı.



Şekil 24. Farelerin dalaklarının çıkartılması

konmadı. Bu şekilde serumun çift sulandırımı (1:10, 1:20, 1:40, 1:80...vb.) elde edildi. Antijen süspansiyonu iyice karıştırıldıktan sonra tüm tüplere 0.5ml antijen ilave edildi. Bu işlemle tüplerdeki serum sulandırımı birer kat daha artmış oldu. Tüpler çalkalanarak karıştırıldı ve 37°C’de 48 saat bekletildi. Sonuçların okunmasından önce antijen kontrol tüpünün aglütinasyon vermemiş olduğu kontrol edildi. Sonra diğer tüplere bakılarak aglütinasyon sonuçları okundu ve titreler kaydedildi^{8,25,39}.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak incelendi ve deney grupları arasında sonuçlar bakımından anlamlı bir ilişki olup olmadığı araştırıldı.

Patolojik Değerlendirme

Brusella infeksiyonuna bağlı bir patoloji olup oluşmadığının anlaşılması için, alınan dalak örnekleri patolojik olarak incelendi.

BULGULAR

1. SDS-PAGE BULGULARI

$$R_f = \frac{\text{Proteinin göç ettiği mesafe}}{\text{Boyanın göç ettiği mesafe}}$$

Bütün proteinlerin göç ettikleri mesafeler ölçülerek formüle göre standart olarak kullanılan proteinlerin Rf değerleri aşağıdaki şekilde hesaplandı.

a. M.A=29 kDa

Göç ettiği mesafe=8.75 cm

$Rf=8.75/12.85=0.6809$

b.M.A=45 kDa

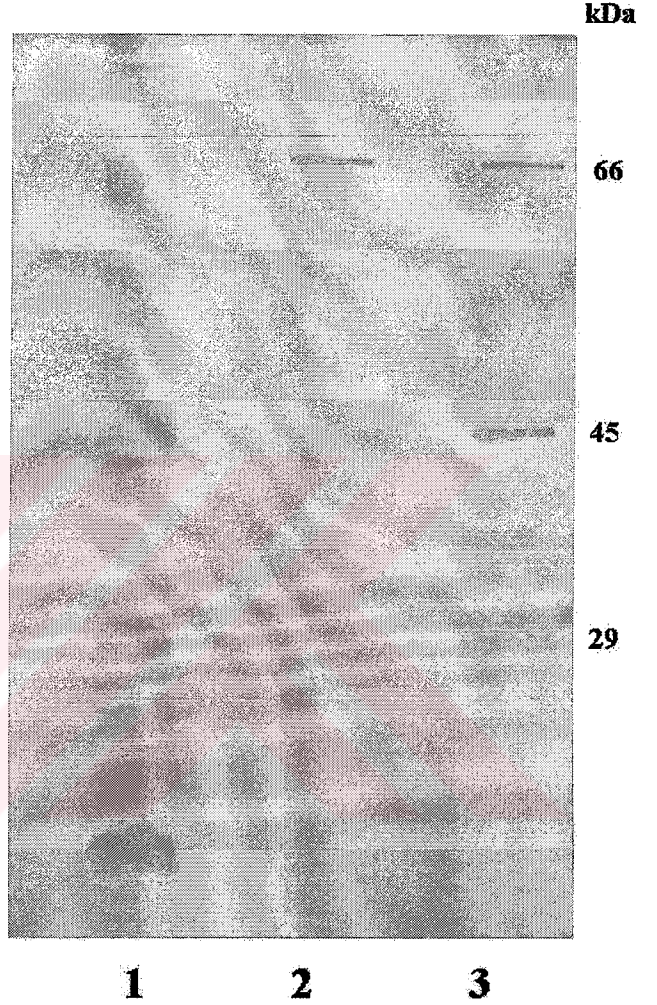
Göç ettiği mesafe=5.9 cm

$Rf=5.9/12.85=0.4591$

c.M.A=66 kDa

Göç ettiği mesafe=3.75 cm

$Rf=3.75/12.85=0.2918$

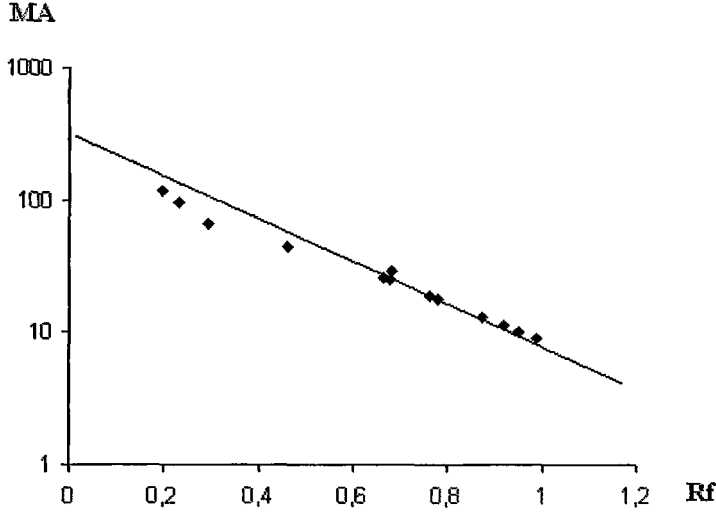


Şekil 26. *Brucella melitensis* Rev1 membran proteinlere ait SDS-PAGE elektroforetogramı

Tablo 7. Standart proteinlerin ve ekstrakta yer alan proteinlerin moleküler ağırlıkları ve Rf değerleri.

kDa	log10(KD)	RF
29	1,462398	0,6809
45	1,653213	0,4591
66	1,819544	0,2918
161,1	2,207019	0,1089
132,9	2,123733	0,16731
26,25	1,41911	0,66147
24,9	1,396905	0,677043
19,0	1,280391	0,758755
17,9	1,25265	0,77821
13,2	1,119492	0,871595
11,3	1,052913	0,918288
10,2	1,008527	0,949416
8,9	0,953045	0,988327

Standart proteinlerin moleköl ağırlıkları ve Rf değerleri kullanılarak logaritmik kağıt üzerinde lineer bir grafik çizildi.



Şekil 27. Proteinlerin moleküler ağırlıklarının hesaplanmasında kullanılan standart grafiği.

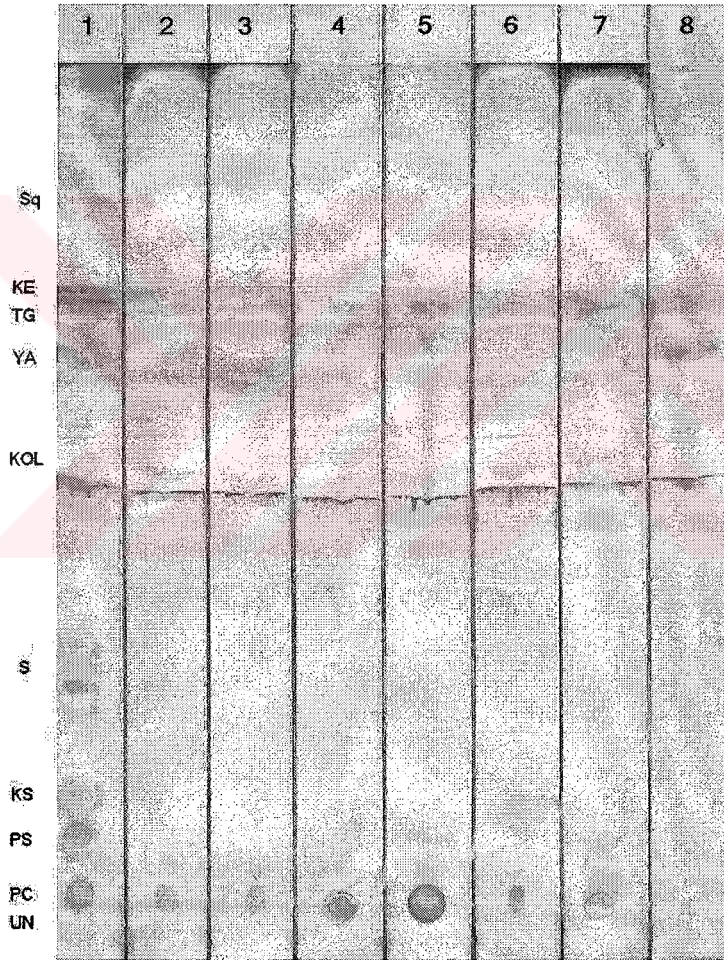
Ekstraktta yer alan proteinlerin Rf değerleri aşağıdaki şekilde hesaplandı.

- a. $Rf_1 = 1.4\text{cm}/12.85\text{cm} = 0.1089$
- b. $Rf_2 = 2.15\text{cm}/12.85\text{cm} = 0.16731$
- c. $Rf_3 = 8.5\text{cm}/12.85\text{cm} = 0.66147$
- d. $Rf_4 = 8.7\text{cm}/12.5\text{cm} = 0,677043$
- e. $Rf_5 = 9.75\text{cm}/12.5\text{cm} = 0,758755$
- f. $Rf_6 = 10\text{cm}/12.5\text{cm} = 0,77821$
- g. $Rf_7 = 11.2\text{cm}/12.5\text{cm} = 0,871595$
- h. $Rf_8 = 11.8\text{cm}/12.5\text{cm} = 0,918288$
- i. $Rf_9 = 12.2\text{cm}/12.5\text{cm} = 0,949416$
- j. $Rf_{10} = 12.7\text{cm}/12.5\text{cm} = 0,988327$

Hesaplanan Rf değerleri şekildeki grafiğe yerleştirilerek proteinlerin moleküler ağırlıkları hesaplandı.

M.A.₁=161,0718 kDa, M.A.₂=132,9636 kDa, M.A.₃=26,24883 kDa,
M.A.₄=24,94047 kDa, M.A.₅=19,07179 kDa, M.A.₆=17,89164 kDa,
M.A.₇=13,16716 kDa, M.A.₈=11,2957 kDa, M.A.₉=10,19829 kDa,
M.A.₁₀=8,975214 kDa olarak bulundu.

2. TLC BULGULARI



UN, Uygulama noktası; PC, Fosfatidilkolin; PS, Fosfatidilserin; KS: Kolesterol-3-sülfat; S, Seramit; KOL, Kolesterol; YA, Yağ asiti; TG, Triasilgliserol; KE, Kolesterol esteri(kolesteriloleat); Sq, Squalen.

1. Fosfatidil kolin (2x5 µl), 2. Kolesterol (2x5 µl), 3. Fosfatidil kolin + kolesterol (2x5 µl (her birinden)), 4. Lipozom (2x5 µl), 5. Lipozom (3x5 µl), 6. Brusella dış membranı antijeni (Kloroform fazı) (2x5 µl), 7. Brusella dış membranı antijeni (Eter fazı) (2x5 µl), 8. Brusella dış membranı antijeni (Metanol fazı) (2x5 µl)

Şekil 28. İnce tabaka kromatografisi sonucunda numunelerin görünümü.

Lipozom yapısındaki fosfolipid ve kolesterole ilaveten görülen yağ asiti bantının bakteriye ait olduğu düşünülmektedir. Böylece membranın lipid yapısının varlığı ortaya koyulmuştur.

3. FARELERLE YAPILAN DENEY SONUÇLARI

Tablo. 8 Grup 1 de yer alan farelerin ağırlıkları, dalak ağırlıkları ve antikor titreleri.

KAFES NO: 1	VERİLEN AJAN: Brucella Dış Membranı					
FARE NO	FARE AĞIRLIĞI				DALAK AĞIRLIĞI	ANTİKOR TİTRESİ
	BAŞLANGIÇ	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA		
2	19.5 gr	20.5 gr	22.0 gr	22.5 gr	0.092 gr	1/640
3	21.5 gr	23 gr	23.5 gr	23 gr	0.088 gr	1/80
4	20 gr	24 gr	25.5 gr	27 gr	0.162 gr	1/1280
11	20 gr	23.5 gr	26.0 gr	28 gr	0.144 gr	1/1280
12	20.5 gr	23 gr	23.0 gr	27 gr	0.081 gr	1/640
41	20 gr	22.5 gr	23 gr	23 gr		1/640
45	21.5 gr	22 gr	22.5 gr	23 gr		1/640
46	21 gr	21.5 gr	22.5 gr	23.5 gr		1/1280

Tablo 9. Grup 2 de yer alan farelerin ağırlıkları, dalak ağırlıkları ve antikor titreleri.

KAFES NO: 2	VERİLEN AJAN: Boş lipozom					
FARE NO	FARE AĞIRLIĞI				DALAK AĞIRLIĞI	ANTİKOR TİTRESİ
	BAŞLANGIÇ	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA		
1	18 gr	20 gr	22.0 gr	23.5 gr	0.047 gr	(-)
5	18 gr	23 gr	25.5 gr	28.5 gr	0.118 gr	(-)
6	17.5 gr	21 gr	20.0 gr	21.5 gr	0.106 gr	(-)
8	17 gr	20 gr	20.5 gr	21.5 gr	0.034 gr	(-)
9	18 gr	21 gr	24.0 gr	24.5 gr	0.085 gr	(-)
10	17.5 gr	20.5 gr	22.0 gr	23.5 gr	0.059 gr	(-)
16	18.5 gr	21.5 gr	25.0 gr	26 gr	0.103 gr	(-)
17	19.5 gr	23.5 gr	24.5 gr	26.5 gr	0.079 gr	(-)

Tablo 10. Grup 3 de yer alan farelerin ağırlıkları, dalak ağırlıkları ve antikor titreleri.

KAFES NO: 3	VERİLEN AJAN: Lipozomla kaplanmış <i>Brucella melitensis</i> REV-1 aşısı					
FARE NO	FARE AĞIRLIĞI				DALAK AĞIRLIĞI	ANTİKOR TİTRESİ
	BAŞLANGIÇ	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA		
15	18 gr	20 gr	22.0 gr	22 gr	0.102 gr	(-)
21	19 gr	21.5 gr	23.5 gr	25 gr	0.099 gr	(-)
23	19.5 gr	22 gr	23.5 gr	25.5 gr	0.042 gr	(-)
24	19.5 gr	22.5 gr	24.0 gr	25.5 gr	0.042 gr	(-)
25	20 gr	21.5 gr	24.0 gr	24 gr	0.087 gr	(-)
26	19.5 gr	21 gr	23.5 gr	25.5 gr	0.088 gr	(-)
27	19.5 gr	21 gr	22.5 gr	25.5 gr	0.109 gr	(-)
28	18 gr	21 gr	21.0 gr	26.5 gr	0.064 gr	(-)

Tablo 11. Grup 4 de yer alan farelerin ağırlıkları, dalak ağırlıkları ve antikor titreleri.

KAFES NO: 4	VERİLEN AJAN: Lipozomla kaplanmış <i>Brucella melitensis</i> dış membranı					
FARE NO	FARE AĞIRLIĞI				DALAK AĞIRLIĞI	ANTİKOR TİTRESİ
	BAŞLANGIÇ	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA		
18	16 gr	20 gr	20.5 gr	21.5 gr	0.064 gr	1/2560
19	17 gr	23 gr	24.0 gr	26.5 gr	0.071 gr	1/5120
20	19 gr	20.5 gr	20.5 gr	23 gr	0.031 gr	1/2560
22	16 gr	20.5 gr	16.5 gr	17.5 gr	0.003 gr	1/5120
29	16 gr	20 gr	20.5 gr	20.5 gr	0.010 gr	1/1280
30	21 gr	22.5 gr	23.5 gr	24.5 gr	0.101 gr	1/5120
31	19.5 gr	21.5 gr	21.5 gr	23.5 gr	0.067 gr	1/5120
33	19.5 gr	21 gr	22.0 gr	24.5 gr	0.079 gr	1/1280
34	19 gr	20.5 gr	21.0 gr	23 gr	0.075 gr	1/5120

Tablo 12. Grup 5 de yer alan farelerin ağırlıkları, dalak ağırlıkları ve antikor titreleri.

KAFES NO: 5	VERİLEN AJAN: <i>Brucella melitensis</i> REV-1 aşısı					
FARE NO	FARE AĞIRLIĞI				DALAK AĞIRLIĞI	ANTİKOR TİTRESİ
	BAŞLANGIÇ	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA		
7	18.5 gr	22 gr	25.0 gr	28.5 gr	0.218 gr	1/640
13	17.5 gr	20.5 gr	22.0 gr	20 gr	0.032 gr	1/640
14	17 gr	21 gr	23.0 gr	25.5 gr	0.086 gr	1/1280
36	15 gr	20.5 gr	16.5 gr	19.5 gr	0.023 gr	1/1280
37	16 gr	21.5 gr	23.0 gr	25.5 gr	0.053 gr	1/640
38	14.5 gr	20 gr	19.0 gr	21.1 gr	0.037 gr	1/2560
39	15 gr	20.5 gr	21.5 gr	22 gr	0.050 gr	1/1280
47	17.5 gr	20 gr	20.5 gr	21.3 gr		1/1280

Tablo 13. Grup 6 da yer alan farelerin ağırlıkları, dalak ağırlıkları ve antikor titreleri.

KAFES NO: 6	VERİLEN AJAN: Serum fizyolojik					
FARE NO	FARE AĞIRLIĞI				DALAK AĞIRLIĞI	ANTİKOR TİTRESİ
	BAŞLANGIÇ	1.HAFTA	2.HAFTA	3.HAFTA		
32		17 gr	18.0 gr	20 gr	0.097 gr	(-)
35		17 gr	18.0 gr	19 gr	0.070 gr	(-)
40		16.5 gr	16.5 gr	17 gr	0.064 gr	(-)
42		18.5 gr	19.5 gr	20.5 gr	0.091 gr	(-)
43		20.5 gr	21.5 gr	22.5 gr	0.093 gr	(-)
44		20 gr	22.5 gr	23.5 gr	0.087 gr	(-)
18		18 gr	20.5 gr	19 gr	0.070 gr	(-)
48		16.4 gr	16.8 gr	17.2 gr		(-)

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ BULGULARI

Kruskal-Wallis testi sonucunda gruplar arasında antikor titresi bakımından anlamlı fark bulunmuştur ($p=0$). Mann-Whitney testi ile gruplar kendi içlerinde değerlendirildiklerinde Grup 1 ile Grup 4 arasında ($p=0.001$) ve Grup 4 ve Grup 5 arasında ($p=0.004$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Yani

yalnızca “Brusella Dış Membranı” verilen ve “lipozomla kaplanmış Brusella dış membranı” verilen gruplar arasında ve “canlı attenüe *Brucella melitensis* REV-1 aşısı” verilen ve “lipozomla kaplanmış Brusella dış membranı” verilen gruplar arasında antikor titresi bakımından anlamlı bir farklılık saptanmıştır. Ayrıca Grup 1 ve Grup 6 arasında ($p=0$), Grup 1 ve Grup 3 arasında ($p=0$), Grup 1 ve Grup 2 arasında ($p=0$), Grup 2 ve Grup 4 arasında ($p=0$), Grup 2 ve Grup 5 arasında ($p=0$), Grup 3 ve Grup 4 arasında ($p=0$), Grup 3 ve Grup 5 arasında ($p=0$), Grup 4 ve Grup 6 arasında ($p=0$) ve Grup 5 ve Grup 6 arasında ($p=0$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Kruskal-Wallis testi sonucunda gruplar arasında dalak ağırlıkları bakımından anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.038$). Yapılan Mann-Whitney testi sonucunda dalak ağırlıkları kıyaslandığında grup 1 ve grup 4 arasında ($p=0.002$) ve grup 1 ve grup 5 arasında ($p=0.021$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.

5. PATOLOJİK BULGULAR

Alınan dalak örneklerinden hazırlanan kesitlerin mikroskopik incelemesinde herhangi bir patolojiye rastlanmadı.

TARTIŞMA

Bruselloz, dünyanın pek çok ülkesinde yaygın ve ekonomik yönden önemli bir zoonotik hastalıktır. Ciddi ekonomik sorunlara neden olur⁵⁸.

Hastalık; abortuslar, süt verimi kaybı, damızlık değeri kaybı, infertilite gibi nedenlerle hayvansal üretimde kayıplara neden olurken infekte hayvanlarla doğrudan temas veya kontamine süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi sonucu da önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. *Brucella melitensis*'in brusella türleri içinde insan için en patojenik tür olması ve kırsal kesimde insanların hayvanlarla yakın temasta olmaları nedeniyle koyun brusellozu ülkemizde insan sağlığına olumsuz etki bakımından daha büyük öneme sahiptir¹.

Aşılama, serolojik identifikasyon ve hasta hayvanların izolasyonu, eradikasyon için en pratik yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır⁵⁸. Ancak günümüzde kullanılan *B.abortus* S19 ve *B.melitensis* REV-1 gibi canlı attenüe aşılar, gebe hayvanlarda düşüklere sebep olabildiği gibi insanlar için de virulandır^{58,60}. Bu nedenle bu suşlardan hazırlanan canlı attenüe tam bakteri aşıları yerine, çalışmamızda olduğu gibi bakterinin komponentleriyle hazırlanan aşılardan kullanılması hem hayvanlarda hem de insanlarda hastalığa neden olma riski taşımayacağından ümit vaat etmektedir. Bununla birlikte S koloni oluşturan aşı suşları ile virulan suş antijenik olarak benzer olduğu için S-LPS'e karşı oluşan antikorları ölçen serolojik testler ikisini ayırt edemezler^{17,58,76}. Bunun sonucunda da yapılan serolojik incelemelerde hayvanın hasta mı yoksa aşı ile korunmakta mı olduğu anlaşılamamaktadır⁶⁰. Bu nedenden geliştirilen RB51 aşısı, *B.abortus* 2308 suşunun bir "R" mutantıdır. Rifampin içeren besiyerinde *B.abortus* 2308 suşunun seri pasajlarıyla elde edilir^{64,77}. Bu suşun hücre yüzeyinde O-polisakkarit zinciri ekspresyonu olmadığından serolojik testlerle çapraz reaksiyon vermediği⁶⁴ ve bu nedenle serolojik test ile pozitif olarak tespit edilen hayvanların hasta hayvanlar olduğu düşünülmektedir^{16,78}.

Boschiroli ve ark.ları 1997 yılında yayınladıkları çalışmalarında hasta hayvanlar ile aşıllı hayvanların serolojik olarak ayrılabilmesi için bir *B.abortus* S19 mutantı tanımlamışlardır⁷⁹. Bu çalışmada 26kDa (Bp26) ağırlığındaki bir periplazmik proteinin hasta hayvanların serumunda yüksek düzeyde saptanırken aşıllı hayvanların serumunda düşük düzeyde bulunduğu bildirilmiş ve bu proteini kodlayan gen plazmid aracılığıyla *B.abortus* S19 suşuna aktarılmıştır. Elde edilen M-1 mutantının oluşturduğu bağışık yanıt, orijinal suşun oluşturduğu bağışık yanıt ile kıyaslanmış ve iki suşun oluşturduğu bağışık yanıt açısından aralarında anlamlı bir fark olmadığı ancak her ikisinin de koruyucu yanıt oluşturduğu bildirilmiştir. Çalışmada M-1 mutantının aşı olarak kullanıldığı taktirde bağışık yanıt oluşturduğu ve serolojik testler ile tanıda hasta ve aşıllı hayvanların ayırt edilmesini sağladığı bildirilmiştir⁷⁹. Cloeckert ve ark. aynı çalışmayı *bp26* ve *omp31* genlerini *B.melitensis* ve *B.ovis*'e aktararak yapmış ve aynı sonuca varmışlardır⁸⁰.

RB51, Amerika Birleşik Devletleri ve Meksika'da uygulanan aşı suşudur. RB51 aşı suşunun kullanımında oluşan korumanın zayıf olması önemli bir sorundur ve bu sorunu aşmak için ergin hayvanların tekrar aşılması gerekir. Tekrar aşılama ise düşüklere yol açabilmektedir. Bununla birlikte RB51 suşunun aşılana hayvanın sütünden izole edilebilmesi halk sağlığı açısından da önemlidir^{78,81}. Leal-Hernandez ve ark. yayınladıkları çalışmada RB51 ile önceden aşılanmış bir sürüyü tekrar aşılamışlar ve yeniden aşılama sonrasında spot testi (kart test) ile pozitif sonuç elde etmişlerdir. Aynı çalışmada tekrar aşılama sonucunda hayvanların süt ve vajinal sekresyonlarından da bakteriyi izole etmişlerdir⁷⁸.

B.abortus 45/20 R suşu da aşı amaçlı kullanılmaya çalışılmış ancak stabilitesi çok düşük olduğu için başarısız olmuştur⁵⁸. Aynı zamanda R suşunun S-LPS içeren fenotipe dönüşüp tekrar virulan hale geçme riski de vardır⁸¹. R suşları ile hazırlanan aşılarda başarısız olmasının en önemli sebebi fazla attenüe olmalarından dolayı bağışık yanıtın güçsüz olmasıdır⁵⁸. R mutantları kullanılarak yapılan birçok çalışma OPS'nin virulansta önemli bir rolü olduğunu göstermiştir⁵⁸. R ve S suşlarının karşılaştırıldığı çalışmalarda S suşlarının virulan *brusella* suşlarına karşı daha etkili cevap oluşturduğu saptanmıştır⁵⁸.

Çalışmamızda daha etkili bağışık yanıt elde edilmesi amaçlandığından S-LPS içeren *Brucella melitensis* REV-1 aşı suşu kullanılmıştır. Kullanılan fareler Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Hayvan Laboratuvarından temin edilen hastaliksız deney fareleri olduğundan, S-LPS içeren suşların serolojik testlerle çapraz reaksiyon vermesi olasılığı çalışmamızda dikkate alınmamış ve oluşan antikor titrelerinin verilen maddelere karşı oluşan bağışık yanıttan kaynaklandığı düşünülmüştür.

S-LPS dışında Brusellaya karşı bağışık yanıt oluşturmak için kullanılan bir başka hücre komponenti ise dış membran proteinleridir (OMP)¹⁷. Dış membran proteinlerinin *Brucella* enfeksiyonu esnasında önemli bir rol oynaması ve konak bağışık yanıtını indüklemesi aşı çalışmaları için bakterinin kullanılabilir birer komponenti olduklarını düşündürür⁸². Bizim çalışmamızda da bu nedenle *Brucella* dış membran proteinlerini de içeren bir dış membran ekstraktı antijen olarak kullanılmıştır.

Bagües ve ark.ları, *B.ovis*'den elde edilen ve R-LPS ve OMPlarından oluşan sıcak salin (HS) ekstraktı ile farelerde koruyucu bir bağışık

yanıt elde ettiklerini bildirmişlerdir⁸³. Bağış ve ark.ları yaptıkları bu çalışmada, çalışmamızdaki yöntemle *B.ovis*'in dış membran proteinleri ve R-LPS'inden oluşan bir sıcak salin (HS) ekstraktı elde etmişler ve özellikle dış membran proteinlerinden dolayı bu ekstraktın *B.ovis*'e karşı koruyucu bir bağışık yanıt oluşturabileceğini düşünmüşlerdir. Ancak farklı olarak bağışık yanıtı güçlendirmek amacıyla lipozom formülasyonları yerine adjuvan kullanmışlardır⁸³. Bu çalışmada aşılama sonrası hayvanlara *B.ovis* verilmiş ve hayvanların serumlarındaki antikor miktarına bakılarak ve dalakları alındıktan sonra brusella bakterileri katı agar sayım yöntemiyle sayılarak koruma sağlandığı tespit edilmiştir⁸³.

Oliveira ve ark³⁵. nın yayınladıkları makalede bildirdiklerine göre birçok bilimadamı T hücre proliferasyonuna neden olan ve farelerde koruyucu bağışık yanıt oluşturan proteinlerle çalışmışlardır³⁵.

Tablo 14. T-hücre proliferasyonuna ve farelerde koruyucu bağışık yanıtı neden olan Brusella antijenleri³⁵

T-hücre antijenleri	Bu molekülle sağlanan bağışık yanıt
L7/L12	+
uvrA	Belirtilmemiş
P39	+
Bakteriyoferritin	-
14kDa	Belirtilmemiş
GAPDH	Belirtilmemiş
yajC	Belirtilmemiş
Cu/Zn süperoksit dismutaz	+
22.9kDa	+

Ding ve ark.larının da yayınlarında bildirdikleri gibi, 2002 yılında *B.suis* ve *B.melitensis*'in tüm genomunun yayınlanmasıyla, Brusella dış membran proteinlerinin klonlanabilmesi olasılığı doğmuştur⁸².

Russo ve ark.larının yürüttükleri ISTC 2446 projesi kapsamında Cu/Zn dismutaz, L7/L12 ribozomal proteinleri ve dış membran proteinlerinin koruyucu antijenler olarak oldukça etkili olduğu ancak brusellanın makrofaj aracılı bağışık yanıtı kaçması nedeniyle salgısal proteinlerin daha etkili olabileceği düşünülmüştür³⁸. Bu proteinlerinin elde edilmesinin oldukça zahmetli ve pahalı yöntemler olması nedeniyle antijenik özellikteki yapısal proteinlerin taşıyıcı bir sistemle verilerek bağışık yanıtın güçlendirilmesinin daha mümkün olduğundan bahsetmişlerdir. Taşıyıcı sistem olarak biyolojik vektörleri önermişler ve L7/L12, OMP25 ve OMP31 gibi brusella proteinlerini *Salmonella* suşlarına klonlayarak bağışık yanıt oluşturmaya amaçlamaktadırlar³⁸. Proje süresi henüz tamamlanmamıştır ancak proje sonucunda brusella antijenlerini eksprese eden *salmonella* suşlarının verildiği hayvanların serumunda koruyucu özellikte brusella antikorları saptamayı hedeflemektedirler³⁸. Vemulapalli ve ark.ları da Cu/Zn dismutaz enziminin *B.abortus* RB51 suşundaki ekspresyonunun plazmid vektör aracılığıyla artırılarak koruyuculuğunun artırılabilirliğini bildirmiş ve çalışmalarında Cu/Zn dismutaz enzimini daha fazla eksprese eden suş ile yapılan aşılama sonucunda normal aşıya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak daha fazla koruyucu yanıt alındığını bildirmişlerdir⁷.

Eistein ve ark. 2003 yılında yaptıkları çalışmada adjuvanlı rekombinant OMP31 (rOMP) proteininin farelerde serum IgG düzeyini artırdığını göstermişler⁸⁴ ve 2004 yılında *B.melitensis* rOMP31 proteininin koyunlarda

oluşturduğu bağışık yanıtı ve *B.ovis*'e karşı oluşan serum bakterisidal etkisini araştırmışlardır⁸⁵. Bu çalışmada, *B.melitensis*'ten ekstrakte edilen OMP31 proteini *E.coli*'de üretilmiş ve koyunlara verildikten sonra oluşan sıvısal bağışık yanıt *B.ovis*-ELISA ile, hücresel bağışık yanıt ise koyunların derisinde OMP31 ile yapılan deri testi ile tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda OMP31 proteininin farelerde olduğu gibi koyunlarda da sıvısal ve hücresel bağışık yanıtı indüklediği gösterilmiştir⁸⁵. Bizim çalışmamızda da farklı olarak adjuvan yerine lipozom formülasyonu kullanılmış Wright aglütinasyon sonuçları ve istatistiksel analizler sonuçlarına göre farelerde, canlı attenüe aşının oluşturduğuna kıyasla anlamlı şekilde fazla bir sıvısal bağışık tespit edilmiştir.

Ding ve ark.ları, 2005 yılında yayınladıkları çalışmada, *B.suis*'in yedi dış membran proteinini kodlayan genini klonlayıp *E.coli*'de eksprese etmişler tavşanlarda oluşan bağışık yanıtı incelemişlerdir⁸².

Hoover ve ark.ları yaptıkları çalışmada subunit bakteri aşılarının canlı atenüe bakteri aşlarına göre daha güvenli olduğunu bildirmişler. Ayrıca oral yolla aşılama sonucu mukozada oluşan anti-LPS antikorlarının solunum ile bakterinin alınması sırasında oldukça koruyucu olduğunu Rhesus makakları ile yaptıkları deneyle göstermişlerdir. Bu yolla aşılamanın insan için koruyucu olacağını önermişlerdir⁶⁶. Ancak bu aşılama tekniği daha çok biyolojik savaş sırasında brusellanın solunumla alınması gibi bir tehdit oluşturduğunda anlamlı olduğu da düşünülmelidir.

Son yıllarda güvenli ve güçlü aşların geliştirilmesi için bir çok yeni teknik kullanılmaktadır. Bununla birlikte; fraksiyonlardan elde edilen antijenler ve rekombinant DNA ve peptid sentezi ile elde edilen bağışık yanıt

sınırlıdır. Bu nedenle klasik adjuvanlara ihtiyaç duyulmaktadır ki onlar da oldukça toksiktir. Değişik antijenlere karşı oluşacak bağışık yanıtın güçlendirilmesinde adjuvan olarak lipozomlar kullanılabilirler. Toksik olmamaları ve antijen sunucu hücreler tarafından yakalanabilmeleri nedeniyle lipozomların kullanılması oldukça avantajlıdır^{6,73}. Lipozomlarla enkapsüle edilen hücre komponentleri kullanılarak bağışık yanıt oluşturma çabaları aşı çalışmalarında kullanılmaktadır ve bütün bakterinin oluşturduğu bağışık yanıtı kıyasla daha az yan etki ile bağışıklık sağlanabildiği bilinmektedir⁶. Böylece tüm bakteri kullanıldığında oluşan yan etkileri önlemek ve aynı zamanda güçlü bir bağışık yanıt elde etmek için lipozom formülasyonları kullanılabilir⁶.

Wong ve ark. yaptıkları bir çalışmada *B.abortus* LPS ve OPS antijenlerini lipozom ile enkapsüle ederek 15-16 gr ağırlığındaki dişi BALB/c farelerinde 0,1 ve 5. haftalarında ortaya çıkan bağışık yanıtı incelemişlerdir⁶. Bu çalışmada, 7:2:1 oranında fosfotidilkolin:kolesterol:fosfotidilserin içeren negatif yüklü lipozom formülasyonu kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda LPS verilen ve lipozom ile enkapsüle edilmiş LPS verilen farelerdeki IgG kıyaslandığında, lipozom ile enkapsüle edilmiş LPS verilen farelerde diğer gruba kıyasla dört kat daha fazla artış olduğu ve lipozom ile enkapsüle edilmiş LPS verilen farelerdeki antikor titresinin sekiz kez daha yavaş azaldığı saptanmıştır⁶.

Vitas ve ark.ları, yaptıkları çalışmada 7:3:0.5M oranlarında fosfotidilkolin:kolesterol:stearilamin ile hazırladıkları lipozom formülasyonu ile kaplanmış *B.abortus* ve *B.melitensis* HS ekstraktının enfeksiyon öncesi ve sonrası farelerde oluşturduğu bağışık yanıtı araştırmışlar ve enfeksiyondan 1 gün önce ve 2 gün sonra koruyucu olduğunu ancak 10 gün sonra koruyucu olmadığını

bildirmişlerdir⁷³. Ayrıca yayınlarında LPS'in lipozomla verildiğinde toksisitesinin de daha düşük olduğunu bildirmişlerdir⁷³.

Bizim çalışmamızda da 10mg kolesterol ve 10mg DPPC içeren lipozom formülasyonu ile kaplanmış *Brusella* dış membranı, antijen olarak kullanılmış ve lipozomla kaplanmış antijenin oluşturduğu bağışık yanıtın yalnızca antijen verildiğinde oluşan bağışık yanıtla kıyasla daha güçlü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca “canlı attenüe *Brucella melitensis* REV-1 aşısı” verilen ve “lipozomla kaplanmış *Brusella* dış membranı” verilen gruplar arasında da oluşan antikor titresi bakımından anlamlı bir fark olması çalışmamızda elde edilen lipozomla kaplanmış *Brusella* dış membranının şu anda ülkemizde uygulanmakta olan canlı attenüe aşısı oranla daha yüksek bağışık yanıt oluşturduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda *Brusella* dış membranı ekstrakte (HS ekstrakt) edilmiş ve bu ekstraktta var olduğu bilinen OMP'lerinin varlığı SDS-PAGE analizi ile gösterilmiştir. SDS-PAGE sonuçlarında da görüldüğü gibi elde ettiğimiz ve antijen olarak kullandığımız dış membran ekstraktında *Brusella* OMP 25-27kDa aralığında 2 majör protein, 19kDa ve 10kDa ağırlığında 2 minör protein ve diğer bazı proteinler tespit edilmiştir.

Delpino ve ark. 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada koyun brusellozunun tanısında kullanılmak üzere, *brusella* sitoplazmik fraksiyonunda yer alan CP24 proteinini önermişler ancak ELISA ile yaptıkları çalışma sonucunda ilginç olarak *brusella* taşımayan hayvanlarda yüksek antikor seviyesi saptanırken, bruselloz olan hayvanlarda çok düşük düzeyde antikor cevabı tespit edilmiştir. Çalışmada bunun nedeninin *E.coli*, *Haemophilus influenza* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da da bulunan benzer sitoplazmik proteinler ile çapraz reaksiyon

sonrası geliştiğinin düşünüldüğü bildirilmiştir⁷⁷. Gram negatif bakterilerde bulunan dış membran gerek OPS içeriği gerekse OMP'leri nedeniyle, diğer hücre komponentlerine kıyasla daha antijenik bir yapıya sahip olduğundan çalışmamızda sitoplazmik proteinler ya da diğer hücre komponentleri yerine, antijen olarak, dış membran tercih edilmiştir.

Çalışmamızda *Brucella melitensis* REV-1 aşısı suşunun hücre membranını izole edilerek lipozom ile kaplanmış ve farelerde oluşturduğu sıvısal bağışık yanıt araştırılmıştır. Elde edilen ekstraktın brusella hücre membranını olduğunu doğrulamak için SDS-PAGE, TLC ve Wright aglütinasyon yöntemleri kullanılmıştır. SDS-PAGE yöntemi ile dış membran proteinlerinin varlığı, TLC yöntemiyle fosfolipitlerin varlığı ve Wright aglütinasyon yöntemi ile de S-LPS varlığı doğrulanmıştır.

SDS-PAGE bulgularına göre elde edilen ekstratımız 25-27kDa aralığında 2 majör, 19kDa ve 10kDa ağırlığında 2 minör OMP'nini içermektedir. Bu proteinler Brusella dış membranına ait proteinlerdir^{17,24}.

TLC bulgularına göre, elde edilen ekstrakt içerisinde Brusella dış membranında bulunan lipitlere rastlanmıştır.

Wright aglütinasyon sonucunda; yalnızca “*Brucella melitensis* dış membranı” verilen grupta antikor titreleri 1/640, 1/80, 1/1280, 1/1280, 1/640, 1/640, 1/640 ve 1/1280 olmak üzere yaklaşık ortalama 1/800 olarak bulunmuştur. Tanıda 1/160 ve üzerindeki titreler anlamlı kabul edildiğinden¹⁹ bu değer oldukça yüksektir. Boş lipozom verilen ve serum fizyolojik verilen kontrol gruplarındaki antikor titrelerinin sıfır olması beklenen bir sonuçtur. Ancak çalışmamız sonucunda “Lipozomla kaplanmış *Brucella melitensis* REV-1 aşısı” verilen grupta

da antikor titresi sıfır olarak bulunmuştur. Bunun nedeninin canlı attenüe aşısı suşunun çok büyük bir molekül olmasından dolayı lipozomun dışına salınamaması olduğu düşünülmektedir. Ancak bu konuda ileri çalışmalar yapılması gerekliliği açıktır. “*Brucella melitensis* REV-1 aşısı” verilen grupta, beklenildiği gibi ortalama olarak yaklaşık 1/1200 değerinde antikor titresi saptanmıştır. “Lipozomla kaplanmış *Brucella melitensis* dışı membranı” verilen grupta ise beklenildiği gibi 1/2560, 1/5120, 1/2560, 1/5120, 1/1280, 1/5120, 1/5120, 1/1280 ve 1/5120 olmak üzere çok yüksek antikor titreleri tespit edilmiştir. İstatistiksel analiz sonuçlarında da belirtildiği gibi diğer gruplarla karşılaştırıldığında da anlamlı olan bu sonuç elde ettiğimiz Brusella dışı membranına ait HS ekstraktının farelerde bağışık yanıt oluşturmak bakımından başarılı olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, farelerde sıvısal bağışık yanıt oluşturmayı amaçlayan çalışmamızın sonuçlarının subunit Brusella aşısı geliştirme çabaları içerisinde yer alabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte elbette değişik lipozom formülasyonları ve Brusella dışı membranına ait değişik ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak, yapılan bu çalışmanın geliştirilmesi gerekliliği açıktır. Ayrıca Brusella gibi hücre içinde yaşamını sürdüren bir bakteriye karşı oluşan bağışık yanıtın araştırılmasında farelerde oluşan sıvısal bağışık yanıtın yanısıra hücresel bağışık yanıt da çalışmaya eklenmelidir.

KAYNAKLAR

1. İyisan A.S., Akmaz Ö., Gökçen S., Ersoy Y. ve ark., “Türkiye’de Sığır ve Koyunlarda Brucellosis’in Epidemiyolojisi”, Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg., 31(1): 21-75. (2000)
2. Marin C., Barberan M., Jimenez de Babuez M.P., Blasco J.M., “Comparison of Subcutans and Conjunktival Routes of REV-1 Vaccination for the Prophylaccis of *Brucella ovis* Infection of Rams”, Res. Vet. Sci., 48: 209-215. (1990)
3. Elberg S.S., “REV-1 *Brucella melitensis* Vaccine”, Vet. Bull., 51: 67-73. (1981)
4. Alving C.R., Richard R.L., Moss J., Alving I.L, Clemens J.D., Shiba T., Kotani S., Wirtz R.A., Hockmeyer W.T., “Effectiveness of Liposomes as Potential Carriers of Vaccines. Applications to Cholera Toxin and Human Malaria Sporozoite Antigen”, Vaccine, 4: 166-172. (1986)
5. Richard R.A., Wirtz R.A., Hockmeyer W.T., Alving C.A., “Development of Liposomes as Carriers for Human Malaria Peptid Vaccine. In: Liposomes as Drug Carriers”, Recent Trends and Progress (Gregoriadis G., Ed.): 235-241, John Wiley and Sons, New York. (1998)
6. Wong J.P., Cherwonogrodzky J.W., Di Ninno V.L., Stadnyk L.L., Knodel M.H., “Liposome Potentiation of Humoral Immune Responce to Lipopolysaccharide and O-Polysaccharide Antigens of *Brucella abortus*”, Immunology, 77: 123-128. (1992)
7. Vemulapalli R., He Y., Cravero S., Sriranganathan N., Boyle S.M., Schurig G.G., “Overexpression of Protective Antigen as a Novel Approach to Enhance

Vaccine Efficacy of *Brucella abortus* Strain RB51”, Infect. Immun., 68(6): 3286-3289. (2000)

8. Ustaçelebi Ş., “Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Brusella” (Baysal B., Ed.): 571-577, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara. (1999)

9. Deqiu S., Donglou X., Jiming Y., “Epidemiology and Control of Brucellosis in China”, Vet. Med., 90: 165-182. (2002)

10. World Health Organization Emerging and other Communicable Diseases Surveillance and Control, “The Development of New/Improved Brucellosis Vaccines: Report of WHO Meeting: WHO/EMC/ZDI/98.14”, 11-12 December, Geneva, Switzerland. (1997)

11. Baldi P.C., Velikovski C.A., Braden B.C., Giambartolomei G.H., Fossati C.A., Goldbaum F.A., “Structural, Functional and Immunological Studies on a Polymeric Bacterial Protein”, Brazilian J. Med. Biol. Res., 33: 741-747. (2000)

12. Cloeckaert A., Tibor A., Zygmunt M.S, “Brucella Outer Membrane Share Antigenic Determinants with Bacteria of the Rhizobiaceae”, Clin. Diagn. Lab. Immun., 6(4): 627-629. (1999)

13. Baron S., “Medical Microbiology. In: Bacteriology” (Alton G.G., Forsyth J.R.L., Ed.): 4th Edition, www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mmed.chapter.1537 (2005)

14. Hacettepe Üniversitesi, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Ders Notları, Hacettepe Taş Kitapçılık, Ankara. (1995)

15. Tryland M., Sorensen K.K., Godfroid J., “Prevalence of *Brucella pinnipediae* in Healthy Hooded Seals (*Cystophora cristata*) from the North Atlantic Ocean

and Ringed Seals (*Phoca hispida*) from Svalbard”, Vet. Microbiol., 105: 103-111. (2005)

16. Stevens M.G., Olsen S.C., Palmer M.V., Pugh G.W., “Immune Responses and Resistance to Brucellosis in Mice Vaccinated Orally with *Brucella abortus* RB51”, Infect. Immun., 64(11): 4534-4541. (1996)

17. Limet J.N., Cloeckaert A., Bezard G., Broeck J.V., Dubray G., “Antibody Response to the 89kDa Outer Membrane Protein of *Brucella* in Bovine Brucellosis”, J. Med. Microbiol., 39: 403-407. (1993)

18. Yalınay Çırak M., “Değişik *Brucella* Antijenik Fraksiyonlarının Kullanıldığı İndirekt Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Yönteminin Bruselloz Tanısındaki Değeri”, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara. (1997)

19. Bilgehan H., “Klinik Mikrobiyoloji”, 10. Baskı, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir. (2000)

20. Bilgehan H., “Klinik Mikrobiyolojik Tanı”, 4. Baskı, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir. (2004)

21. Lapaque N., Moriyon I., Moreno E., Gorvel J.P., “*Brucella* Lipopolysaccharide Acts as a Virulence Factor”, Curr. Opin. Microbiol., 8: 60-66. (2005)

22. Nielsen K., Smith P., Widdison J., Gall D., Kelly L., Kelly W., Nicoletti P., “Serological Relationship between Cattle Exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7”, Vet. Microbiol., 100: 25-30. (2004)

23. Cassataro J., Pasquevich K., Bruno L., Wallach J.C., Fossati C.A., Baldi P.C.,
“Antibody Reactivity to OMP31 from *Brucella melitensis* in Human and Animal
Infections by Smooth and Rough Brucellae”, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 11(1):
111-114. (2004)
24. Douglas J.T., Rosenberg E.Y., Nikaido H., Verstrete D.R., Winter A.J.,
“Porins of *Brucella* Species”, Infect. Immun., 44(1): 16-21. (1984)
25. Levinson W., Jawetz E., “Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmunoloji”, Özgönen T
(Çeviri Ed.), 1. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara. (2001)
26. Dokuzoğuz B., Ergönül Ö., Baykam N., Esener H., Kılıç S., Çelikbaş A., Eren
Ş., Esen B., “Characteristics of *B.melitensis* versus *B.abortus* Bacteremias”, J.
Infect., 50: 41-45. (2005)
27. Koçak İ., Dündar M., Çulhacı N., Ünsal A., “Relapse of Brucellosis
Stimulating Testis Tumor”, Int. J. Urol., 11: 683-685. (2004)
28. Gündes S., Meriç M., Willke A., Erdenliç S., Koç K., “A Case of Intracranial
Abscess due to *Brucella melitensis*”, Int. J. Infect. Dis., 8: 379-381. (2004)
29. Ataman Hatipoğlu Ç., Yetkin A., Tuncer Ertem G., Tülek N., “Unusual
Clinical Presentations of Brucellosis”, Scand. J. Infect. Dis., 36: 694-697. (2004)
30. Serre A., Bascoul S., Vendrell J.P., Cannat A., “Human Immun Responce to
Brucella Infection”, Ann. Inst. Pasteur Microbiol., 138(1):113-7. (1987)
31. Özbal Y., “Temel İmmunoloji”, 2. Baskı, Nobel Kitabevi, İstanbul. (2000)
32. Madigan., Martinko., Parker., “Biology of Microorganisms”, 8th Edition,
Prentice Hall, Carbondale. (1999)
33. Gülmezoğlu E., “Bağışıklığın Temelleri”, 3. Baskı, Hacettepe Üniversitesi
Yayınları, Ankara. (1983)

34. Golding B., Scott D.E., Scharf O., Huang L.Y., Zaitseva M., Lapham C., Eller N., Golding H., "Immunity and Protection Against *Brucella abortus*", *Microbes Infect.*, 3: 43-48. (2001)
35. Oliveira S.C., Soeurt N., Splitter G., "Molecular and Cellular Interactions between *Brucella abortus* Antigens and Host Immune Responses", *Vet. Microbiol.*, 90: 417-424. (2002)
36. Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü Aşı Prospektüsleri, [http:// pendik. vet. gov. tr/ asiprospektusleri. html](http://pendik.vet.gov.tr/asiprospektusleri.html) (2003)
37. Joshi P.A., Kulkarni R.D., Powar R.M., "Modified Cold Z-N Staining for Presumptive Identification of *Brucella*", *Indian J. Med. Res.*, 121: 108-110. (2005)
38. Navarro E., Casao M.A., Solera J., "Diagnosis of Human Brucellosis Using PCR", *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, 4(1): 115-123. (2004)
39. Gültekin M., "Brusellozda Serolojik Değerlendirme", *Antimikrobiyal Tedavi Bülteni*, 4: 31-33. (2000)
40. Delpino M.V., Fossati C.A., Baldi P., "Occurence and Potential Diagnostic Applications of Serological Cross-Reactivities between *Brucella* and Other Alpha-Proteobacteria", *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 11(5): 868-873. (2004)
41. Fekete A., Bantle J.A., Halling S.M., Sanborn M.R., "Preliminary Development of a Diagnostic Test for *Brucella* Using Polymerase Chain Reaction", *J. Appl. Bacteriol.*, 69: 216-227. (1990)
42. Herman L., De Ridder H., "Identification of *Brucella* spp. By Using the Polymerase Chain Reaction", *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 615-617. (1995)

43. Baily G.C., Kraahn J.B., Drasar B.S., Stooker N.G., "Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA Amplification", J. Trop. Med. Hyg., 95: 271-275. (1992)
44. Da Costa M., Guilloi J.P., Garin B., Thiebajud M., Dubray G., "Specificity of Six Gene Sequences for the Detection of the Genus *Brucella* by DNA Amplification", J. Appl. Bacteriol., 81: 267-275. (1996)
45. Baykam N., Esener H., Ergönül Ö., Eren Ş., Çelikbaş A., Dokuzoğuz B., "In Vitro Antimicrobial Susceptibility of *Brucella* Species", Int. J. Antimicrob. Chem., 23: 405-407. (2004)
46. Pappas G., Seitaridis S., Akritidis N., Tsianos E., "Treatment of *Brucella* Spondylitis: Lessons From an Impossible Meta-analyses and Initial Report of Efficacy of a Fluoroquinolone-Containing Regimen", Int. J. Antimic. Agent., 24: 502-507. (2004)
47. Vitas A., Diaz R., Gamazo C., "Effect of Composition and Method of Preparation of Liposomes on Their Stability and Interaction with Murine Monocytes Infected with *Brucella abortus*", Antimic. Agent. Chem., 40(1): 146-151. (1996)
48. 1593 Sayılı Umumi Hıfzıssıha Kanuna Göre İhbarı Zorunlu Hastalıklar, <http://www.infeksiyon.org/Detail.asp?ctg=25&Article=395> (2005)
49. Brucellosis: ODH IDCM Section 3, www.odh.ohio.gov/pdf/IDCM/bruc.pdf (2004)
50. Noviello S., Gallo R., Kelly M., Limberger R.J., Angelis K., Cain L., Wallace B., Dumas N., "Laboratory Acquired Brucellosis", Emerg. Infect. Dis., 10: 1848-1850. (2004)

51. Robichaud S., Libman B., Behr M., Rubin E., "Prevention of Laboratory Acquired Brucellosis", Clin. Infect. Dis., 38: 119-122. (2004)
52. Ergönül Ö., Çelikbaş A., Tezeren D., Güvener E., Dokuzoğuz B., "Analysis of Risk Factors for Laboratory Acquired Brucella Infections", J. Hosp. Inf., 56: 223-227. (2004)
53. Ertem M., Kürekçi A.E., Aysev D., Ünal E., İkinciogulları A., "Brucellosis Transmitted by Bone Marrow Transplantation", Bone Marrow Transplant., 26(2): 225-226. (2000)
54. Doğanay M., Aygen B., Eşel D., "Brucellosis Due to Blood Transfusion", <http://www.idealibrary.com> on IDEAL. (2001)
55. Palandüz A., Palandüz S., Güler K., Güler N., "Brucellosis in a Mother and Her Young Infant: Probable Transmission by Breast Milk", Int. J. Infect. Dis., 4(1): 55-56. (2000)
56. Wyatt H.V., "*Brucella melitensis* can be Transmitted Sexually", Lancet, 337(8745): 848-849. (1991)
57. Giannacopoulos I., Eliopoulou M.I., Ziambaras T., Papanastasiou D.A., "Transplacentally Transmitted Congenital Brucellosis Due to *Brucella abortus*", J. Infect., 45(3): 209-210. (2002)
58. Monreal D., Grillo M.J., Gonzales D., Marin C.M., Miguel M.J., Lopez-Goni I., Blasco J.M., Cloeckert A., Moriyon I., "Characterization of *Brucella abortus* O-Polysaccharide and Core Lipopolysaccharide Mutants and Demonstration that a Complete Core is Required for Rough Vaccines to be Efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in Mouse Model", Infect. Immun., 71(6): 3261-3271. (2003)

59. Covert J., Eskra L., Splitter G., "Isolation of *Brucella abortus* total RNA from *B. abortus* Infected Murine RAW Macrophages", J. Microbiol. Method., 60: 383-393. (2005)
60. Moriyon I., Grillo M.J., Monreal D., Gonzales D., Marin C., Lopez-Goni I., Mainar-Jaime R.C., Moreno E., Blasco J.M., "Rough Vaccines in Animal Brucellosis: Structural and Genetic Basis and Present Status", Vet. Res., 35: 1-38. (2004)
61. Minas A., Minas M., Stournara A., Tselepidis S., "The Effects of REV-1 Vaccination of Sheep and Goats on Human Brucellosis in Greece", Prev. Vet. Med., 64: 41-47. (2004)
62. Crouch D., Elberg S.S., "Response of the Vaccine Strain of *Brucella melitensis* REV 1 to Erythritol", J. Bacteriol., 94(5): 1793-1794. (1967)
63. Palmer M.V., Cheville N.F., "Effects of Oral or Intravenous Inoculation with *Brucella abortus* strain RB51 Vaccine in Beagles", Am. J. Vet. Res., 58: 851-856. (1997)
64. Ashford D.A., Pietra J., Lingappa J., Woods C., Noll H., Neville B., Weyant R., Bragg S.L., Spiegel R.A., Tappero J., Bradley A.P., "Adverse Events in Humans Associated with Accidental Exposure to the Livestock Brucellosis Vaccine RB51", Vaccine, 22: 3435-3439. (2004)
65. Izadjoo M.J., Bhattacharjee A.K., Parnavitana C.M., Hadfield T.L., Hoover D.L., "Oral Vaccination with *Brucella melitensis* WR201 Protects Mice Against Intranasal Challenge with Virulent *Brucella melitensis* 16M", Infect. Immun., 72(7): 4031-4039. (2004)

66. Hoover D.L., Borschel R.M., Mense M.G., Bhattacharjee A.K., “Vaccination Against Brucella, A Bioware Threat Agent”, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NCR Publications. (1996)
67. Russo P., “Recombinant Brucellosis Vaccine Development Using Bacterial Salmonella Vector Expressing Brucella Protective Antigens”, ISTC Project: 2446 (Registered). (2005)
68. Kaynar Ö., “*Theileria annulata* Piroplazma Membran Proteinlerinde Lektin Aktivitesinin Araştırılması”, Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Elazığ. (2003)
69. <http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/tlc.htm>
70. http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/2003/hull_pearson/pearson/thin_layer_chromatography.htm
71. http://www.wellesley.edu/Chemistry/chem211lab/Orgo_Lab_Manual/Appendix/Techniques/TLC/thin_layer_chrom.html
72. Gürsoy A.Z., “Kontrollü Salım Sistemleri”, 1. Baskı, Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj San. Tic. Ltd. Şti., İstanbul. (2002)
73. Vitas A.I., Diaz R., Gamazo C., “Protective Effect of Brucella Outer Membrane Complex-bearing Liposomes Against Experimental Murine Brucellosis”, FEMS Microbiol. Lett., 130: 231-236. (1995)
74. Laemmli UK., “Cleavage of structural proteins during the assemble head of bacteriophage T4”, Nature, 227(15): 680-685. (1970)
75. Heukeshoven J., Dernick R., “Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels”, Electrophoresis, 9(1):28-32. (1988)

76. Weynants V., Gilson D., Cloeckart A., Tibor A., Denoel P.A., Godfroid F., Limet J.N., Letesson J., "Characterization of Smooth Lipopolysaccharides of *Brucella* Species by Competition Binding Assays with Monoclonal Antibodies", *Infect. Immun.*, 65(5): 1939-1943. (1997)
77. Campos E., Cravero S.L., Delgui L., Mora I., Kahn N., Arese A.I., Rossetti O.L., "*Brucella abortus* INTA2, a Novel Strain 19 Δ bp26::luc Δ bmp18 Double Mutant Lacking Drug Resistance", *Vet. Microbiol.*, 87: 1-13. (2002)
78. Leal-Hernandez M., Diaz-Aparicio E., Perez R., Andrade L.H., Arellano-Reynoso B., Alfonseca E., Suarez-Güemes F., "Protection of *Brucella abortus* RB51 Revaccinated Cows, Introduced in a Herd with Active Brucellosis, with Presence of Atypical Humoral Response", *CIMID*, 28: 63-70. (2005)
79. Boschioli M.L., Cravero S.L., Arese A.I., Campos E., Rossetti O.L., "Protection Against Infection in Mice Vaccinated with a *Brucella abortus* Mutant", *Infect. Immun.*, 65(2): 798-800. (1997)
80. Cloeckart A., Jacques I., Grillo M.J., Marin C., Grayon M., Blasco J.M., Verger J.M., "Development and Evaluation as Vaccines in Mice of *Brucella melitensis* REV 1 Single and Double Deletion Mutants of the bp26 and omp31 Genes Coding for Antigens of Diagnostic Significance in Ovine Brucellosis", *Vaccine*, 22: 2827-2835. (2004)
81. Arellano-Reynoso B., Diaz-Aparicio E., Leal-Hernandez M., Hernandez L., Gorvel J.P., "Intracellular Trafficking Study of a RB51 *B. abortus* Vaccinal Strain Isolated from Cow Milk", *Vet. Microbiol.*, 98: 307-312. (2004)

82. Ding X.Z., Bhattacharjee A., Nikolich M.P., Paulsen I.T., Myers G., Seshadri R., Hoover D.L., "Cloning, Expression and Purification of *Brucella suis* Outer Membrane Proteins", *Prot. Express. Purif.*, 40: 134-141. (2005)
83. Jimenes de Bagües M.P., Elzer P.H., Blasco J.M., Marin C.M., Gamazo C., Winter A.J., "Protective Immunity to *Brucella ovis* in BALB/c Mice Following Recovery from Primary Infection or Immunization with Subcellular Vaccines", *Infect. Immun.*, 62(2): 632-638. (1994)
84. Estein S.M., Cassataro J., Vizcaino N., Zygmunt M., Cloeckert A., Bowden R.A., "The Recombinant OMP31 from *Brucella melitensis* Alone or Associated with Rough Lipopolysaccharide Induces Protection Against *Brucella ovis* Infection in BALB/c Mice", *Microbes. Infect.*, 5: 85-93. (2003)
85. Estein S.M., Cheves P.C., Fiorentino M.A., Cassataro J., Paolicchi F.A., Bowden R.A., "Immunogenicity of Recombinant OMP31 from *Brucella melitensis* in Rams and Serum Bactericidal Activity Against *B. ovis*", *Vet. Microbiol.*, 102: 203-213. (2004)

ÖZET

Bruselloz dünyanın pek çok ülkesinde yaygın ve ekonomik yönden önemli bir zoonotik hastalıktır. Ülkemizde brusellozla mücadele, hayvanların aşılınması ile yapılmaktadır. Koyunlar için *Brucella melitensis* REV-1 aşısı kullanılmaktadır. Daha yüksek etkili, yan etkisi az, insanlara da uygulanabilecek olan yeni ve etkili aşı türlerinin araştırılmasına ve geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada brusella dış membran antijenlerinin, optimum etkiye sahip lipozom formülasyonu ile birleştirilerek uzun etkili antijenik uyarım sağlamaya, yüksek immunolojik değerde brusella aşısı hazırlanması ve geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda *Brucella melitensis* REV-1 aşı suşunun hücre membranı izole edilerek lipozom ile kaplanmış ve farelerde oluşturduğu sıvısal bağışık yanıt Wright aglütinasyon yöntemi ile antikor titrelerine bakılarak araştırılmıştır.

İstatistiksel analiz sonuçları, Brusella dış membranına ait ekstraktın farelerde bağışık yanıt oluşturmak bakımından başarılı olduğunu göstermektedir. Yalnızca “Brusella Dış Membranı” verilen ve “lipozomla kaplanmış Brusella dış membranı” verilen gruplar arasında ve “canlı attenüe *Brucella melitensis* REV-1 aşısı” verilen ve “lipozomla kaplanmış Brusella dış membranı” verilen gruplar arasında antikor titresi bakımından anlamlı bir farklılık saptanmıştır.

Sonuç olarak, farelerde sıvısal bağışık yanıt oluşturmaya amaçlayan çalışmamızın sonuçlarının subunit Brusella aşısı geliştirme çabaları içerisinde yer alabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte elbette değişik lipozom

formülasyonları ve Brusella dış membranına ait değişik ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak, yapılan bu çalışmanın geliştirilmesi gerekliliği açıktır.



YABANCI DİLDE ÖZET

Brucellosis is an economically important zoonotic disease that is widespread all over the world. In our country the prevention has been made by vaccination of animals. For ewes *Brucella melitensis* REV-1 vaccine has been used. A more attractive vaccine with less side effect is need to be improved and should be applied to human.

In this study it was aimed to determine a strong immune mediated *Brucella* vaccine by encapsulating the Brucellar outer membrane antigens with the optimum liposome formulation.

In our study the outer membrane of the *Brucella melitensis* REV-1 vaccine strain was isolated and encapsulated with liposome and the humoral immune response in mice was investigated by examining the antibody titers with Wright agglutination method.

The statistical analyses show that the *Brucella* outer membrane extract is successful for having humoral immune response in mice. Between the groups “*Brucella* outer membrane” and “*Brucella* outer membrane encapsulated with liposome” and between the groups “Live attenuated *Brucella melitensis* REV-1 vaccine” and “*Brucella* outer membrane encapsulated with liposome” statistically significant difference was determined in case of antibody titers.

As a result it is thought that the results of our study that aimed to investigate humoral immune response in mice, have thought to be with the investigations that are trying to determine a subunit *Brucella* vaccine. However,

the study has to be improved with different liposome formulations and different extraction methods of Brucella outer membrane.



ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Ankara’da doğdu. İlköğrenimini Kahramanmaraş-Afşin’de, Ortaöğrenimini Ankara Özel Arı Lisesi’nde tamamladı. 1996 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2000 yılında mezun oldu. 1999 yılında Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında 1 (bir) ay süre ile staj yaptı.

2000 yılında Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı ve 2002 yılında “Servikal Örneklerde Karsinojenik Human Papilloma Virüs (HPV) Tiplerinin Hibrit Capture Yöntemi ile Araştırılması ve Diğer Parametrelerle Kıyaslanması” adlı yüksek lisans tezi ile mezun oldu. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başladı. Halen aynı Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine devam etmektedir.

2002 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Halen aynı Anabilim Dalı’nda görevine devam etmektedir.

Yurt içi hakemli dergilerde yayınlanan üç (3), yurt dışı hakemli dergilerde yayınlanan bir (1) bilimsel makalesi ve yurt içi ve yurt dışı kongrelerde sunulan on (10) bildirisi mevcuttur.

Yabancı dili İngilizcedir.