

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'NİN FARKLI COĞRAFİK BÖLGELERİNDEN İZOLE  
EDİLEN *BRUCELLA MELITENSIS* İZOLATLARINDAN ELDE  
EDİLEN ORTAK İMMÜNODOMİNANT PROTEİNLERİN  
İMMÜNOPROTEOMİK YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI**

Hüseyin UZUNER

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Mikrobiyoloji Programı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ  
2020



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'NİN FARKLI COĞRAFİK BÖLGELERİNDEN İZOLE  
EDİLEN *BRUCELLA MELITENSIS* İZOLATLARINDAN ELDE  
EDİLEN ORTAK İMMÜNODOMİNANT PROTEİNLERİN  
İMMÜNOPROTEOMİK YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI**

Hüseyin UZUNER

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Mikrobiyoloji Programı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ

Bu Çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
(Proje No: 2017/34) Tarafından Desteklenmiştir.  
Etik Kurul Onay No: KÜ GOKAEK 2019/10.13

KOCAELİ  
2020

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Türkiye'nin Farklı Coğrafik Bölgelerinden İzole Edilen *Brucella melitensis* İzolatlarından Elde Edilen Ortak İmmünodominant Proteinlerin İmmünoproteomik Yöntemle Araştırılması

Tez Yazarı: Hüseyin UZUNER

Tez Savunma Tarihi: 07.01.2020

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ

Bu çalışma, sınav kurumumuz tarafından Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		
ÜNVANI	ADI SOYADI	İMZA
BAŞKAN (ÜYE)	Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI	
DANIŞMAN	Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ	
ÜYE	Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ	
ÜYE	Prof. Dr. Çağrı ERGİN	
ÜYE	Prof. Dr. Murat HÖKELEK	
ÜYE	Prof. Dr. Murat KASAP	

### Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

.... /.... /20...

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ  
KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### **Türkiye'nin Farklı Coğrafik Bölgelerinden İzole Edilen *Brucella melitensis* İzolatlarından Elde Edilen Ortak İmmünodominant Proteinlerin İmmünoproteomik Yöntemle Araştırılması**

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden izole edilmiş *Brucella melitensis* izolatlarının, ortak immünojen protein varlığı açısından immünoproteomik bir teknik olan AMIDA yöntemi ile araştırılmasıdır.

**Yöntem:** Brusella izolatları koyun kanlı agar besiyerinde üretildi. İzolatların tanımlanması için PZR işlemi gerçekleştirildi. Brusella'nın ortak immünodominant proteinlerinin tespit edilebilmesi için tüm izolatlardan membran protein izolasyonu yapıldı. Bruselloz geçirmiş 25 insan serumu karıştırılarak serum havuzu oluşturuldu. Serum havuzunda bulunan antikorlar Protein-G kolonu kullanılarak saflaştırıldı. Bu antikorlar immünoproteomik analiz (AMIDA) gerçekleştirmek amacıyla manyetik boncuklar üzerine kaplandı. Brusella izolatlarından elde edilen membran proteinleri ile manyetik boncuk üzerine kaplanan antikorlar immünyakalama tekniği ile karşılaştırıldı. Manyetik boncuk üzerindeki antikorlara bağlanan Brusella antijenleri Nano LC-MS/MS cihazı ile tanımlandı. Dört farklı Brusella izolatının immünyakalama reaksiyonu sonucunda tanımlanan proteinler analiz edilerek ortak immünodominant proteinler belirlendi.

**Bulgular:** *B. melitensis* 1062 izolatından 66, *B. melitensis* 1177 izolatından 65, *B. melitensis* 5031 izolatından 47, *B. melitensis* 5112 izolatından ise 44 immünodominant protein tanımlandı. "Bacterioferritin (Bfr)" proteininin *B. melitensis* 1062, 1177 ve 5112 izolatlarında, "sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB" proteininin ise *B. melitensis* 1062 ve 1177 izolatlarında ortak immünodominant protein olduğu tespit edildi.

**Sonuç:** Bu tez çalışması ile *B. melitensis* izolatlarındaki Bfr proteininin insanlarda potansiyel immünojen bir protein olduğu gösterilmiştir. Literatürde Bfr ve UgpB proteinleri veya bunların gen bölgeleriyle ilgili yapılmış ve insandaki brusellozun serolojik tanısında kullanımı veya aşılama için aday olmasıyla ilgili veriler kısıtlıdır. Bfr proteininin insan brusellozunun serolojik tanısında kullanılabilme potansiyelinin olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Brucella melitensis*, immünoproteomik, AMIDA, Bfr, UgpB

## ABSTRACT

### **Investigation of Common Immunodominant Proteins Extracted from *Brucella melitensis* Species Isolated from Different Geographic Regions of Turkey Using an Immunoproteomic Method**

**Objective:** The aim of this study was to investigate the immunogen proteins of *Brucella melitensis* isolates that were collected from various geographic regions of Turkey by using an immunoproteomics technique called AMIDA.

**Method:** *Brucella* isolates were grown on sheep blood agar medium. PCR was performed to characterise the isolates. Membrane protein isolation procedure was performed with each isolate for the purpose of determine the common immunodominant proteins. A serum pool was formed by mixing 25 human sera which had brucellosis. Antibodies which found in serum pool were purified through protein G column. The antibodies were coated on magnetic beads to perform immunoproteomic analysis (AMIDA). The antibody-coated magnetic beads and the membrane proteins isolated from *Brucella* isolates were co-incubated for immunecapturing to occur. *Brucella* antigens which was captured by the antibody-coated beads were identified by Nano LC-MS/MS. The identified proteins were analyzed and common immunodominant proteins from *Brucella* isolates were determined.

**Results:** Sixty-six, 65, 47 and 44 immunodominant proteins were identified from *B.melitensis* 1062, 1177, 5031 and 5112 isolates, respectively. "Bacterioferritin" was determined to be a common immunodominant protein for *B. melitensis* 1062, 1177 and 5112 isolates and "sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB" was determined to be the common immunodominant protein for *B. melitensis* 1062 and 1177 isolates.

**Conclusions:** In this study, Bfr from *B. melitensis* was shown to be a potential immunogenic protein that may create an immunogenic response in human. There is limited data in the literature regarding Bfr and UgpB proteins and the gene sequences encoding them. Their potential use in serological diagnosis or for vaccination in human brucellosis have not been explored as well. Bfr protein may have the potential to be used for the serological diagnosis of human brucellosis.

**Keywords:** *Brucella melitensis*, immunoproteomics, AMIDA, Bfr, UgpB

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilimsel ve sosyal hayattaki tecrübelerinden yararlandığım ve birçok konuda kendisini örnek aldığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ'ye çalışmanın planlanmasından sunulmasına kadar geçen süreçteki yol göstericiliği, motive edici yaklaşımı ve sonsuz desteği için teşekkür ederim.

Tez İzleme Komitesi'ndeki değerli hocalarım Prof. Dr. Murat KASAP ve Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI'ya çalışmaya olan kıymetli bilimsel katkılarından ve paylaştıkları deneyimlerinden ötürü teşekkürü borç bilirim. Bana Proteomik laboratuvarı kapısını sonuna kadar açan hocam Prof. Dr. Murat KASAP'a ayrıca teşekkür ederim.

Çalışmada kullandığım izolatların ve serumların temin edilmesinde gösterdiği engin hoşgörüsü ve desteği için Doç. Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK'e şükranlarımı sunarım.

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma doktora eğitimim süresince vermiş oldukları değerli destekleri için çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca yardım, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Arş. Gör. Mehmet SARIHAN ve Arş. Gör. Kübra KARAOSMANOĞLU YÖNETEN ile Protomiks Laboratuvarı'nın diğer tüm asistanlarına teşekkürü borç bilirim.

Lisansüstü eğitimim boyunca beraber çalıştığım Arş. Gör. Dr. Doğanhan Kadir ER başta olmak üzere Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm asistan arkadaşlarıma ve maddi/manevi desteğini hissettiren Tıbbi Lab. Tek. Özkan KIZILAĞIL'a hoşgörülerini ve destekleri için teşekkür ederim.

Çalışmanın gerçekleşmesinde sağladığı maddi destekleri (Proje No: 2017/34) için üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Gösterdikleri insanüstü fedakarlık ve hoşgörü ile bugünlere gelmemi sağlayan, koşulsuz desteklerini hep arkamda hissettiğim annem Gülsen, babam Mehmet Kamil başta olmak üzere tüm aileme teşekkürü borç bilirim.

Ve her şeyden öte, aile olduğumuz ilk günden bugüne kadar kahrımı çeken, varlıkları ile hayatıma renk katan, motivasyon kaynaklarım biricik eşim Hilal ve oğlum Yiğit Ege'ye, zorlu doktora eğiminin sürecinde gösterdikleri sınırsız anlayış, sevgi ve gösterdikleri büyük fedakarlıklar için teşekkür ederim.

## BEYAN

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Türkiye'nin Farklı Coğrafik Bölgelerinden İzole Edilen *Brucella melitensis* İzolatlarından Elde Edilen Ortak İmmünodominant Proteinlerin İmmünoproteomik Yöntemle Araştırılması” başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir / hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar Turnitin intihal programı kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

...../...../.....

Hüseyin UZUNER

İmza



## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
BEYAN .....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER.....	xiii
TABLOLAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Brusella'nın Genel Özellikleri.....	1
1.2. Virülans Faktörleri .....	3
1.2.1. Lipopolisakkarit.....	3
1.2.2. Tip 4 Sekresyon Sistemi .....	4
1.2.3. İki Bileşenli BvrR / BvrS sistemi (Two-Component System-TCS) .....	4
1.2.4. Siklik $\beta$ -1,2 Glukan.....	5
1.2.5. Süperoksit Dismutaz.....	5
1.2.6. Katalaz .....	5
1.2.7. Üreaz .....	6
1.2.8. Diğer Virülans Faktörleri .....	6
1.3. Brusella'nın İnsana Bulaşı .....	7
1.4. Brusella'nın Patogenezi .....	7
1.5. Bruselloz Kliniği.....	9
1.6. Bruselloz'un Tanısı .....	10
1.6.1. Kültür .....	10
1.6.2. Serolojik Testler.....	16
1.6.3. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT).....	22
1.7. Türkiye'de ve Dünya'da Brusellozun Önemi.....	23
1.8. Brusella ile İlgili Proteom Çalışmaları.....	23
1.9. Brusella Aşı Çalışmaları.....	25

1.10. İmmünoproteomik Yöntemler .....	27
2. AMAÇ .....	29
3. YÖNTEM .....	31
3.1. Brusella İzolatlarının Tanımlanması .....	31
3.2. Brusella'dan Membran Proteini İzolasyonunun Yapılması ve Gösterilmesi .....	34
3.2.1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması.....	34
3.2.2. Membran Proteinlerinin İzole Edilmesi .....	37
3.2.3. Proteinlerin Temizlenmesi ve Çöktürülmesi.....	40
3.2.4. Kera-free SDS-PAGE ile Protein Bantlarının Görüntülenmesi.....	40
3.2.5. İzole Edilen Membran Proteinlerinin MALDI/TOF-TOF-MS Analizi ile Gösterilmesi .....	43
3.2.6. Nano LC-MS/MS Analizi ile Membran Protein İzolasyon Oranının Belirlenmesi.....	45
3.3. Brusella Pozitif ve Brusella Negatif İnsan Serumlarının Hazırlanması .....	52
3.4. Çalışmada Elde Edilen Brusella'ya ait Proteinler ile Antikor Havuzu Kullanılarak Manyetik Boncuklu İmmünyakalama (MBİ) İşleminin Gerçekleştirilmesi.....	54
3.4.1. Manyetik Boncuklara Antikorların Kaplanması .....	55
3.4.2. Manyetik Boncuklara Antikor Kaplandığının Gösterilmesi .....	56
3.4.3. Manyetik Boncuklu İmmünyakalama İşlemi.....	57
3.5. Nano LC-MS/MS Analizi ile İmmünodominant Proteinlerin Tanımlanması ....	58
3.5.1. Sıvı İçindeki Proteinlerin Tripsin ile Kesimi.....	58
3.5.2. Hazırlanan Örneğin Nano LC-MS/MS Cihazında Analiz Edilmesi .....	59
4. BULGULAR.....	60
4.1. Brusella İzolatlarının Tanımlanması .....	60
4.2. Membran Proteini İzolasyonu .....	61
4.3. Kera-free SDS-PAGE ile Protein Bantlarının Görüntülenmesi .....	62
4.4. Membran Protein İzolasyonunun MALDI/TOF-TOF-MS Analizi ile Gösterilmesi.....	63
4.5. İzole Edilen Membran Proteinlerinin Nano LC-MS/MS Analizi Sonuçları .....	65
4.6. Membran Protein İzolasyon Oranının Belirlenmesi.....	65

4.7. Brusella İzolatlarından İzole Edilen Protein Miktarları.....	67
4.8. Bruselloz Pozitif ve Bruselloz Negatif İnsan Serumlarının Hazırlanması.....	68
4.9. Manyetik Boncuklara Antikorların Kaplanması.....	72
4.10. MBİ İşlemlerinin Nano LC-MS/MS Analizi Sonuçları .....	73
4.10.1. Bruselloz Pozitif Serum Kaplanmış Manyetik Boncuk ve Brusella Proteinleri ile Yapılan MBİ Sonuçları .....	73
4.10.2. Bruselloz Negatif Serum Kaplanmış Manyetik Boncuk ve Brusella Proteinleri ile Yapılan MBİ Sonuçları .....	83
4.10.3. Bruselloz Pozitif Serum Kaplanmış Manyetik Boncuk ve IP Lizis Tamponu ile Yapılan MBİ Sonuçları.....	85
4.11. MBİ Sonuçlarının Analizi .....	85
4.11.1. <i>B.melitensis</i> 1062 MBİ Sonuçları.....	86
4.11.2. <i>B.melitensis</i> 1177 MBİ Sonuçları.....	86
4.11.3. <i>B.melitensis</i> 5031 MBİ Sonuçları.....	87
4.11.4. <i>B.melitensis</i> 5112 MBİ Sonuçları.....	88
4.11.5. <i>B. melitensis</i> İzolatlarında Ortak Olan Proteinler.....	88
5. TARTIŞMA.....	89
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	94
7. KAYNAKLAR .....	95
8. ÖZGEÇMİŞ .....	105
9. EKLER .....	111
EK-1: Etik Kurul Onayı .....	111
EK 2. Nano LC-MS/MS sonucunda elde edilen proteinlerin tahmin edilen lokasyonları .....	114

## SİMGELER ve KISALTMALAR

2D-PAGE: 2 boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi

2-ME: 2-merkaptoetanol

AI: Avidite indeksi

AmBic: Amonyum bikarbonat

AMIDA: Antijenlerin otoantikor aracılığıyla tanımlanması

APS: Amonyum persülfat

BCV: Brusella içeren vakuol

BLAST: Basic local alignment search tool

CDC: Hastalık kontrol ve önleme merkezleri

C $\beta$ G: Siklik beta gluklan

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksiribonükleotid trifosfat

DOC: Sodyum deoksikolat

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

ELISA: Enzim işaretli immunosorbent assay

ER: Endoplazmik retikulum

FASP: Filtre destekli numune hazırlama

FPI: Floresan polarizasyon immünoassay

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

IAA: Iodoasetamit

IP: İmmünopresipitasyon

LC-MS/MS: Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi

LFA: Lateral flow assay

LPS: Lipopolisakkarit

MALDI/TOF-MS: Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu/uçuş zamanı-kütle spektrometresi

MALDI/TOF-TOF-MS: Matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu/uçuş zamanı-uçuş zamanı-kütle spektrometresi

MBİ: Manyetik boncuklu immünyakalama

MHC: Major doku uygunluk kompleksi

NAAT: Nükleik asit amplifikasyon testleri

NO: Nitrik oksit  
NOR: Nitrik oksit redüktaz  
OMP: Dış membran proteini  
OMV: Dış membran vezikülü  
O-LPS: O-lipopolisakkarit  
PAMP: Patojen ilişkili moleküler patern  
PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi  
PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu  
RBT: Rose-bengal testi  
R-LPS: Pürtüklü lipopolisakkarit  
ROI: Reaktif oksijen ara ürünleri  
SDS: Sodyum dedosil sülfat  
SDS-PAGE: Sodyum dedosil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi  
SERPA: Serolojik proteom analizi  
S-LPS: Düz lipopolisakkarit  
SOD: Süperoksit dismutaz  
SPS: Sodyum polianetil sülfonat  
T4SS: Tip 4 sekresyon sistemi  
TBE: Tris-borik asit EDTA  
TCA: Trikloroasetik asit  
TCEP: Tris [2-carboxyethyl] phosphine  
TCS: İki bileşenli sistem  
TEMED: Tetrametiletildiamin  
TFA: Trifloroasetik asit  
TLR: Toll-like reseptör  
TNF- $\alpha$ : Tümör nekroz faktör alfa  
WAT: Wright aglütinasyon testi

## ŞEKİLLER

Şekil 1.1 S-LPS ve R-LPS Brusella'nın ökaryot hücreye girişi .....	4
Şekil 1.2. Brusella'nın makrofaj içerisindeki hücre içi trafiği.. .....	9
Şekil 3.1. Kültür plaklarının jar içerisinde inkübasyonu .....	31
Şekil 3.2. Membran proteini izolasyonu işlemlerinin yapıldığı ortam .....	38
Şekil 3.3. Bakterilerin sonikasyon işlemi ile parçalanması .....	39
Şekil 3.4. Bakterilerin bullet blender cihazında +4°C'de çelik boncuklar ile parçalanması	39
Şekil 3.5. SDS-PAGE elektroforez işlemi .....	42
Şekil 3.6. SDS-PAGE jelinin gece boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmesi .....	42
Şekil 3.7. MALDI/TOF-TOF-MS cihazı .....	43
Şekil 3.8. Örneklerin Speed-Vac cihazı ile kurutulması .....	46
Şekil 3.9. Sonik banyo uygulaması ile sıvıdaki baloncukların uzaklaştırılması .....	47
Şekil 3.10. Nano LC-MS/MS cihazı .....	48
Şekil 3.11. Gneg-mPloc sayfasının görünümü .....	49
Şekil 3.12. Protein kimlik numarası girilen ekran görüntüsü .....	50
Şekil 3.13. Nano LC-MS/MS ile tanımlanan proteinin FASTA formatının görüntülenmesi .....	50
Şekil 3.14. FASTA dizisinin analiz edilmesi. ....	51
Şekil 3.15. Gneg-mPloc ile proteinin hücredeki yerleşim yerinin saptanması. ....	52
Şekil 3.16. NGC cihazı ile antikor saflaştırma işlemi. ....	53
Şekil 3.17. Fraksiyon toplayıcı ile konsantre edilen ve saflaştırılan antikorların toplanması .....	54
Şekil 3.18. Manyetik Dynabead boncuklarının görüntüsü. ....	55
Şekil 3.19. Örneklerin roller karıştırıcıda 37°C'de inkübasyonu .....	56
Şekil 3.20. Çalışma kapsamında yapılan MBİ deneyleri .....	57
Şekil 3.21. Örneklerin roller karıştırıcıda +4°C'de inkübasyonu .....	58
Şekil 4.1. Brusella'nın koyun kanlı agar besiyerindeki üreme görüntüsü .....	60
Şekil 4.2. Klasik PZR sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü .....	61
Şekil 4.3. Pellet örneğinden hazırlanan SDS-PAGE jelinin görüntüsü .....	62
Şekil 4.4. Süpernatant örneğinden hazırlanan SDS-PAGE jelinin görüntüsü .....	63
Şekil 4.5. Serum havuzları ile yapılan RBT sonucu .....	68
Şekil 4.6. Negatif serum havuzu örneğine ait NGC cihazı kromatogramı .....	69
Şekil 4.7. Pozitif serum havuzu örneğine ait NGC cihazı kromatogramı .....	70

Şekil 4.8. Brusella pozitif ve negatif serumun saflaştırma öncesi ve sonrası fraksiyonların SDS-PAGE jel görüntüsü.....	72
Şekil 4.9. Manyetik boncuklara kaplanan antikorların SDS-PAGE jel görüntüsü.....	73
Şekil 4.10. <i>B.melitensis</i> 1062'nin tüm <i>B.melitensis</i> proteinlerinin negatif serum MBİ sonuçları ile karşılaştırılmasına ait Venn şeması.....	86
Şekil 4.11. <i>B.melitensis</i> 1177'nin tüm <i>B.melitensis</i> proteinlerinin negatif serum MBİ sonuçları ile karşılaştırılmasına ait Venn şeması.....	87
Şekil 4.12. <i>B.melitensis</i> 5031'in tüm <i>B.melitensis</i> proteinlerinin negatif serum MBİ sonuçları ile karşılaştırılmasına ait Venn şeması.....	87
Şekil 4.13. <i>B.melitensis</i> 5112'nin tüm <i>B.melitensis</i> proteinlerinin negatif serum MBİ sonuçları ile karşılaştırılmasına ait Venn şeması.....	88



## TABLÖLAR

Tablo 1.1 Brusella’da bulunan diğer virölans faktörleri ve fonksiyonları .....	6
Tablo 1.2. İnsanda hastalık oluşturan Brusella türlerinin fenotipik özellikleri .....	15
Tablo 3.1. Brusella izolatlarının tanımlanması için yapılan klasik PZR’de kullanılan gen bölgeleri ve bu gen bölgelerini çoğaltmak için kullanılan primer dizileri .....	33
Tablo 3.2. Klasik PZR’de kullanılan reaktifler ve çalışma konsantrasyonları.....	33
Tablo 3.3. Çalışma esnasında kullanılan tampon çözelti ve besiyeri adları, konsantrasyonları, miktarları ve hazırlanışları. ....	34
Tablo 3.4. Kera-free SDS-PAGE ayırma ve yükleme jeli hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları .....	41
Tablo 3.5. nHPLC’de analitik kolona uygulanan mobil fazların gradiyentleri. ....	48
Tablo 4.1. İzolasyon sonrasında Bradford yöntemi ile yapılan protein ölçümü sonuçları..	61
Tablo 4.2. MALDI/TOF-TOF-MS analizi sonucu tanımlanan proteinlerin özellikleri .....	64
Tablo 4.3. Nano LC-MS/MS sonucuna göre tanımlanan bazı proteinlerin kodları, isimleri ve tahmin edilen lokasyonları.....	65
Tablo 4.4. Brusella izolatlarına ait protein ölçüm sonuçları ve elde edilen toplam protein miktarı.....	67
Tablo 4.5. Negatif serum havuzu fraksiyonlarının Nanodrop ölçüm sonuçları .....	71
Tablo 4.6. Pozitif serum havuzu fraksiyonlarının Nanodrop ölçüm sonuçları.....	71
Tablo 4.7. Pozitif serum ve <i>B.melitensis</i> 1062 ile yapılan MBİ sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri .....	73
Tablo 4.8. Pozitif serum ve <i>B.melitensis</i> 1177 ile yapılan MBİ sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri .....	76
Tablo 4.9. Pozitif serum ve <i>B.melitensis</i> 5031 ile yapılan MBİ sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri .....	79
Tablo 4.10. Pozitif serum ve <i>B.melitensis</i> 5112 ile yapılan MBİ sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri .....	81
Tablo 4.11. Negatif serum ve <i>B.melitensis</i> 1062 ile yapılan MBİ sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri .....	83
Tablo 4.12. Negatif serum ve <i>B.melitensis</i> 1177 ile yapılan MBİ sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri .....	83
Tablo 4.13. Negatif serum ve <i>B.melitensis</i> 5031 ile yapılan MBİ sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri .....	84



Tablo 4.14. Negatif serum ve <i>B.melitensis</i> 5112 ile yapılan MBİ sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri .....	84
Tablo 4.15. IP lizis tamponu ile yapılan MBİ sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri .....	85
Tablo 4.16. MBİ sonrasında tanımlanan protein sayıları .....	85



## 1. GİRİŞ

Brusella ilk defa 1887 yılında David Bruce tarafından keşfedilmiştir. Bruce, Malta'da görev yapan askeri personel arasında yaygın olan ateşli bir hastalıktan (Malta ateşi) ölen bir İngiliz askerinin dalağından *Brucella melitensis*'i (o yıllarda *Micrococcus melitensis*) izole etmiştir. Brusella'nın izolasyonundan sonra yaklaşık 20 yıl boyunca Malta ateşi bir gizem olarak kalmıştır. 1897'de Danimarkalı bir veteriner olan L.F. Benhard Bang, Bang basilinin (*B. abortus*) Bang hastalığının etkeni olduğunu keşfetmiştir. Themistocles Zammit'in 1905'te *B. melitensis*'i keçi sütünden izole ederek hastalığın zoonotik doğasını tesadüfen gösterene kadar brusellozun vektör kaynaklı bir hastalık olduğu düşünülmüştür. Süt ürünlerindeki patojen bakteriler üzerinde çalışmalar yapan Amerikalı bir bilim insanı olan Alice Evans, Bang hastalığı ile Malta ateşi arasındaki ilişkiyi doğrulamış ve David Bruce'ü onurlandırmak için etkeni *Brucella* olarak yeniden adlandırmıştır (Galińska & Zagórski, 2013; Seleem, Boyle, & Sriranganathan, 2010).

*Brucella* Proteobacteria şubesi, Alfaproteobacteria sınıfı, Rhizobiales takımı, *Brucellaceae* ailesine ait bir bakteri cinsidir (Bowman, 2011). *Brucella* cinsi bakteriler, şiddetli bir ateşli hastalık olan brusellozdan sorumludur. Bruselloz hastalığı, evcil ve vahşi hayvanlarda düşük ve kısırlığa neden olan gelişmiş ülkeler dışında tüm dünyada yaygın bir sorundur (Lapaque, Moriyon, Moreno, & Gorvel, 2005). Dünya çapında her yıl yaklaşık 500.000 insan bruselloz tanısı almaktadır (Byndloss & Tsolis, 2016). Bruselloz ağırlıklı olarak Orta Doğu, Akdeniz kıyıları (Portekiz, İspanya, Yunanistan, Türkiye), Asya, Afrika, Güney ve Orta Amerika'da süt ürünleri alımının yüksek olduğu ve hayvan sağlığının korunmasının yetersiz kaldığı ülkelerde endemik bir zoonozdur (Rubach, Halliday, Cleaveland, & Crump, 2013).

### 1.1. Brusella'nın Genel Özellikleri

Brusella gram negatif, kapsülsüz, spor oluşturmeyen, zorunlu hücre içi yerleşim gösteren, 0,6-1,5µm boyutlarında küçük kokobasil olarak tanımlanır. Brusella mikroskopta genelde tek tek görülür; nadiren çift veya zincir oluşturur (Alton & Forsyth, 1996; Corbel, 1997; Głowacka, Zakowska, Naylor, Niemcewicz, & Bielawska-Drózd, 2018). Brusella bir hücre içi patojendir, enfeksiyon sırasında etkisiz hale gelmez ve makrofajlarda çoğalır. Bakteriler asidik pH'a, düşük oksijen seviyelerine ve düşük besin seviyelerine adapte olabilirler (Köhler ve ark., 2002). Brusella iki farklı lipopolisakkarit (LPS) formu

oluşturabilen bir cinstir. Düz (S) formlar dış zarda tam bir LPS bulundururken, pürtüklü (R) formlar polisakkarit O-zincirini içermezler (Lapaque ve ark., 2005). Sitokrom oksidaz ile katalaz enzimleri vardır ve çoğu üreyi hidrolize edebilir. Brusella ekzotoksin ve sitolizin üretmez; kapsül, plazmit ve fimbria gibi yapıları yoktur (Seleem, Boyle, & Sriranganathan, 2008). Brusella su, fetüs, toprak, süt ürünleri, et, gübre ve tozda uzun süre canlılığını sürdürebilir. Sütte 8°C'de iki gün, peynirde üç ay, toprak nemli ise 40 gün kadar canlı kalabilirler. Ancak ısıya, radyasyona, dezenfektanlara ve pastörizasyona duyarlıdır (Doganay & Aygen, 2003; Gwida ve ark., 2010).

Bakteri konak hayvanlarına göre isimlendirilir ve konaklara göre patojenitesi değişkenlik gösterir. Brusella cinsi; klasik olarak altı türdür. *B. melitensis* koyun ve keçide, *B. abortus* sığırdı, *B. suis* domuzda, *B. canis* köpeklerde, *B. ovis* koyunda, *B. neotomae* çöl faresinde hastalık oluşturur. *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis* türleri insanlarda hastalık oluşturabilir (Ficht, 2010). Brusella türlerinin genomu, büyüklük ve gen sayısı bakımından çok benzerdir. Cins içindeki her tür, yaklaşık 3,29 Mb'lık bir ortalama genom büyüklüğüne sahiptir ve iki dairesel kromozomdan oluşur. Tüm brusella genomlarının G + C içeriği %57,2'dir. Kromozom I, yaklaşık olarak ortalama 2,11 Mb ve Kromozom II, yaklaşık 118 Mb'dir (Delvecchio ve ark., 2002; Halling ve ark., 2005; Paulsen ve ark., 2002). *Brucella melitensis* insanlar için en virulan ve en yaygın görülen türdür. Çok az sayıdaki mikroorganizma (10-100 adet) bile insanda hastalık oluşturabilir (Pappas, Papadimitriou, Akritidis, Christou, & Tsianos, 2006; Winter ve ark., 1996; Young, 1983). Brusella aerosol teması ile de bulaşabilmesi, invazif olması ve virülansının yüksek olması sebebiyle Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) tarafından aynı zamanda B grubu potansiyel biyoterör etkeni olarak da tanımlanmıştır (Yagupsky & Baron, 2005).

Brusella'nın üremesi için en uygun sıcaklık yaklaşık 37°C'dir, ancak 20-40°C arasında da yavaş da olsa üreyebilirler. Bazı brusella türleri üreyebilmek için %5-10 karbondioksit ihtiyacı duyar. Brusella agar, kanlı agar, çikolatamsı agar, triptik soy agar ve Brain-Heart İnfüzyon gibi besiyerleri kültür için kullanılabilir. Ortama serum ve kan ilave edilmesi üremelerini artırır (Doganay & Aygen, 2003). Kan veya vücut sıvısı kültürü için Castaneda adı verilen bifazik kültür ortamı veya otomatize kan kültür sistemleri kullanılabilir (Gupte & Kaur, 2016). İlk izolasyon için zenginleştirme faktörlerine ek olarak isoerythritol, pantotenat, tiamin, nikotinamid, magnezyum, demir gibi büyüme faktörleri gerekli olabilir. Brusella izolatları "toz benzeri" minik, pürüzsüz, parlak, bütün kenarları yükseltilmiş ve beyaz-krem rengi koloniler oluşturarak 48-72 saatte ürer (Percin, 2013).

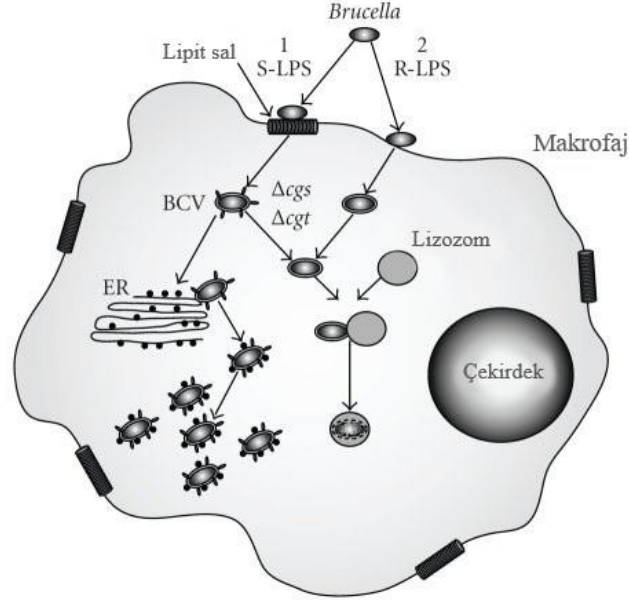
## 1.2. Virülans Faktörleri

### 1.2.1. Lipopolisakkarit

Lipopolisakkarit (LPS) Gram negatif bakterilerin dış membranının yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü için çok önemlidir (Cardoso, Macedo, Azevedo, & Oliveira, 2006). *Brusella*'nın iki tip LPS'si bulunur: Düz lipopolisakkarit (S-LPS) ve pürtüklü lipopolisakkarit (R-LPS). *Brusella*'nın S-LPS fenotipi çekirdek oligosakkarit yapıdaki lipid A ve bir O yan zincir polisakkaritinden oluşan tam bir LPS yapısındadır. *Brusella*'nın R-LPS fenotipi ise O yan zinciri içermez (Caroff, Bundle, Perry, Cherwonogrodzky, & Duncan, 1984). LPS'nin yapısı *brusella*'nın konak hücre içinde hayatta kalmasında ve virülansında önemli rol oynamaktadır (Lapaque ve ark., 2005). S-LPS'li olanlar, nötrofillerin hücre içi öldürülmesine karşı R-LPS'lilere göre daha dirençlidir (Maria-Pilar, Dudal, Dornand, & Gross, 2005; Smith & Ficht, 1990).

*B. abortus*'un lipid A yapısı glukozamin yerine bir diaminoglukoz omurgasına sahiptir, açıl grupları daha uzundur (C12 ve C14 yerine C18-C19 veya C28) ve çekirdeğe ester ve amid bağları yerine basit amid bağlarıyla bağlanır (Keleti, Feingold, & Youngner, 1974). Bu yapı LPS-patojen ilişkili moleküler patern (PAMP) etkileşimini değiştirir ve LPS'nin tipik endotoksin özelliğini azaltır. *B. abortus*'un LPS'si *E.coli* toksininden birkaç yüz kat daha az toksiktir (Goldstein ve ark., 1992; Keleti ve ark., 1974; Moreno, Berman, & Boettcher, 1981). Saflaştırılmış *B. abortus* LPS'si solunum patlaması (oksidatif burst), bakterisidal azot ara maddeleri ve lizozim sekresyonunu zayıf şekilde indükler. Makrofaj degradasyonuna karşı da dirençlidir (Rasool, Freer, Moreno, & Jarstrand, 1992).

*Brusella* LPS'si, Toll-like reseptör 4 (TLR4)/MD2 kompleks tarafından tanınan ana yüzey antijenidir (Bryant, Spring, Gangloff, & Gay, 2010). LPS'nin lipid A kısmı TLR4/MD2 kompleksini bağlar ve immün yanıtı başlatır. R-LPS içeren *Brucella* spp. hücre içerisine lipid sallar aracılığıyla girmez, bu sebeple lizozomlarla hızla birleşir (Şekil 1.1). Bunun aksine, S-LPS'li *brusella*'nın hücre içine girişi lipid salına bağlıdır ve enfeksiyonun ilk birkaç saati boyunca fagozom-lizozom füzyonunu bozar (Lapaque ve ark., 2005). S-LPS'li *brusella*, O polisakkaritin Tümör Nekroz Faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) mekanizması üzerine olan etkisiyle konak hücre apoptozisini inhibe eder. Bu sayede konak hücrenin immün yanıtından kaçır ve immün sistem faktörlerinin aktivasyonunu engeller (Fernandez-Prada ve ark., 2003).



**Şekil 1.1** S-LPS ve R-LPS brusella'nın ökaryot hücreye girişi (Haag, Myka, Arnold, Caro-Hernández, & Ferguson, 2010).

### 1.2.2. Tip 4 Sekresyon Sistemi

Tip 4 sekresyon sistemi (T4SS), bakteriyel makromoleküllerin ve proteinlerin hücre membranı boyunca salgılanmasından sorumlu olan protein kompleksidir (Cascales & Christie, 2003). *Brucella* virülans faktörlerinin konak hücre içerisine translokasyonunda bu sistemi kullanır. *Brucella*'daki T4SS, 12 proteini kodlayan *virB* operonu tarafından belirlenir (O'Cellaghan ve ark., 1999). *Brucella*'nın T4SS'nin moleküler kompleksleri, bir bitki patojeni olan *Agrobacterium tumefaciens* gibi bakteriyel zar boyunca konakçı hücrenin sitoplazmasına aktardığı düşünülmektedir (Christie, 2004). T4SS'nin VirB bölgesi, *B. suis*, *B. abortus* ve *B. melitensis*'te hücre içi hayatta kalma ve çoğalması için çok önemlidir. *virB* mutantı olanlar, endoplazmik retikulum (ER)'daki endositik yolu atlayamaz, lizozomlarla kaynaşır ve elimine edilir (Watarai, Makino, Fujii, Okamoto, & Shirahata, 2002).

### 1.2.3. İki Bileşenli BvrR / BvrS sistemi (Two-Component System-TCS)

İki bileşenli sistem (TCS) bir hayvan patojeni olan *Bartonella bacilliformis*'te bulunan sisteme çok benzer. İki bileşenli BvrR / BvrS sistemi virülansın, hücre istilasının ve hücre içi replikasyonun kontrolü için çok önemlidir (Lamontagne ve ark., 2007). BvrR ve bvrS genleri dış membranın bileşimini düzenleyen bazı amino asitleri kodlar. BvrR/BvrS sistemi mutasyonu bulunan mutant brusella ve mutasyon bulunmayan yabani tip brusella ile yapılan çalışmalarda, BvrR ve BvrS mutantlarının, vahşi tipten daha az invaziv olduğu ve her iki

mutantın da fagositik veya fagositik olmayan hücreler içerisinde çoğalamadığı gösterilmiştir. BvrR ve BvrS'nin fonksiyonunun bozulması ayrıca *B. abortus*'un bakterisidal katyonik peptidlere karşı direncini azaltır ve yüzey aktif maddelere geçirgenliğini artırır. (Sola-Landa ve ark., 1998).

#### **1.2.4. Siklik $\beta$ -1,2 Glukan**

Siklik glukanlar, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Rhodobacter sphaeroides* ve *Brucella* spp gibi Gram negatif bakteri zarflarının iç bileşenleridir (Martirosyan ve ark., 2012). Siklik  $\beta$ -1,2-glukan (C $\beta$ G), S-LPS ve R-LPS suşlarda meydana gelen ve polisakkarit B (poli-B) olarak adlandırılan küçük moleküler ağırlıklı bir polisakkarittir. Brusella'daki C $\beta$ G'lar, brusella'nın konakçı hücre ER'deki replikatif nişlerine ulaşması için önemlidir. Brusella'daki C $\beta$ G'lerin ökaryotik hücre zarlarını bozabildiği ve kolesterolü lipid sallarından çıkarabildiği gösterilmiştir. (Iñón De Iannino, Briones, Tolmasky, & Ugalde, 1998). C $\beta$ G'lerin brusella'nın enfeksiyon oluşturmak için konakçı hücreye girmede önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (Arellano-Reynoso ve ark., 2005).

#### **1.2.5. Süperoksit Dismutaz**

Reaktif oksijen ara ürünlerinin (ROI) üretimi, brusella'nın hücre içi replikasyonunu sınırlamak için konakçı makrofajlar tarafından kullanılan birincil mekanizmalardan birisidir (Gee ve ark., 2005). Süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve hidroksil radikalleri (OH) gibi ROI'leri brusella'nın makromoleküler yapılarına zarar verirler (Farr & Kogoma, 1991). Süperoksit dismutaz (SOD)'lar aktif bölgelerinde demir, manganez veya bakır ve çinko içeren bir metalloenzim ailesidir. Bu enzimler süperoksitin, oksijen ve hidrojen peroksit'e dönüştürülmesini katalize eder (Keele, McCord, & Fridovich, 1970). *B. melitensis*, *B. suis*, ve *B. abortus* genomlarının dizilenmesi sonucunda iki gen tarafından SOD kodlandığı gösterilmiştir. Periplazmik SOD (*sodC*) brusella'yı makrofajların solunum patlamasından korur.

#### **1.2.6. Katalaz**

Katalaz bakterilerin oksidatif strese karşı korunmasında önemli bir rol oynar. Bakteriler konakçı tarafından üretilen hidrojen peroksit saldırısına karşı savunma aracı olarak, hidrojen peroksitin su ve oksijene ayrışmasını katalizlemek için bu enzimi kullanırlar

(Kim, Sha, & Mayfield, 2000). Brusella'daki bilinen tek katalaz aktivitesi periplazmik boşlukla sınırlıdır. Katalaz enzimi *E. coli*'nin *katE* genine benzer bir dizi tarafından kodlanır. *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis*'deki katalaz üretimi, dış ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesinin artmasıyla düzenlenir (Gee ve ark., 2004).

### 1.2.7. Üreaz

Brusella iki ayrı özdeş olmayan üreaz operonuna sahip olduğu bilinen üç bakteri cinsinden birisidir. Mikrobiyal üreazlar karbonik asit ve iki amonyak molekülü oluşturmak üzere üreyi hidrolize eden multisubunit metalloenzimlerdir. Ürenin bozunması sonucunda açığa çıkan amonyak hücre içi metabolitlere katılır. Böylece üreaz brusella'nın asidik ortamlarda hayatta kalmasını kolaylaştırır (Seleem ve ark., 2008). Brusella kromozomunda 1 Mb uzunluğunda deoksiribonükleik asit (DNA) dizisi ile ayrılmış iki üre operonu vardır: *ure-1* ve *ure-2*. Bu operonlar *ureA*, *ureB*, *ureC* yapısal genlerini ve *ureD*, *ureE*, *ureF*, *ureG* aksesuar genlerini kodlar (Mobley, Island, & Hausinger, 1995). Brusella konakçıya oral yoldan girdiğinde sindirim sisteminden geçişi süresince üreaz enziminin brusella'yı koruduğu düşünülmektedir (Bandara, Sriranganathan, Schurig, & Boyle, 2005). Üreaz *B. ovis* hariç *Brucella* cinsine ait tüm bakteriler tarafından üretilir (Sangari, Seoane, Rodríguez, Agüero, & Lobo, 2007).

### 1.2.8. Diğer Virülans Faktörleri

Brusella'da bulunan diğer virülans faktörleri Tablo 1.1'de belirtilmiştir.

**Tablo 1.1** Brusella'da bulunan diğer virülans faktörleri ve fonksiyonları (Seleem ve ark., 2008).

Virülans Faktörü	Fonksiyonu
<i>Brucella</i> Virülans Faktör A (BvfA)	Hücre içi niş replikasyonunu oluşturmada rol oynadığı düşünülmektedir.
Alkil hidroperoksit redüktaz	Oksijen radikallerine ve reaktif azotlara karşı koruma sağlar.
Sitokrom oksidaz	Oksijen kullanılabilirliğinin sınırlı olduğu makrofajlarda hayatta kalmasını kolaylaştırır.
Nitrik oksit redüktaz (NOR)	Enfekte makrofajlar nitrik oksit (NO) üretir. Brusella üretilen bu NO'leri NOR sayesinde kendi amaçları için kullanabilir.
Base excision repair	<i>XthA</i> geni, DNA'nın baz eksizyon onarımında yer alan eksonükleaz III'ü kodlar. Bu enzim oksidatif yıkıma karşı korumadan sorumludur.

### **1.3. Brusella'nın İnsana Bulaşı**

Brusella insan vücuduna gastrointestinal ve solunum yolları, konjonktiva ve bütünlüğü bozulmuş cilt gibi çeşitli yollardan girebilir, transfüzyonla veya transplasental geçişle de doğrudan kan dolaşımına erişebilir (Franco, Mulder, Gilman, & Smits, 2007; Giannacopoulos, Eliopoulou, Ziambaras, & Papanastasiou, 2002; Pappas, Akritidis, Bosilkovski, & Tsianos, 2005).

Brusella insanlara enfekte çiğ süt ve peynir-krema gibi süt ürünlerinin tüketilmesi, enfekte hayvana ait salgılara temas edilmesi veya kontamine aerosollerin solunması ile bulaşır. Brusella hayvanların meme bezlerinde bulunur ve süt ile insanlara geçiş gösterir. Bu nedenle enfekte çiğ süt ve peynir-krema gibi süt ürünlerinin tüketilmesi, enfekte hayvana ait salgılarla temas edilmesi veya kontamine aerosollerin solunması ile hastalık bulaşır (Young, 1983). Bulaş yolu nedeniyle çiftçiler, çobanlar, veterinerler ve kesimhane işçileri risk grubunu oluştururlar (Lim, Matthew, Rickman, 2004). İnsanların hastalığa yakalanmasında hayvanlar birincil rezervuardır. Hayvanların vajinal dokuları, plasenta ve fetüsü yoğun olarak bakteri ile kontamine edilmiştir. Bir karbohidrat olan erythritol fetal dokularda yoğun bulunur ve bu madde bakterinin çoğalmasını sağlar ve diğer hayvanlara bulaşı artırır (Seleem ve ark., 2010).

### **1.4. Brusella'nın Patogenezi**

Brusella hastalığın başlangıcında primer olarak profesyonel fagositleri (makrofaj ya da dendritik hücreler) enfekte eder. Bu hücreler hem bakterinin yaşamını sürdürebilmesi/replike olabilmesi için niş hem de diğer organlara yayılım için vektör olarak görev yapar (Celli, 2015).

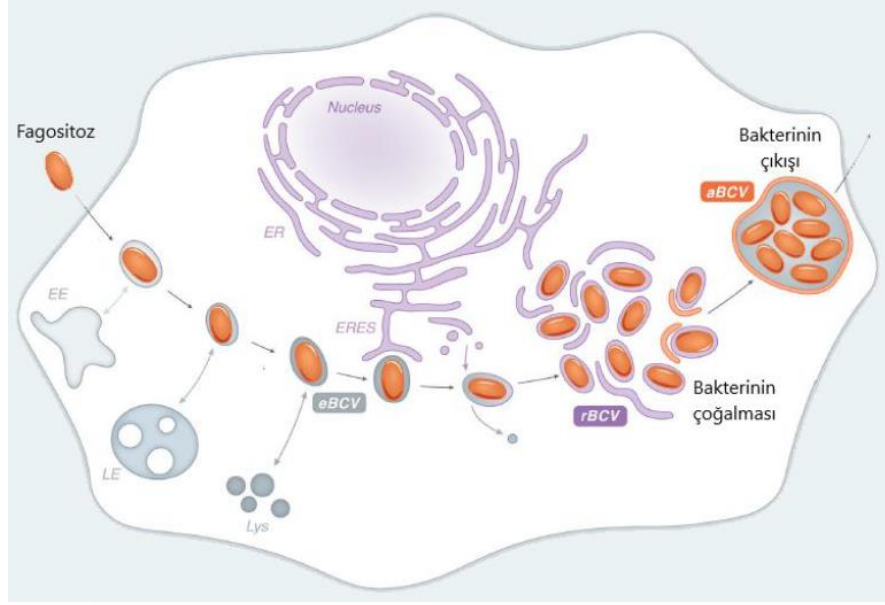
Brusella'nın konak makrofajlarının içerisinde canlılığını sürdürebilmesi en önemli virülans özelliklerinden biridir. Bu sayede bakteri hücre içerisinde çoğalır veya uyur halde (dormant) kalır. Bu durum klinikte kronik enfeksiyon, relaps veya gecikmiş iyileşme olarak tanımlanır (Corbel, 2006; Liautard, Dornard, Gross, & Köhler, 1996). Bakteri makrofaj ve dendritik hücre gibi fagositoz yapan hücreler tarafından fagosite edildikten sonra en yakın lenf düğümlerine taşınır. Lenf düğümündeki bakteri lenf sistemi aracılığıyla dalak ve karaciğer gibi retikuloendotelial sistem olmak üzere tüm organlara yayılır (De Figueiredo, Ficht, Rice-Ficht, Rossetti, & Adams, 2015).

Brusella sahip olduğu T4SS, LPS yapısı, C $\beta$ G sentezlemesi ve gen düzenleme özelliği sayesinde hücre içinde yaşamayı başarabilmektedir (Lapaque ve ark., 2005). Brusella'nın



makrofaj hücresi içerisindeki trafiği tedaviye rağmen hastalığın kronikleşmesiyle ilişkilidir. Brusella O-polisakkariti konak hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptörler ile etkileşir ve bu şekilde hücrede ilk olarak brusella içeren vakuol (BCV) olgunlaşması başlar. Brusella'nın hücre içerisindeki trafiği ile ilgili yapılan birçok çalışma, bu patojenin kendisinin hücre içindeki kompartmanlarda döngüsünü kontrol ettiğini göstermiştir. BCV bir endozomal vakuolden (eBCV) ER derivesi olan başka bir replikatif vakuole (rBCV) kadar değişir (Şekil 1.2). En sonunda otofaji ile ilgili kompartmanda (aBCV) biyogenez sonlanır (Celli ve ark., 2003). Fagozom matürasyonundaki en önemli basamaklardan biri BCV asidifikasyonu olup bu vakuolün içinde pH yaklaşık 4-4,5'dur. Bu aşama bakterinin yaşayabilmesi için hayati önem taşır. Fagozom asidifikasyonu başlangıçta inhibe edilirse bakteri ölmektedir. Bakterinin virülans genlerini çalıştırması için ortamın asidik olması gerekmektedir (Porte, Liautard, & Köhler, 1999).

Erken BCV döneminde bakteri lizozom füzyonundan kaçır ve hücre içerisinde yaşamayı başarır. Geç BCV döneminde ise endozomal ve lizozomal belirteçler eksprese eder ve lizozom ile birleşir (eBCV). Bakterilerin bir kısmı bu evrede ölür. eBCV asidifikasyonu brusella'nın major virülans determinant olan VirB T4SS'ni bir sinyalle indükler. Bu rBCV biyogenezine ve replikasyonuna yol açar. Bakterinin eBCV içerisindeyken hücre siklusunu ve kromozomal replikasyonu yeniden başlattığı kabul edilir. Bakterinin bölünmesi ve replikasyonu rBCV'lerde görülür. Kısaca, hücrede vakuol içerisinde bulunan brusella endositik halden replikasyona izin veren rBCV evresine kadar gelişen tüm olayları bazı proteinler ve mekanizmalarla kontrol eder. Bazen bu yolağın çalışmasını bloke eder (Deghelt ve ark., 2014). Enfeksiyondan 48 saat sonra ER'da gerçekleşen yaygın replikasyon sonrasında bakterilerin çoklu membran yapılarına sahip otofagozomlarda saklı şekilde kaldığı belirtilmiştir (Starr, Ng, Wehrly, Knodler, & Celli, 2008).



**Şekil 1.2.** Brusella'nın makrofaj içerisindeki hücre içi trafiği (Celli, 2015).

### 1.5. Bruselloz Kliniği

Bruselloz herhangi bir organ veya vücut sisteminin tutulabileceği sistemik bir hastalıktır. Kuluçka süresi 1 ile 5 hafta arasında değişmektedir. Enfeksiyon asemptomatik veya semptomatik olabilir. Semptomların uzunluğu ve ciddiyetine göre akut (8 haftadan az), subakut (8-52 hafta arası) veya kronik (1 yıldan fazla) olarak sınıflandırılır (Doganay & Aygen, 2003). Brusella'nın merkezi ve periferik sinir sistemini, gastrointestinal, hepatobiliyer, genitoüriner, kas-iskelet sistemi, kardiyovasküler ve integumenter sistemleri etkilediği bildirilmiştir (Franco ve ark., 2007).

Asemptomatik bruselloz serolojik testlerin pozitif olması ile teşhis edilir. Hastaların akut veya kronik hastalık öyküsü veya fiziksel bulguları yoktur. Çiftçilerde, mezbahada çalışan işçilerde ve veteriner hekimlerde daha sık gösterilmiştir (Doganay & Aygen, 2003).

Akut bruselloz, özellikle aralıklı (intermittent) veya inişli-çıkışlı (remittent) ateş ile belirgindir. Halsizlik, baş ağrısı, kilo verme, eklem ağrısı, kas ağrısı, kabızlık, iştahsızlık ve sırt ağrısı akut brusellozun diğer semptomlarıdır. Subakut bruselloz endemik bölgelerde tarif edilen dalgalı ateşi olan tipik ve klasik bir formdur. Belirtileri yorgunluk, baş ağrısı ve kas ağrısıdır. Ayrıca epididimit, orşit ve osteoartiküler komplikasyonlar gibi lokalize enfeksiyonlar daha sık görülür. Kronik bruselloz genellikle kemik, eklem, böbrek, karaciğer veya dalakta derin yerleşimli bir enfeksiyon odağının kalmasından kaynaklanır. Kronik brusellozda gözlenen yaygın semptomlar halsizlik, yorgunluk, duygusal değişkenlik, depresyon, baş ağrısı ve uykusuzluktur (Ulu Kilic, Metan, & Alp, 2013).

Lokalize bruselloz organizmaların kandan izole edilemediği ancak kemik, eklemler, beyin omurilik sıvısı, karaciğer, böbrekler, dalak veya deri gibi spesifik dokularda lokalize olduğu durumlara karşılık gelir. Lokalizasyon sistemik enfeksiyonun ana belirtisi olabilir veya kronik bir enfeksiyonun tek belirtisi olabilir. Lokalize enfeksiyon bazen sistemik enfeksiyon sonucu meydana geldiğinde komplikasyon olarak adlandırılır (Doganay & Aygen, 2003).

## **1.6. Bruselloz'un Tanısı**

Brusella enfeksiyonlarının tanısı kültür, serolojik testler ve nükleik asit amplifikasyon analizleri ile konulabilir. Brusella kültürü tanıda altın standarttır. Ancak kültürün negatif olması bruselloz tanısını dışlamaz. Kültürün duyarlılığı çeşitli parametrelerden (hastalığın hangi evresinde (akut-kronik) örnek alındığı, kültür sistemi (otomatize-konvansiyonel) tedavi öncesi-sonrası) etkilenir. Bu sebeple bruselloz tanısında serolojik testler önem kazanır. Serolojik testlerin özgüllükleri yüksek olmasa da ekonomik yönden geri kalmış ülkelerde bruselloz tanısının temelini oluşturur. Nükleik asit amplifikasyon analizleri hassasiyet, özgüllük ve güvenliği bir araya getirir ve hastalığın hızlı bir şekilde teşhis edilmesini sağlar. Ancak ticari Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tanı testlerinin yeterince doğrulanmamış olması ve PZR testlerinin tedavi takibinde kullanılmamaları sebebiyle bruselloz tanısında kültür ve serolojik yöntemler önemini korumaktadır (Yagupsky, Morata, & Colmenero, 2019).

### **1.6.1. Kültür**

#### **1.6.1.1. Kan Kültürü**

Brusellozun ilk evrelerindeki hastalarda sürekli düşük dereceli bir bakteriyemi gelişir. Enfeksiyon ilerledikçe brusella kan dolaşımından makrofajlara geçer. Sonuç olarak dolaşımdaki bakterilerin konsantrasyonu yavaş yavaş azalır ve organizmanın izolasyonunu giderek zorlaştırır. Ancak brusella zaman zaman kan dolaşımını tekrar girebilir (Pappas & Papadimitriou, 2007). Semptomatik dönemde brusella izolasyon oranları ilk iki hafta boyunca çok daha yüksektir. Birden fazla kan örneği alınıp kültürünün yapılması brusella üreme oranını artırabilir (Memish, Mah, Mahmoud, Shaalan, & Khan, 2000).

Brusellozlu hastalarda serolojik test sonuçları negatif olduğunda veya düşük veya sınırdaki antikor titreleri gösterdiğinde, erken dönemlerde enfeksiyon varlığını doğrulamada kan kültürlerinde brusella üretilir (Shemesh & Yagupsky, 2011).

Organizmanın izolasyon şansını arttırmak için, kan inoküle edilmiş besiyerinin 4 hafta boyunca takip edilmesi ve negatif kan kültürü şişesinden kör pasaj yapılması Amerikan Mikrobiyoloji Derneği ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından tavsiye edilmektedir (Yagupsky ve ark., 2019).

#### **1.6.1.1.1. Manuel Monobazik Kültür Metodu**

Brusella'yı kandan izole etmek için kullanılan kültür yöntemleri, diğer patojenlerin saptanmasında kullanılan geleneksel laboratuvar uygulamalarından farklı değildir. Hastalının kan örnekleri kan kültür şişelerine ekilip 35°C'de inkübe edilir. Besiyerinde bulanıklığın saptanması için periyodik olarak takip edilir. Sıvı kültür ortamında bulanıklık oluşması bakterinin çoğaldığını ve yüksek konsantrasyona ulaştığını gösterir (Yagupsky ve ark., 2019).

#### **1.6.1.1.2. Manuel Bifazik Kültür Metodu**

**Castaneda Yöntemi:** Tekrarlanan kör pasaj gerekliliğini ortadan kaldırmak için, 1940'ların sonlarında Ruiz-Castañeda tarafından basit ve ucuz bir bifazik kültür şişesi tasarlandı (Castaneda, 1947). Kültür şişesinin bir tarafı agar ile kaplanır, daha sonra serum-dekstroz veya pepton bazlı sıvı besiyeri şişe içerisine eklenir. Hastadan alınan kan, kemik iliği örnekleri veya klinik olarak ilgili diğer örnekler besiyerine eklendikten sonra kültür şişesi inkübe edilir. Şişe her 48 saatte bir agar yüzeyinde bakteriyel kolonilerin varlığı açısından incelenir. Üreme belirtileri gözlenmezse, şişe tekrar yatırılır ve tekrar enkübe edilir, bu süreç en az 35 gün boyunca tekrarlanır (Castaneda, 1961). Castaneda yöntemi brusella için spesifik değildir, diğer mikroorganizmalar da şişede büyüyebilir. Bu nedenle izolatın tam olarak tanımlanması gerekir. Her ne kadar son yıllarda otomatik kan kültür sistemleri Castaneda yönteminin yerini almış olsa da, düşük maliyetli ve pratik olması nedeniyle brusellozun endemik olduğu sınırlı ekonomik ve teknik kaynaklara sahip ülkelerde halen yaygın olarak kullanılmaktadır (Barua ve ark., 2016; Purwar, Metgud, Mutnal, Nagamoti, & Patil, 2016).

**TUMS medium:** Sıvı fazda beyin kalp infüzyon besiyeri katı fazda ise üre agar'ın kullanıldığı Tahran Tıp Bilimleri Üniversitesi (TUMS) ortamı adı verilen farklı bir Castaneda şişesi geliştirilmiştir. Bu besiyerinin sağladığı kolaylık, brusella cinsinin tüm üyelerinde gözlenen üreaz aktivitesinin besiyerindeki pH indikatörün renk değişikliği ile gözlenebilmesi ve izolatı tanımlamak için gereken süreyi kısaltmasıdır (Fatollahzadeh, Maleknejad, Hejazi, & Pyri, 2009).

### 1.6.1.1.3. Lizis Temelli Kan Kùltürleri

Sıvı temelli kan kùltürlerinin duyarlılığının düşük olması ve inkübasyonun uzun sürmesi nedeniyle, kandaki beyaz kan hücrelerinin parçalanması ve sonrasında katı besiyerine ekilmesi temeline oluşan alternatif bir yaklaşım geliştirilmiştir. Bu stratejinin mantığı, brusella'ların kan dolaşımında serbest yaşayan mikroorganizmalar olarak dolaşmamasıdır. Beyaz kan hücrelerinin parçalanması ile fagosite edilmiş ancak kùltür ortamında üreyebilecek haldeki bakterilerin kùltür ortamında serbestleşmesi sağlanmaktadır (Young, Borchert, Kretzer, & Musher, 1985).

**Lizis-filtrasyon metodu:** Bu yöntem 1950'lerin başlarında Braun ve Kelsh tarafından kanda bulunan mikroorganizmaları üretebilmek için geliştirilmiştir. Bu yöntemde göre kan örneği alınır, heparinize edilir ve ozmotik lizise maruz bırakılır. Lizat daha sonra sterilize edilmiş bir membran filtresi vasıtasıyla negatif basınç altında süzülür. Sonrasında membran katı bir besiyeri yüzeyine ekilir ve inkübasyona bırakılır. Filtrede tutunan organizmalar besiyeri üzerinde ayrı koloniler şeklinde ürer (Braun & Kelsh, 1954).

**Lizis-santrifüj metodu:** Lizis-filtrasyon metodunun modifiye edilmiş halidir. Bakteriler kan lizatından filtrasyon yerine santrifüjleme ile ayrılır. Santrifüj sonrası elde edilen çökelti besiyerine ekilir ve inkübe edilir (Kolman ve ark., 1991). Bir lizis santrifüj metodu olan Isolator tekniğinde kan örnekleri antikoagülan ajan olan sodyum polianetil sülfonat (SPS) ve bir deterjan karışımı içeren özel şişelere ekilir. SPS numunenin pıhtılaşmasını önlerken deterjan polimorfonükleer kan hücrelerinin hücresel zarlarını bozarak fagosite edilmiş bakterileri serbest bırakır. Elde edilen lizat daha sonra uygun besiyerine ekilir ve inkübe edilir (Yagupsky ve ark., 2019).

### 1.6.1.1.4. Otomatize Kan Kùltürü Sistemleri

Kan kùltürü tekniğinin temeli kùltür ortamındaki CO<sub>2</sub> konsantrasyonunun artışı veya oksijen içeriğinin azalışını tespit ederek mikroorganizmaların metabolik aktivitesini belirlemektir. Kan kùltür şişesindeki gaz bileşimindeki değişiklikler, kùltür sıvısının bulanıklaşmasından çok daha önce cihazlar tarafından tespit edilebildiğinden otomatize sistemler üremeyi tespit etmek için gereken zamanı kısaltır. Çoğu kan kùltür sistemi hem bakterileri daha fazla oksijene maruz bırakmak hem de ortama CO<sub>2</sub> salınımını kolaylaştırmak için inkübasyon esnasında şişeleri sürekli veya aralıklı olarak çalkalar (Yagupsky ve ark., 2019).

Fazla miktarda kan örneği alınması kan kültürünün duyarlılığını artırır. Bu nedenle yetişkinlerden 20 ile 30 ml, 3 yaşından küçük çocuklardan 2 ile 4 ml, daha büyük çocuklardan ise 10 ml hacimde kan alınması önerilir. Kan örneğinde bulunabilecek kompleman, antikor ve antibiyotik gibi bakterilerin üremesini inhibe edebilecek faktörlerin konsantrasyonunu azaltmak için şişedeki kan-besiyeri oranının 1:5 ile 1:10 oranında olması önerilmektedir (Yagupsky ve ark., 2019).

Bazı otomatize sistemlerin kan kültürü şişeleri (Bactec Myco/F-Lytic) ile lizis işlemi de gerçekleştirilir (Mantur & Mangalgi, 2004).

Pozitif kan kültürü şişelerinde meydana gelen metabolik değişiklikleri ölçme yöntemi, otomatik kan kültürü sistemleri arasında farklılık gösterir. Bactec 9000 ve Bactec FX cihaz serilerinde CO<sub>2</sub> içeriği arttıkça ve O<sub>2</sub> konsantrasyonu azaldıkça floresans seviyeleri artar. BacT / Alert (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) kan kültürü sisteminde kolorimetrik bir sensör besiyerindeki değişen CO<sub>2</sub> seviyesini ölçer. Vital (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) cihazı ise besiyerinin asitleşmesinden kaynaklanan floresansın baskılanmasını ölçer. Besiyeri ortamındaki CO<sub>2</sub> seviyesi radyometrik veya kızılötesi yöntemlerle belirlenebilmektedir (Yagupsky ve ark., 2019).

Otomatize kan kültür sistemleri, geleneksel kültür yönteminden daha yüksek verim sağlar ve bakteri üremesinin tespitini hızlandırır. Otomatize kan kültür sistemleri genellikle bir hafta içinde sonuç verir. Şişeleri 10-14 günden daha uzun süre inkübe etmeye gerek yoktur (Yagupsky, 1999).

#### **1.6.1.2. Diğer Klinik Örnekler**

Brusella izolasyonu için kan örneği dışında kemik iliği, beyin omurilik sıvısı, sinoviyal sıvı veya pü/aspirat mayi gibi örnekler de kan kültür şişelerine ekilebilir (Yagupsky ve ark., 2019). Kemik iliği kültürlerinin hastalığın herhangi bir döneminde brusella tespiti için kan kültürlerinden daha duyarlı olduğu kanıtlanmıştır (Gotuzzo, Carrillo, & Guerra, 1986). Kemik iliği örneklerinde brusella üreme süresi kan kültürüne oranla önemli ölçüde düşüktür. Aynı zamanda bu yöntemin antibiyotik ile tedavi edilen hastalarda da yararlı olduğunu kanıtlamıştır. Ancak kemik iliği aspirasyonu hasta için ağırlı bir süreç olduğundan sadece kuvvetli bruselloz klinik şüphesi bulunan ve serolojik olarak negatif hastalarda uygulanması önerilmektedir (Gotuzzo ve ark., 1986; Mantur, Mulimani, Bidari, Akki, & Tikare, 2008; Pappas ve ark., 2005).

### 1.6.1.3. Brusella'nın Tanımlanması

#### 1.6.1.3.1. Konvansiyonel Metotlar

Kan kültür şişesinde üreme olduktan sonra şişe içerisinden bir miktar sıvı alınıp Gram boyama yapılır. Gram boyamada çok küçük, soluk Gram negatif kokobasiller görülür. Şişeden bir miktar sıvı alınıp koyun kanlı agar gibi bir katı besiyerine ekim yapılır ve %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 35-37°C'de inkübe edilir. Görünür kolonilerin ortaya çıkması için 48-72 saat inkübasyon gerekebilir. Klinik örneklerden brusella'nın ilk izolasyonu esnasında bakterinin tipik özelliği olan noktasal, pigmentli ve hemolitik olmayan kolonilerin görülmesi birkaç gün veya haftalar sürebilir. Brusella izolatlarının düzgün (S tipi) kolonileri dışbükey, dairesel, yarı saydam ve 0,5 mm ile 1 mm çapındadır. Koloni morfolojisi, antijenik özellikleri ve bakterinin faj duyarlılığı tekrarlayan pasajlarla veya uzun süreli inkübasyondan sonra (dört günden fazla) değişikliğe uğrayabilir. S tipi koloniler donuk, kuru, sarımsı-beyaz granüler bir görünüme sahip olan, daha az dışbükey ve daha opak morfolojideki R tipi kolonilere dönüşebilir. Oksidaz ve üreaz pozitif bakteriler brusella şüphesini arttırmalıdır. Hızlı tanımlama için şüpheli kolonilere polivalan brusella antikoru ile lam aglütinasyon testi uygulanabilir. Brusella türlerinin ve biyovaryaların tanımlanması için CO<sub>2</sub> gereksinimi, H<sub>2</sub>S üretimi, boyalar ile üremenin inhibisyonu ve faj tiplendirmesi gibi testlerin yapılması gerekmektedir (Tablo 1.2). Bu yöntemler zaman alıcı, uygulaması tehlikeli ve uzman yorumu gerektiren testlerdir ve bu nedenle rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanması uygun değildir (Al Dahouk, Sprague, & Neubauer, 2013; Al Dahouk, Tomaso, Nöckler, Neubauer, & Frangoulidis, 2003; Yagupsky ve ark., 2019).

API gibi ticari ürünler brusella'yı *Ochrobactrum*, *Haemophilus*, *Bergeyella*, *Bordetella* veya *Psychrobacter* cinsi bakteriler olarak hatalı tanımlayabilmektedir. Bu nedenle bu gibi ticari ürünler kullanılırken potansiyel hatalı tanımlama ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır. Bu gibi durumlarda brusella'nın tanımlanması moleküler bir yöntemle veya bakteriyel O-lipopolisakkarite (O-LPS) karşı spesifik antiserum ile doğrulanmalıdır. Ancak bu O-LPS diğer Gram-negatif bakteriler ile çapraz reaksiyon verebildiğinden, bu test sadece brusella fenotipik karakterlerini (Gram morfolojisi, tipik biyokimyasal profil vb.) gösteren organizmalara yapılmalıdır. Öte yandan brusella'nın S-LPS'den R-LPS'ye dönmüş kolonileri (veya doğal olarak R-LPS olan *B. suis* ve *B. canis* kolonileri) O-polisakkariti sentezlemedikleri için bu antiserumlar ile aglütinasyon oluşturmayacakları göz önünde

bulundurulmalıdır. Bu gibi koloniler anti-R-LPS antiserumlar ile muamele edilmelidir (Al Dahouk ve ark., 2013; Yagupsky ve ark., 2019).

**Tablo 1.2.** İnsanda hastalık oluşturan brusella türlerinin fenotipik özellikleri (Al Dahouk ve ark., 2003; Yagupsky ve ark., 2019).

Tür Adı	Boya varlığında üreme (rutin test dilüsyonu)			H <sub>2</sub> S üretimi	CO <sub>2</sub> gereksinimi (%5)	Üreaz pozitifliği (süre)	Faj ile lizis*			
	Fuksin	Thionin	Safranin				Tb	Wb	Iz	R/C
<i>B. melitensis</i>	+	+	+	-	-	24 s	-	-	+	-
<i>B. abortus</i>	+ <sup>a</sup>	-	+	+ <sup>b</sup>	±	24 s	+	+	+	+
<i>B. suis</i>	- <sup>c</sup>	+	-	-	-	15 d	-	+	+	-
<i>B. canis</i>	±	+	-	-	-	15 d	-	-	-	+

a: Biyotip 2 hariç, b: Biyotip 5 hariç, c: Biyotip 3 hariç

\* Tb: Tbilisi, Wb: Weybridge, Iz: Izatnagar

Brusella cinsi üyelerinin tanımlanması ve tür tayini için alternatif olması amacıyla 570 metabolik reaksiyona dayalı yeni bir minyatür yarı otomatik sistem (Micronaut, Merlin Diagnostika) geliştirilmiştir (Al Dahouk ve ark., 2010). Bu sistemde bulunan 196 metabolik reaksiyon 23 referans brusella suşu arasında güvenilir bir ayırım sağlamış, ayrıca brusella'yı *Ochrobactrum spp.* gibi ayırt edilmesi zor mikroorganizmalardan ayırmıştır. Micronaut sistemi spesifik reaktiflerin hazırlanmasını gerektirmeden yeni brusella türlerini ve biyovarlarını saptama potansiyeline de sahiptir (Scholz ve ark., 2010). Bununla birlikte Micronaut kitinin bu tiplendirme özelliği bruselloz tedavisini etkilemediği için klinik mikrobiyoloji laboratuvarları için bir ihtiyaç olarak görülmemektedir. Ancak bu sistem özellikle atipik brusella izolatlarının tanımlanması için referans laboratuvarlarda tercih edilebilir (Al Dahouk & Nöckler, 2011).

#### 1.6.1.3.2. Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu-Uçuş Kütle Spektrometresi (MALDI/TOF-MS)

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında MALDI/TOF-MS teknolojisinin uygulanması mikroorganizmaların tanımlanma şeklini derinden değiştirmiştir. Geleneksel fenotipik



tekniklerle karşılaştırıldığında MALDI/TOF-MS uygun maliyetli ve kesin tanı sağlamaktadır. Başlarda brusella'nın tanımlanmasında MALDI/TOF-MS'in performansı yetersizdi (Poonawala, Conner, & Peaper, 2018). Ancak artık MALDI/TOF-MS, brusella'yı hem kültür plakalarından hem de kan kültürü şişelerinden doğrudan tanımlayabilmektedir (Ferreira ve ark., 2010; Lista ve ark., 2011). Yakın zamanda yapılan bir araştırmada nadir ve atipik brusella izolatları dahil olmak üzere, brusella'nın bilinen tüm türlerine ait 84 farklı izolattan bir referans veri tabanı oluşturulmuştur (Meseureur ve ark., 2018). Güncellenen veri tabanı ile brusella'nın *Ochrobactrum* cinsinin üyelerinden belirgin şekilde ayırt edilmesi ve *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis*'in kesin bir şekilde tanımlanması sağlanmıştır. Bununla beraber, çalışma esnasında canlı brusella'ya maruz kalmamak için absolü etanol ile bakterinin inaktivasyonunun sağlanması, sonrasında ise formik asit ve asetonyitril ile standart protein ekstraksiyonu basamağına geçilmesi gerektiği bildirilmiştir (Drevinek, Dresler, Klimentova, Pisa, & Hubalek, 2012; Sali ve ark., 2018).

### 1.6.2. Serolojik Testler

S-LPS'ye karşı gelişen antikorların temel alındığı bruselloz serolojik tanısı genellikle *B. abortus* S19 suşundan elde edilen antijenler kullanılarak gerçekleştirilir. Çünkü brusella immünodominant S-LPS'si klinik açıdan önemli olan üç türün tüm biyovaryantları için ortaktır (Nielsen, 2002). Doğal olarak, ortak S-LPS antijeninin tanınmasına dayanan serolojik testler, bu çapraz reaksiyona giren türlerin neden olduğu enfeksiyonların ayırt edilmesini sağlamaz. R-LPS'ye sahip brusella türleri *B. canis* ve *B. ovis* doğal olarak O zincirinden yoksundur. Anti-S-LPS antikorlarının tespit edilmeye çalışılmasıyla bu türlerin oluşturduğu enfeksiyonlar teşhis edilemez. *B. ovis* insanda hastalık oluşturmaz, ancak *B. canis* kaynaklı insan enfeksiyonları bildirilmiştir. Bu enfeksiyonların serolojik olarak tanımlanabilmesi için türe özgü R-LPS'nin kullanıldığı aglütinasyon testi veya antijen olarak *B. canis* proteinlerinin kullanıldığı bir enzim işaretli immunosorbent assay (ELISA) testi gerekmektedir (Polt, Dismukes, Flint, & Schaeffer, 1982).

LPS molekülünün *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella enterica* serovar Urbana O:30, *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O116 ve O157, *Vibrio cholerae*, *Xanthomonas maltophilia*, ve *Afipia clevelandensis* gibi çeşitli Gram negatif organizmalarınkilerle çapraz reaksiyona giren epitopları taşıdığı belirtilmelidir (Al Dahouk & Nöckler, 2011; Pappas ve ark., 2005). Bu nedenle, S-LPS'yi hedef alan serolojik testlerin sonuçları dikkatli yorumlanmalıdır. Sonuçlar hastalığın klinik belirtileri ve epidemiyolojik

verilerle ilişkilendirilmelidir. Bu spesifik olmayan reaksiyonlardan sorumlu olan anti-S-LPS antikoru çoğunlukla IgM izotipindedir (Lamb, Jones, Schurig, & Berman, 1979; Yagupsky ve ark., 2019).

Brusella'nın sitoplazmik proteinleri, LPS'ye uygun bir alternatiftir çünkü bunlar *Ochrobactrum* cinsinin dışındaki bakterilerle önemli bir serolojik çapraz reaksiyon göstermezler. Bu sayede bu sitoplazmik proteinler brusella'nın neden olduğu enfeksiyonları, S-LPS seviyesinde çapraz reaksiyona giren organizmaların neden olduğu enfeksiyonlardan ayırt etmek için kullanılabilir (Yagupsky ve ark., 2019).

#### **1.6.2.1. Rose-Bengal Testi (RBT)**

RBT, Rose Bengal boyası ile boyanmış ve spesifik olmayan aglütinini inhiye etmek için pH 3,65'te tamponlanmış bir tam *B. abortus* hücresi süspansiyonu ile hasta serumunun aglütinasyon reaksiyonuna dayanmaktadır (Corbel, 1997; Rose & Roepke, 1957). Test yapılması basit, hızlı (5 dakika içinde) ve akut bruselloz hastalarının teşhisinde nispeten iyi sonuçlara sahip bir testtir, ancak kronik ve komplike vakalarda yüksek oranda yanlış negatif sonuç verir (Araj, Brown, Haj, & Madhvan, 1988). RBT aglütine olan ve aglütine olmayan antikoru saptar ve prozon fenomeninin (Wright aglütinasyon testi (WAT) ile gözlenen, göreceli olarak fazla antikor olması nedeniyle düşük serum dilüsyonlarında aglütinasyonunun görülmemesi) dezavantajına sahip değildir. Testin uygulanması basittir ve teknik uzmanlık veya özel laboratuvar ekipmanı gerektirmez. (Díaz, Casanova, Ariza, & Moriyón, 2011).

RBT, enfeksiyonun evresinden bağımsız bir şekilde oldukça duyarlıdır (%99), ancak LPS'ye karşı gelişen antikoru tespit eden bütün testlere benzer şekilde, çapraz reaksiyona girebileceği bakterilerle enfekte olmuş hastalarda sahte pozitif reaksiyonlar verebilir. RBT pozitifliği özellikle brusellozun endemik olduğu bölgelerde WAT gibi ikinci ve daha spesifik bir testle doğrulanmalıdır (Yagupsky ve ark., 2019).

#### **1.6.2.2. Wright Aglütinasyon Testi (WAT)**

WAT, *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis* enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılan en yaygın serolojik testtir. WAT S-LPS'ye karşı oluşan antikoru tespit ettiğinden, R-LPS'li *B. canis* türlerinin neden olduğu hastalığın teşhisi için kullanılmaz (Nielsen, 2002).

WAT hasta serumunun test tüpleri içerisinde 2'şer kat sulandırılması (1:20 ile 1:2,560 aralığında) sonrasında eşit hacimde ısı ve fenol ile öldürülmüş *B. abortus* 119-3 suşundan

elde edilen antijen ile karıştırılmasıyla gerçekleştirilir. Gece boyunca 37°C'de inkübasyondan sonra reaksiyon çıplak gözle değerlendirilir. Aglütinasyon meydana gelirse, oluşan antijen-antikor kompleksleri zemine çöker ve dibinde çökelti oluşmuş berrak bir sıvı şeklinde görülür. Aglütinasyon gerçekleşmezse süspansiyon bulanık kalır. Test sonucunun 1:160 ve üzerinde olması bruselloz pozitif olarak kabul edilir (Al Dahouk & Nöckler, 2011; Nielsen, 2002).

Hastalığın erken evrelerinde WAT sonuçları negatif veya düşük titrelerde olabilir. Hatalı negatif sonuçtan şüpheleniliyorsa test en az 2 ile 3 hafta arayla tekrarlanmalıdır. Aglütine edici olmayan antikorların veya prozon fenomeninin baskınlığına da hatalı negatif sonuç ile karşılaşılır. Bu sorun hasta serumunun daha fazla seyreltilmesi ile aşılabilir (Yagupsky ve ark., 2019).

#### **1.6.2.3. 2-merkaptoethanol (2-ME) Testi**

Brusellozun tanısına yönelik serolojik testlerin doğru şekilde yorumlanması, IgM antikorlarının S-LPS'yle çapraz reaksiyona girmesinin neden olduğu düşük spesifite ve yine IgM antikor titrelerinin uzun süre kalıcı olmasından dolayı sorun olabilmektedir. IgM'in bu olumsuz etkisini ortadan kaldırmak ve aynı zamanda IgG'nin aktivitesini bozmamak için çeşitli metotlar önerilmiştir. IgM'in disülfid bağları ortama 2-ME, antiglobülin veya şelatlama ajanları eklenerek, asitleştirilmiş bir antijen kullanarak, rivanol çökeltmesi veya serumun ısıtılmasıyla inaktive edilebilir. Bu amaçla günümüzde sadece 2-ME modifikasyonu insanlarda bruselloz teşhisi için yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir. 2-ME'nin asıl kullanım amacı önceden bruselloz tanısı almış hastalarda antibiyotik tedavisine verilen yanıtın serolojik olarak izlenmesidir (Buchanan & Faber, 1980).

2-ME testi, WAT ile paralel şekilde gerçekleştirilir ve her test tüpünde 0,05 M'lik 2-ME ilave edilir. 2-ME bulunan tüplerdeki aglütinasyon titresi IgG antikorlarının aktivitesini gösterir (Yagupsky ve ark., 2019).

#### **1.6.2.4. Coombs Antiglobülin Aglütinasyon Testi**

Uzun süredir devam eden brusella enfeksiyonu olan hastalarda aglütine edici olmayan antikorlar aglütine edenlere göre görece olarak daha fazla olduğundan, WAT yanlış negatif sonuçlar verebilir. Coombs testi, tekrarlayan veya devam eden bruselloz hastalarında brusellozun tanımlanması için daha uygun olabilir (Franco ve ark., 2007).

WAT testi sonrası tüpler +5°C’de bir saat bekletildikten sonra santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet serum fizyolojik ile süspanse edilir. Bu işlem iki kere daha tekrar edildikten sonra pellet üzerine anti-human globülin eklenir süspanse edilir. Tüpler yeniden 37°C’de inkübe edilir ve aglütinasyon olup olmadığı değerlendirilir (Morgan, 1990).

#### **1.6.2.5. Brusella Coombs Jel (Odak) Testi**

Brusella Coombs jel testi (Odak testi), bir jel matrisi ve Coombs antikoları içeren mikro kolonlarda gerçekleştirilen yeni, basit ve hızlı bir aglütinasyon testidir. Serumdaki brusella antikolarının varlığı, testin yapılmasından 2 saat sonra jelde pembe bir antijen / antikor kompleksi oluşumu ile ortaya çıkar. Hasta serumu uygun şekilde sulandırıldıktan sonra üzerine brusella antijeni ilave edilip 37°C’de inkübe edilir. Sonrasında bu sıvıdan bir miktar alınıp jel matrisi içeren tüp içerisine bırakılır. Bir süre 37°C’de inkübe edildikten sonra jel matris içeren tüpler santrifüj edilir. Serumda antikor bulunmuyorsa tüpün dibinde, antikor bulunuyorsa tüpün üst kısmında pembe renkli bant oluşur (Borsa, Aldag, Yılmaz, Dalar, & Ozalp, 2016; Hanci, Igan, & Uyanik, 2017)

#### **1.6.2.6. Immunocapture Aglütinasyon Testi**

Son yıllarda brusellozun serolojik tanısında yeni bir tek aşamalı immunocapture testi (Brucellacapt test, Vircell) kullanılmaya başlanmıştır. Bu test, tecrübeli laboratuvar personeli veya ek bileşenler gerektirmez ve sonuçlar 24 saat sonra okunur. Brucellacapt, IgM antikolarının düşük spesifikliğınden kaçınmak için asidik ortamda çalışır ve antijen olarak *B. abortus* antijenleri kullanır. Bu test S-LPS içeren üç brusella türüne karşı oluşmuş aglütine edici olan ve olmayan IgG ve IgM antikolarını saptar (Orduña ve ark., 2000).

Anti-human immünglobülinleri ile kaplanmış kuyucuklara sulandırılmış hasta serumu ve test antijeni eklenir. Pleyt 37 ° C’de 24 saat inkübe edilir. Kuyucuk dibinde oluşan yaygın aglütinasyon pozitif, kuyunun dibinde oluşan merkezi bir pellet ise negatif olarak yorumlanır. Genel olarak Brucellacapt testi bruselloz enfeksiyonunun erken evrelerinde Coombs testine oranla daha yüksek titreler verir (Yagupsky ve ark., 2019). Brucellacapt testi Coombs testine göre basitliğı nedeniyle bruselloz tedavisi alan hastaların takibinde tercih edilebilir (Casanova, Ariza, Rubio, Masuet, & Díaz, 2009).

### **1.6.2.7. Enzim İşaretli Immunosorbent Assay (ELISA)**

ELISA testi bütün brusella hücresi veya brusella proteini kaplanmış plaklarda gerçekleştirilir. ELISA S-LPS'nin tespiti için de kullanılabilir de plaklar genellikle sitozolik proteinler ile kaplanır. Hastanın serumu belli oranda seyreltilir, kuyuya bırakılır ve pleyt inkübe edilir. Yıkama adımından sonra kuyucuklara bir enzim ile konjuge edilmiş (genellikle alkalın fosfataz veya horseradish peroksidaz) anti-human IgG, IgM veya IgA eklenir. Uygun şekilde inkübe edildikten sonra yine yıkama işlemi yapılır. Daha sonra kuyucuklara enzime spesifik substrat ilave edilir. İnkübasyonun ardından reaksiyon durdurulur ve kuyucuklardaki ışımaya uygun dalga boyunda ölçülür (Yagupsky ve ark., 2019).

ELISA, özellikle yüksek klinik şüphe varken diğer testler negatif olduğunda, koplake, fokal ve kronik vakalarda tercih edilen bir testtir. Yüksek hassasiyet ve özgüllük ile spesifik IgG, IgM, IgA immünglobulinlerini hızla (4-6 saat) saptayabilir (Araj, Lulu, Mustafa, & Khateeb, 1986). İmmünglobulin sınıflarının tespitine ek olarak ELISA ayrıca brusella-spesifik IgG alt sınıflarını ve IgE gibi diğer brusella immünglobulinlerini de tespit edebilir (Araj, 1988). ELISA ile fazla sayıda örnek eşzamanlı olarak test edebildiği için epidemiyolojik sürveyans araştırmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. In-house ELISA'ların duyarlılığı genellikle yüksektir ancak özgüllüğü aglütinasyon testlerinden daha düşüktür. Ticari ELISA kitleri genellikle iyi performans gösterir (Araj, Kattar, Fattouh, Bajakian, & Kobeissi, 2005).

### **1.6.2.8. IgG Avidite ELISA Testi**

Klasik ELISA'nın bir modifikasyonu olan IgG avidite ELISA testi başlangıçtaki düşük afiniteli IgG antikorlarının zamanla yüksek afiniteli antikorlarla değiştirildiği görüşüne dayanır. Bu testte klasik ELISA'ya ek olarak üre içeren fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) kullanılır (Mantecón ve ark., 2008; Pabuccuoglu ve ark., 2011). Düşük afiniteli antikorlar üre tarafından bağlanma bölgelerinden çıkarılarak yüksek afiniteli olanlar eklenir. IgG avidite indeksi (AI), üre ile muamele edilmiş kuyunun absorbansının muamele edilmeyenlerin absorbansına bölünmesiyle hesaplanır. Yüksek AI değeri immünolojik hafızayı ve daha olgun bir immün yanıtı gösterirken, düşük AI değeri yeni gelişmiş enfeksiyon olarak yorumlanır (Kutlu ve ark., 2003).

### 1.6.2.9. Floresan Polarizasyon Immunoassay (FPI)

FPI'nin prensibi, bir florokrom ile işaretlenmiş çözelti içindeki bir antijen molekülü ile, antikor ile konjüge edilmiş aynı antijen molekülünün dönme hızındaki farkı ölçmeye dayanır. Oldukça küçük olan brusella S-LPS molekülü hızlı bir şekilde döner ve ışık hızlı bir şekilde depolarize olurken, çok daha büyük olan antijen-antikor kompleksi daha düşük bir hızda döner ve ışık da daha yavaş şekilde depolarize olur. Bu fark doğru bir şekilde ölçülebilir ve sonuçlar dakikalar içinde elde edilebilir (Nielsen, Lin, Gall, & Jolley, 2000). *B. melitensis*, *B. abortus* veya *B. suis* kaynaklı akut enfeksiyonları veya relapsları olan hastalardan alınan serumlar test edildiğinde, duyarlılık genel olarak %96,1 bulunmuştur. İşlemin kolay olması, FPI'nin klinik laboratuvarlarda, kan bankalarında ve arazide kullanılabileceği bildirilmiştir (Lucero, Escobar, Ayala, Paulo, & Nielsen, 2003).

### 1.6.2.10. Dipstick Assay

Dipstick assay brusella'ya özgü IgM antikorlarının tespiti için kullanılan hızlı bir testtir. Test çubuğu belirli bir bölgede *B. abortus*'tan türetilmiş S-LPS'leri içeren bir nitroselüloz şeridinden oluşur. Hastanın serumu ile karıştırılan test antijeni (kolloidal boya parçacıkları ile konjüge edilmiş bir monoklonal anti-human IgM antikor), ıslatılmış test çubuğu içerisinde 3 saat süreyle inkübe edilir. Süre sonunda çubuk musluk suyu ile durulanır ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Oluşan renk yoğunluğu bir referansla karşılaştırılır (Altuglu ve ark., 2002). Testin uygulanması basittir ve teknik uzmanlık veya özel ekipman gerektirmez. Yalnızca IgM antikorları tespit edilebildiğinden sadece akut brusellozun tanısında kullanılabilir. Uzun süren ve kronik vakalar için yetersiz olduğu kanıtlanmıştır (Casao, Smits, Navarro, & Solera, 2003; Clavijo ve ark., 2003).

### 1.6.2.11. Lateral Flow Assay (LFA)

LFA, ELISA'nın uygun bir plastik aparatta uygulandığı basitleştirilmiş bir versiyonudur. Sistem, bir ucunda bir reaktif ped ve diğer ucunda bir emme pedi bulunan *B. abortus* LPS'si içeren bir nitroselüloz şeridinden oluşmaktadır. Reaktif ped, tespit aracı olarak kurutulmuş kolloidal altın anti-human IgM ve anti-human IgG konjugatlarını içerir. LFA hasta başı kullanımı için tasarlanmıştır, lanset yardımıyla parmaktan alınacak küçük bir kan damlası ile çalışılır. Laboratuvar uzmanlığı, özel ekipman veya elektrik kaynağı gerektirmez. Sonuçların yorumlanması kolaydır ve taşıma veya depolama için soğutmaya

ihtiyaç duymaz. LFA'nın duyarlılığı (%95) WAT ile benzerdir (Smits, Abdoel, Solera, Clavijo, & Diaz, 2003; Yagupsky ve ark., 2019).

### 1.6.3. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT)

*Brucella* spp, kan veya diğer steril vücut sıvıları, dokular ve eksüdatlar gibi herhangi bir klinik örnekten NAAT ile tanımlanabilir. Ancak periferik kan genellikle en iyi verim alınan ve yıllar boyunca en fazla deneyime sahip olunan klinik örnektir. İlk araştırmalar sırasında periferik tam kan numuneleri kullanılmış ancak tam kandaki insan DNA'sının fazla olması ve hemin gruplarının Taq polimeraz enzimi üzerindeki olumsuz etkileri sebebiyle NAAT arzu edilen sonuçları vermemiştir (Navarro, Escribano, Fernández, & Solera, 2002; Queipo-Ortuño, Garcia-Ordoñez, Colmenero, & Morata, 1999). Buffy coat'tan DNA izolasyonu ile bazı inhibitörler ortadan kalkmasına rağmen, Ficoll-Hypaque ile muamele edilmesini gerektirdiği için buffy coat yaygın şekilde kullanılmamaktadır (Matar, Khneisser, & Abdelnoor, 1996).

DNA izolasyon işlemlerinde ve amplifikasyonda kullanılan teknolojideki gelişmeler serumun insan brusellozunun moleküler tanısı için tercih edilen bir örnek olduğunu göstermiştir (Sanjuan-Jimenez, Colmenero, & Morata, 2017). Bazı çalışmalar hasta serumu kullanılarak yapılan PZR analizlerinin sonucunun tam kan örneklerinden daha iyi olduğunu göstermiştir (Zerva, Bourantas, Mitka, Kansouzidou, & Legakis, 2001).

Bruselloz hastalarında brusella DNA'sının tespiti, klinik örneklerde az sayıda bakteri bulunmasından ve örnekten kaynaklanan inhibitör etkilerden dolayı oldukça zordur (Queipo-Ortuño, Colmenero, Macias, Bravo, & Morata, 2008). Brusella PZR'lerinin duyarlılığı %50 ile %100, özgüllüğü ise %60 ile %98 arasında değişmektedir. Duyarlılık ve özgüllük kullanılan DNA izolasyon yöntemine, kullanılan klinik örnek çeşidine vs. bağlı olarak farklılık gösterir (Morata ve ark., 2001; Probert, Schrader, Khuong, Bystrom, & Graves, 2004; Romero, Gamazo, Pardo, & Lopez-Goni, 1995). Hastalık evresinden bağımsız olarak PZR'nin duyarlılığı kan kültürlerinden, özgüllüğü ise serolojik testlerden daha yüksektir (Navarro, Casao, & Solera, 2004).

16S rRNA'nın PZR'de hedef gen bölgesi olarak kullanımı birçok bakteriyel enfeksiyonun moleküler tanısında çok yaygındır. Ancak diğer alfaproteobakterilerle çapraz reaksiyon göstermesi ve daha spesifik gen bölgelerinin duyarlılığının yüksek olmasından dolayı 16S rRNA brusellozun moleküler tanısında tercih edilmez (Romero ve ark., 1995). Şimdiye kadar tanımlanan bütün brusella türlerinde değişken sayıda bulunan *IS711* gen

bölgesi hastalığın moleküler tanısında hedef bölge olarak çok sık kullanılmaktadır (Bounaadja ve ark., 2009). Brusella cinsine özgü 31 kDa'lık immünojenik bir membran proteinini kodlayan *Bcsp31* geni en sık kullanılan hedef bölgedir (Mayfield ve ark., 1988). Kontaminasyon riskine rağmen Nested PZR'nin özgüllüğü ve duyarlılığı diğer PZR'lere göre yüksektir (Matar ve ark., 1996). Real-time PZR, klinik örneklerin verimli şekilde taranmasını sağlar ve birkaç saat içinde sonuç verir (Redkar, Rose, Bricker, & DelVecchio, 2001).

### **1.7. Türkiye'de ve Dünya'da Brusellozun Önemi**

Bruselloz ülkemizde ve Dünyada gelişmekte olan ülkelerde yaygın bir zoonozdur. Hastalık özellikle Afrika, Asya, Orta Doğu, Orta ve Güney Amerika da yaygındır. Bruselloz Türkiye, Fransa ve İspanya'da endemiktir (Lim & Rickman, 2004). Ülkemizde insidans 100.000'de 11,93 ile 49,54 arasında değişiklik göstermektedir (Dean, Crump, Greter, Schelling, & Zinsstag, 2012). Türkiye'de bruselloz olguları en fazla Güneydoğu Anadolu bölgesinde (%41,1) görülmektedir (Yüce, 2006). Son yıllarda sürveyans ve kontrol yöntemlerinde çok sayıda gelişmeye rağmen, gelişmekte olan ülkelere hijyen, sosyoekonomik ve politik faktörlere bağlı olarak prevalansında artış vardır (Gwida ve ark., 2010; McDermott, Grace, & Zinsstag, 2013). Dünya Sağlık Örgütü tahminlerine göre gerçek insidans raporlananlardan 10-25 kat daha fazladır (World Health Organization, 1997). Bruselloz ülke ekonomisine zararı yüksek bir zoonozdur. Hem insan hem ağıl hayvanları hem de vahşi hayattaki canlılara zarar verir. Hayvanlarda düşüğe, erken doğuma neden olması, süt üretiminde azalmaya yol açması nedeniyle ekonomik zarara yol açar (Gwida ve ark., 2010; McDermott ve ark., 2013). Geçen yüzyılın sonunda, Arjantin'de hastalık prevalansı %5 olmasına rağmen, bu hastalıktan kaynaklanan ekonomik kayıp yıllık 60 milyon dolar olarak raporlanmıştır (McDermott ve ark., 2013). Türkiye'de bu oranın yaklaşık yıllık 40 milyon dolar civarında olduğu düşünülmektedir (Can & Yalçın, 2014).

### **1.8. Brusella ile İlgili Proteom Çalışmaları**

Brusella'da eksprese edilen proteinleri tanımlamak için yapılan ilk protein çalışmalarında tek boyutlu sodyum dedosil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve / veya immünoiblota teknikleri kullanılmıştır. Bu çalışmalar ile elde edilen protein bant profillerinin türe özgü olduğu ortaya koyulmuştur (Hill & Cook, 1994; Morris, 1973). Söz konusu çalışmada hem *B.abortus* hem de *B.suis* izolatlarında 35 ortak bant



saptanmıştır. On bant bir türe özgü olarak belirlenmiştir. On beş bant ise türler arasında farklılık olarak belirlenmiştir (Hill & Cook, 1994).

Daha sonra yapılan bazı çalışmalarda brusella'nın tek bir pH aralığındaki 2 boyutlu elektroforez jelleri ile proteomları karakterize edilmiştir. Çeşitli çalışmalar ile bakteriye ait 54 adet protein tanımlanmıştır (Sowa, Kelly, Ficht, & Adams, 1992; Teixeira-Gomes, Cloeckaert, Bézard, Bowden, ve ark., 1997; Teixeira-Gomes, Cloeckaert, Bézard, Dubray, & Zygmunt, 1997). Proteinlerin tanımlanmasında brusella'ya karşı antikorlar içeren hayvan serumları kullanılmıştır. Çalışmalar sonucunda saptanan başlıca proteinler; Alanyl aminopeptidase, Amino acid ABC-type transporter, Dihydrolipoamide succinyltransferase, Leu/Ile/Val-binding protein precursor, L7/L12 ribosomal protein, Lumazine synthase (18 kDa), Malate dehydrogenase, Succinyl-CoA synthetase a subunit, Superoxide dismutase (Cu, Zn), BCSP 31, 32.2-kDa protein, 22.9-kDa protein, BA 14K, BP 26, ClpP (27 kDa), CP24, DNA K, GroEL, GroES, HtrA, 31-kDa protein, P15, 20-kDa protein, 17-kDa protein, UvrA, YajC, NikA (58 kDa), dış membran proteini (Omp) 89 kDa, Omp 31, Omp 28, Omp 25, Omp 19ve P39'dur.

Brusella proteomu 1980'li yıllarda 2 boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE) ve MALDI/TOF-MS'i de içeren proteomik teknikler kullanılarak kapsamlı bir şekilde analiz edilmiştir. *Brucella melitensis*'te 500'den fazla protein tanımlanmıştır (DelVecchio ve ark., 2002). *B. melitensis* 16M suşu'nun tüm hücre proteinleri izole edildikten sonra pH 3,5-11,0 arası immobilized pH gradient (IPG) şeritleri ile yapılan 2D-PAGE jel elektroforezi sonucunda 557 spot tanımlanmıştır (Wagner ve ark., 2002).

*Brucella spp*'nin belli başlı OMP'leri ilk olarak 1980'lerin başında tanımlanmış ve potansiyel immünojenik ve koruyucu antijenler olarak karakterize edilmişlerdir. Moleküler kütlelerine göre grup 1 (94 veya 88 kDa OMP), grup 2 (36–38 kDa OMP) ve grup 3 (31–34 kDa OMP ve 25–27 kDa OMP) olmak üzere 3 gruba ayrılmışlardır. Bunların arasından grup 1'in rolü ve yapısı aydınlatılamamıştır (Cloeckaert, Vizcaíno, Paquet, Bowden, & Elzer, 2002; Edgardo Moreno & Moriyon, 2006). Omp25 gen bölgesi üzerindeki çalışmalar Omp25'in bir virülans faktörü olduğunu, bu proteinin geninden yoksun *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. ovis* mutantlarının virülansının azaldığını göstermiştir (Cloeckaert ve ark., 2002). Omp22 *B. abortus*'ta; omp25b *B. melitensis* ve *B. suis*'te; omp25c *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis*' te; Omp31b *B. abortus* ve *B. suis*'te tanımlanmıştır (Moreno & Moriyon, 2006).

Farklı çevresel koşullarda brusella suşlarının protein analizlerinin yapıldığı çalışmalar da gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar farklı çevresel stres koşullarında brusella'nın

metabolik aktivitelerinde (Al Dahouk, Jubier-Maurin, Neubauer, & Köhler, 2013; Al Dahouk ve ark., 2009; Zai ve ark., 2017), bazı gen mutanları brusella klonlarının proteomlarında (Park, Im, Shim, & Yoo, 2018) meydana gelen değişikliklerin araştırıldığı çalışmaları, immünoreaktif proteinlerin tanımlandığı çalışmalar (Connolly ve ark., 2006; Lee ve ark., 2014; Pajuaba ve ark., 2012; Wareth ve ark., 2016; Zhao ve ark., 2011) ve aşı determinantı çalışmalarını (Connolly ve ark., 2006; Mahmud, Khan, & Iqbal, 2019) içermektedir. Bu çalışmalarda insan için bazı proteinler (ABC transporter permease, fumarate reductase flavoprotein subunit, F0F1-type ATP synthase  $\alpha$  subunit, cysteine synthase A vb.) potansiyel aşı adayları olarak raporlanmıştır.

### 1.9. Brusella Aşı Çalışmaları

Hayvanlarda ve insanlarda brusellozu önlemek için ideal bir brusella aşısının geliştirilmesi için yirminci yüzyılın başından beri araştırmalar yapılmaktadır (Nicoletti, 1990). Hayvanlarda uygulanabilen aşılar mevcut olmasına rağmen insan brusellozunun önlenmesi için lisanslı bir aşı henüz yoktur. Hayvanlarda kullanılan aşılarda aşırı duyarlılık reaksiyonlarına sebep olması ve enfeksiyon oluşturma potansiyelinin bulunmasından dolayı insanlarda kullanılmamaktadır. İnsanlarda kullanım için ideal bir aşı mutlaka güvenli ve etkili olmalıdır. Hastalık oluşturmamalıdır ve uzun ömürlü koruma sağlamalıdır. Tek bir doz uygulanması tercih edilse dahi aşının etkinliğine bağlı olarak doz ayarlaması yapılabilir (Perkins, Smither, & Atkins, 2010).

Bruselloza karşı canlı ve inaktive aşılarda geliştirilmiş olmasına rağmen istenilen koruyuculuk elde edilememiş ancak modifiye canlı aşılarda üstün koruyucu immünojenler olduğu gösterilmiştir (Avila-Calderón, Lopez-Merino, Sriranganathan, Boyle, & Contreras-Rodríguez, 2013). *Brucella abortus* S19 eski Sovyetler Birliği'nde bir dönem insan aşısı olarak kullanılmıştır (Vershilova, 1961). Bununla birlikte, S19 ve *B. melitensis* Rev.1'in insanlarda bruselloza neden olduğu ve bu nedenle insan aşılması için uygun olmadığı raporlanmıştır (Spink, Hall, Finstad, & Mallet, 1962). *B. abortus* 19BA ve *B. melitensis* 104M gibi çeşitli canlı zayıflatılmış suşlar eski Sovyetler Birliği'nde ve Çin'de bir süre aşı olarak kullanılmış ancak sınırlı etkinlik gösterdiği belirtilmiştir (Perkins ve ark., 2010). Bunlara ek olarak, çeşitli brusella fraksiyonları potansiyel insan aşılarda denenmiştir ancak etkinlikleri halen belirsizliğini korumaktadır. Bunlar esas olarak peptidoglikan, protein ve düz LPS'lerden oluşan *B. abortus* veya *B. melitensis*'in fenolde çözünmeyen sodyum dodesilsülfat (SDS) fraksiyonunu içerir (Lopez-Merino ve ark., 1976). Bu aşı

preparatının fare modelinde immünojenik ve enfeksiyonuna karşı koruyucu olduğu değerlendirilmiştir. Aşının insanlarda da immünojenik olduğu belirtilmiştir. Ancak aşının aynı zamanda bazı yan etkileri olduğu görülmüş, enjeksiyon bölgesinde ciddi lokal ağrıya ve aşılama ateşine neden olduğu belirlenmiştir (Hadjichristodoulou ve ark., 1994; Rasooly, Olitzki, & Sulitzeanu, 1966; Renoux & Tinelli, 1973).

Brusella'nın çok sayıda alt birim fraksiyonu fare modelinde rekombinant protein aşıları olarak çalışılmış ve bunların bazıları koruyucu etkinlik göstermiştir (Oliveira, Giambartolomei, & Cassataro, 2011). Bunlar 22,9 kDa, 32,2 kDa, BLS, Cu-Zn SOD, DnaK, L7/L12, IalB, Omp16, Omp19, Omp31, P39, SurA proteinlerini içerir (Perkins ve ark., 2010).

Bakteriyel hücre yüzeyi antijenleri patojen ve konakçı arasındaki ilk temas noktası olduklarından dolayı aşı için başlıca adaylardır. Bir çalışmada brusella'nın dış zarında bir kaç immünojenik antijen belirlenmiştir (Cassataro ve ark., 2005). Bunlar *B.melitensis*'e ait Omp31, *B.abortus*'a ait Omp16, Omp19, Omp25 ve Omp28 rekombinant proteinler olup hayvan deneylerinde aşı adayı olarak denenmiştir (Cassataro ve ark., 2005; Goel & Bhatnagar, 2012; Kaushik ve ark., 2010; Pasquevich ve ark., 2010, 2011). Bunlardan farklı olarak, *B. abortus*'un periplazmik proteini olan Cu-Zn SOD'ın üç peptiti (peptit 1 (GGDNYSDKPEPLGG), peptit 2 (LAEIKQRSLMVHGG) ve peptit 3 (GGAPGEKDGKIVPAG)) aşı determinantı olarak fare deneylerinde çalışılmış olup, sadece bir peptitin (peptit 3) *B. abortus* 2308'e karşı önemli bir koruma sağlayabildiği gösterilmiştir (Tabatabai & Pugh, 1994). Ayrıca sitozolik proteinler olan SurA ve DnaK saflaştırılmış rekombinant proteinleri de farelerde aşı determinantı olarak değerlendirilmiş, her iki protein de *B. abortus*'a karşı canlı aşı kontrolüne kıyasla orta seviyelerde benzer koruma seviyeleri gösterdiği belirlenmiştir (Delpino, Estein, Fossati, Baldi, & Cassataro, 2007).

DNA aşıları hem hümoral hem de hücrel bağışıklık yanıtı oluşturabilirler ancak genellikle protein aşılardan daha düşük miktarda bağışıklık yanıtı indüklerler. Omp31 eksprese eden bir DNA aşısının Incomplete Freund Adjuvant ile kombine halde kullanıldığında, rekombinant protein ile benzer koruma seviyeleri sağladığı raporlanmıştır (Cassataro ve ark., 2005).

Son zamanlarda brusella dış membran vezikülleri (OMV)'nin potansiyel aşı olarak kullanımını araştırılmıştır. Fareleri immünize etmek için hem *B. melitensis* 16M hem de *B. melitensis* VTRM1 suşlarından saflaştırılmış OMV'ler kullanılmıştır. Canlı *B. melitensis* aşısı ile karşılaştırıldığında benzer koruma sağladığı görülmüştür. Tüm bu çalışmalar

rağmen halen insanda güvenle kullanılabilir bir aşı bulunmamıştır (Avila-Calderón ve ark., 2013).

### **1.10. İmmünoproteomik Yöntemler**

İmmünoproteomik, yüksek verimli proteomik teknolojiler yoluyla bağışıklık sisteminin protein hedeflerinin incelenmesidir. İmmünoproteomik yöntemler patojen mikroorganizmalar, konakçı hücreler veya immün sistemi uyaran diğer moleküllere karşı oluşmuş immün sistem proteinlerinin veya peptitlerinin tanımlanması için kullanılan çeşitli teknikleri içerir. Kütle spektrometresi dahil genomik ve proteomik alanındaki son teknikler, immünoproteomik yöntemlerin hızla gelişmesine olanak sağlamıştır. İmmünoproteomik yöntemler hastalıkların nasıl oluştuğunun ve ilerlediğinin anlaşılmasını, hastalıkların biyobelirteçlerinin ve potansiyel aşı adayları moleküllerin belirlenmesini sağlar (Fulton & Twine, 2013).

Hasta serumlarının otoreaktivite profillerinin belirlenmesinde ve otoimmün hastalıklardan sorumlu antijenlerin tanımlanmasında kullanılan en yaygın yöntem serolojik proteome analizi (SERPA) veya PROTEOMEX olarak adlandırılır (Klade ve ark., 2001). Bu yöntemde potansiyel otoantijenleri içeren bütün doku/hücre proteinleri, üç kopya jel halinde 2D-PAGE jeli üzerinde yürütülür. Bu 2D-PAGE jellerinden ikisi, immünblotlama için kullanılır: biri hasta serumuyla diğeri kontrol serumla immünblotlamaya tabi tutulur. Hasta serumu ile blotlanan jelde bulunan ancak kontrol serumu ile blotlanan jelde bulunmayan protein spotları tespit edilir. Bu protein spotları üçüncü 2D-PAGE jelinden toplanır. Toplanan protein spotları tripsin ile muamele edilerek peptit haline getirilir. Elde edilen peptitler sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC-MS/MS) veya MALDI/TOF-MS sistemleriyle tanımlanır (Cottrell, Hall, Rosen, & Casciola-Rosen, 2012).

Antijenlerin Otoantikor Aracılığıyla Tanımlanması (AMIDA) yöntemi, immünoproteomik yöntemlerinin en yenisidir. AMIDA yönteminde hücre lizatlarında bulunan potansiyel antijenleri immünyakalama yöntemiyle tanımlamak için antikorları içeren hasta serumu kullanılır (Gires ve ark., 2004). İmmünyakalama ise manyetik boncuklar veya agaroz reçinesi gibi katı bir faza bağlanmış spesifik antikorlar kullanılarak antijenlerin küçük ölçekli afinite saflaştırması işlemidir. İmmünyakalama proteinlerin veya diğer biyomoleküllerin, Western blot veya diğer teknikler ile tespit edilmesi amacıyla hücre lizatlarının kullanıldığı en yaygın yöntemlerden biridir. Bir proteine spesifik olan antikor, manyetik boncuk gibi bir katı faz üzerine ilk olarak kaplanır ve daha sonra hedef proteini

içeren bir solüsyon ile inkübe edilir. İnkübasyon süresi boyunca solüsyonun hafifçe çalkalanması hedef antijenin antikora bağlanmasını kolaylaştırır. Oluşan immün kompleksler daha sonra manyetik boncuktan biyokimyasal yöntemlerle ayrıştırılır, immünkompleksler bir tüpe alınır ve analiz edilir (Bonifacino, Gershlick, & Dell'Angelica, 2016).



## 2. AMAÇ

Brusella ile ilgili Türkiye’de yapılan ve bizim ulaşabildiğimiz çalışmalar dikkate alındığında, genellikle epidemiyolojik çalışmaların çoğunlukta olduğu görülmektedir. Bunlar, insan ve hayvanlardaki brusella seroprevalanslarını içeren çalışmaları, olgu sunumlarını, moleküler biyolojik teknikler ile brusella izolatlarının tiplendirme çalışmalarını ve multi-lokus varyans analizlerini içermektedir (Cetinkaya, Aktepe, Ciftci, & Demirel, 2005; Gwida ve ark., 2012; Kiliç ve ark., 2011; Otlı, Sahin, Atabay, & Unver, 2008; Sayan, Yumuk, Bilenoglu, Erdenlig, & Willke, 2009; Sümer, Sümer, Alim, Nur, & Özdemir, 2003; Unver, Erdogan, Atabay, Sahin, & Celebi, 2006). Türkiye’deki brusella izolatlarının protein profilleri hakkında temel laboratuvar çalışmaları ile ilgili literatürde sadece tek bir yayına ulaşılabilmektedir. Bu yayında Türkiye’deki bir inekten izole edilmiş tek bir *Brucella abortus* izolatuvar çalışılmıştır (Wareth ve ark., 2016).

Bruselloz tanısının konulması için etkenin üretilmesi altın standarttır, ancak brusella kültürü tecrübe gerektiren, bulaş riski taşıyan ve zaman alan bir işlemdir. Bu yüzden bruselloz tanısı genellikle serolojik testlerle konulmaktadır (Galińska & Zagórski, 2013). WAT, RBT, ELISA ve kompleman fiksasyon testi bunlardan bazılarıdır (Al Dahouk ve ark., 2013; Franco ve ark., 2007; Young, 1991).

Bruselloz tanısında kullanılan serum aglütinasyon, kompleman fiksasyon ve ELISA gibi konvansiyonel serolojik testlerde antijen olarak genellikle tam hücre preparatları, hücre ekstraktları veya LPS fraksiyonları kullanılmaktadır. LPS’ler immün sistemi çok güçlü şekilde uyarmalarına karşın tanıda büyük hatalara sebep olabilmektedirler. Brusella O-polisakkaritine ait immünodominant epitop, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium*, *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O:157, *Stenotrophomonas maltophilia* gibi diğer gram negatif bakterilerin O-polisakkariti ile benzerlik gösterir. Sonuç olarak diğer etkenlere karşı oluşan antikorlar ile çapraz reaksiyon meydana gelmekte ve bu durum tanıda hatalı pozitifliklere sebep olmaktadır. LPS içermeyen ve brusella’ya özgü protein içeren tanı sistemlerinin geliştirilmesi ile bu hatalı pozitifliklerin önüne geçilebileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda brusella’ya yüksek derecede spesifik immünojenik proteinlerin tanımlanması büyük önem taşımaktadır. Bunun yanında brusellozu önlemek için insanlarda güvenle kullanılabilecek bir aşı henüz geliştirilememiştir. Aşı geliştirilmesi özellikle hayvanlarla yakın temasta bulunan çiftçiler ve veterinerler ile laboratuvar çalışanları ve endemik bölgelerde yaşayan kişiler için önem arz etmektedir (Avila-Calderón ve ark., 2013). Son yıllarda brusella’ya spesifik

immünojenik proteinlerin tanımlanmasına yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda hem tanıda kullanılabilecek daha spesifik testlerin geliştirilebileceği hem de gelecekte geliştirilecek alt ünite aşular için değerli verilerin elde edilebileceği öngörülmektedir (Abbady, Al-Daoude, Al-Mariri, Zarkawi, & Muyldermans, 2012; Abo Assali, Al-Mariri, Hamad, & Abbady, 2012; Sascha Al Dahouk ve ark., 2006; J. Y. Kim ve ark., 2014; Ko ve ark., 2012; Lee ve ark., 2015; Pajuaba ve ark., 2012; Tiwari ve ark., 2013; Wareth ve ark., 2016; Yang ve ark., 2011; Zhao ve ark., 2011).

Bu tez çalışması ile Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden izole edilmiş brusella izolatlarının, ortak immünojen protein varlığı açısından immünopteomik bir teknik olan AMIDA yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında Türkiye'den izole edilen dört adet farklı *Brucella melitensis* izolatı çalışılmış ve immünodominant proteinleri açısından birbirleriyle karşılaştırılmıştır. İzolatların Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden izole edildikleri göz önünde bulundurulduğunda, farklı izolatlar arasındaki ortak immünodominant protein benzerlikleri veya farklılıkları belirlenebilmiştir.

### 3. YÖNTEM

Bu tez çalışması Eylül 2016–Kasım 2019 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında ve Kocaeli Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezi Proteomiks Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alındı (Etik kurul onay numarası: KÜ GOKAEK 2019/10.13).

Çalışmada kullanılan ve Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden izole edilen brusella izolatları Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik Öncesi Bilimler Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK tarafından hediye edildi. *B. melitensis* izolatlarından 1062 kodlu izolat Marmara Bölgesi'nden, 1177 kodlu izolat İç Anadolu Bölgesi'nden, 5031 kodlu izolat Doğu Anadolu Bölgesi'nden ve 5112 kodlu izolat Ege Bölgesi'nden izole edilmiş.

#### 3.1. Brusella İzolatlarının Tanımlanması

Tüm izolatlara Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri yapıldı. Bakteriler %5 koyun kanlı agar (GBL, Türkiye) besiyerine pasajlandı. Kültür plakları mumlu jar içerisinde 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi (Şekil 3.1). Üreyen kolonilerden preparat hazırlanarak Gram boyama prosedürü ile boyandı. Daha sonra oksidaz ve katalaz testleri yapıldı.



Şekil 3.1. Kültür plaklarının jar içerisinde inkübasyonu.



Katalaz testi için %3'lük hidrojen peroksit solüsyonu hazırlandı. Stok %30'luk hidrojen peroksit (Merck, Almanya)'ten 0,1 ml alınıp 0,9 ml distile su içerisine bırakıldı. Hazırlanan bu solüsyondan lam üzerine bir damla %3'lük hidrojen peroksit solüsyonu damlatıldı. Üreyen kolonilerden bir miktar alınıp damla içerisinde süspanse edildi. Hava kabarcığı oluşumu katalaz pozitif olarak değerlendirildi.

Oksidaz testi için %1'lik tetrametil-parafenilen diamin hidroklorid solüsyonu hazırlandı. Bir gram tetrametil-parafenilen diamin hidroklorid tozu (Merck, Almanya) tartılarak yüz mililitre distile su içerisinde süspanse edildi. Solüsyonun ışıktan etkilenmemesi için tüp etrafı alüminyum folyo ile kapatıldı. Hazırlanan bu solüsyondan bir damla alınıp kurutma kağıdı üzerine damlatıldı. Üreyen kolonilerden bir miktar alınıp solüsyon damlatılmış kurutma kağıdına sürüldü. Mor renk oluşumu oksidaz pozitif olarak değerlendirildi.

Bakteriler klasik PZR ile moleküler olarak da tanımlandı. Probert'in Gerçek Zamanlı PZR protokolü modifiye edilerek klasik PZR olarak kullanıldı (Probert ve ark., 2004). Öncelikle bakteriler koyun kanlı agar besiyerinde 37°C'de 24-48 saat inkübe (MIR-162, Sanyo, Japonya) edildi. Üreyen bakterilerden ticari kit (Roche, İsviçre) ile üreticinin önerileri doğrultusunda DNA izolasyonu yapıldı. Bu amaçla; bakteri kültüründen bir öze dolusu koloni toplanıp steril bir mikrosantrifüj tüpü içerisinde 180 µl ATL tamponu ile süspanse edildi. Üzerine 20 µl Proteinaz K ilave edildi ve 56°C'de 1-3 saat inkübe (Finepcr, Güney Kore) edildi. İnkübasyon süresi sonrası tüp içerisine 200 µl AL tamponu eklendi. Solüsyon 70°C'de 10 dakika inkübe (Finepcr, Güney Kore) edildikten sonra üzerine 200 µl %96'lık etil alkol ilave edildi. Vorteks (Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) ile 15 saniye karıştırıldıktan sonra tüm sıvı spin kolon içerisine alındı. Örnek 6000 x g'de 1 dakika santrifüj (Mpw, Polonya) edildikten sonra filtrat atıldı. Kolon üzerine 500 µl AW1 tamponu eklendi, tekrar santrifüj edildi ve filtrat atıldı. Daha sonra kolon üzerine 500 µl AW2 tamponu ilave edildi, santrifüj edildi ve filtrat uzaklaştırıldı. Kolon steril bir mikrosantrifüj tüpü içerisine alındı. Kolona tutunmuş olan DNA'yı kolondan ayırmak için 50 µl AE tamponu eklendi ve yeniden santrifüj edildi. Elde edilen DNA steril mikrosantrifüj tüplerine alındı ve PZR işlemine kadar -20°C'de (Sanyo, Japonya) muhafaza edildi. Yöntem temel olarak şu basamakları içermektedir: (1) lizozim ile bakteri hücre duvarının parçalanması ve nükleik asitlerin ortama salınması; (2) kaotropik tuz ve proteinaz k ile nükleazların inaktivasyonu; (3) nükleik asitlerin spin kolona bağlanması; (4) yıkamalar ile nükleik asitlerin diğer hücresel bileşenlerden ayrıştırılması; (5) elüsyon tamponu ile nükleik asitlerin spin kolondan salınması ve mikrosantrifüj tüpüne toplanması.

Klasik PZR ile brucella izolatlarının tanımlanmasında Tablo 3.1’de verilen gen bölgeleri ve primer dizileri kullanıldı. PZR karışımı toplam 25 µl hacimde olacak şekilde 10X Hot Start tamponu (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri), MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri), deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri), primer çiftleri ve kalıp DNA kullanılarak hazırlandı. Karışım içeriği Tablo 3.2’te gösterildiği gibi hazırlandı. PZR reaksiyonu iCycler (BioRad, Amerika Birleşik Devletleri) marka thermal cycler’da gerçekleştirildi. Örnekler önce denatürasyon ve enzim aktivasyonu için 95°C’de 10 dakika bekletildi. Sonrasında 94°C’de 15 saniye denatürasyon ile 57°C’de 1 dakika yapışma ve uzama olacak şekilde toplam 45 döngü gerçekleştirildi.

**Tablo 3.1.** Brusella izolatlarının tanımlanması için yapılan klasik PZR’de kullanılan gen bölgeleri ve bu gen bölgelerini çoğaltmak için kullanılan primer dizileri.

Bakteri adı	Gen bölgesi	Primer dizileri (5’ – 3’ yönünde)	
<i>Brucella</i> spp.	<i>bcs</i> p31	Forward	GCTCGGTTGCCAATATCAATGC
		Reverse	GGGTAAAGCGTCGCCAGAAG
<i>B. melitensis</i>	BMEI1162	Forward	AACAAGCGGCACCCCTAAAA
		Reverse	CATGCGCTATGATCTGGTTACG
<i>B. abortus</i>	<i>alkB</i>	Forward	GCGGCTTTTCTATCACGGTATTC
		Reverse	CATGCGCTATGATCTGGTTACG

Oluşan PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. Elektroforez işlemi için Tris-borik asit EDTA (TBE) tamponu içerisinde %1’lik agaroz (Sigma, Amerika Birleşik Devletleri) jel hazırlandı. Temiz bir şişe içerisine 0,3 g agaroz eklendi, üzerine 30 ml 0,5X TBE tamponu ilave edildi. Şişe mikrodalga fırın (Bosch, Almanya) içerisine alındı ve içerisindeki agaroz tamamen eriyene kadar ısıtıldı. Şişe iyice çalkalanarak içerisindeki solüsyon homojen hale getirildi. Solüsyon ısısı 55-60°C’ye geldiğinde 10 mg/ml’lik stok etidyum bromür (Sigma, Amerika Birleşik Devletleri) solüsyonundan içerisine bir miktar (1-1,5 µl) ilave edildi ve iyice çalkalandı. Hazırlanan jel dökme aparatı içerisine döküldükten sonra soğuyana kadar oda ısısında bekletildi. PZR ürünlerinden 5 µl alınıp 1 µl 6X DNA yükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra agaroz jelin kuyularına sırayla yüklendi. Marker

olarak GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı.

**Tablo 3.2.** Klasik PZR’de kullanılan reaktifler ve çalışma konsantrasyonları.

Reaktifler	Stok konsantrasyonu	Çalışma konsantrasyonu	Bir örnek için gereken hacim (µl)
Hot Start tamponu	10X	1X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 mM	3
dNTP karışımı	25 mM	0,25 mM	0,25
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	1,5 U	0,31
Primer (her birinden)	10 µM	0,2 µM	0,5
Steril distile su			13,94
Örnek DNA			2
Toplam hacim			25

### 3.2. Brusella’dan Membran Proteini İzolasyonunun Yapılması ve Gösterilmesi

#### 3.2.1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan tampon çözeltiler Tablo 3.3’de verildiği gibi hazırlandı.

**Tablo 3.3.** Çalışmalarda kullanılan çözeltiler, konsantrasyonları, miktarları ve hazırlanışları.

Çözelti / Besiyeri Adı	Konsantrasyonu ve Miktarı	Hazırlanışı
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (pH:8)	0,5M, 500 ml	73.06 g EDTA tartılarak 450 ml saf suda 60 °C’de karıştırılırken sodyum hidroksit pelleti (NaOH) ilave edilerek çözüldü. pH:8’e ayarlandıktan sonra distile su ile 500 ml’ye tamamlandı.
TBE tamponu	10X, 600 ml	64,8 g Tris, 33 g borik asit ve 24 ml EDTA (0,5 M pH 8,0) 550 ml saf suda çözüldü, 600 ml’ye tamamlanarak otoklavda steril edildi.
TBE tamponu	0,5X, 1 litre	50 ml 10X TBE tamponu üzerine 950 ml distile su ilave edildi.

<b>Çözelti / Besiyeri Adı</b>	<b>Konsantrasyonu ve Miktarı</b>	<b>Hazırlanışı</b>
Tris.HCl, pH:8	10 mM, 500 ml	0,6057 g Tris tartılarak 480 ml distile suda çözüldü. HCl ile pH:8'e ayarlandı ve 500 ml'ye tamamlandı.
Lizozim	100 µg/µl, 500 µl	0,05 g lizozim tartıldı, 500 µl Tris.HCl (pH:8) ile çözüldü.
Sarcosyl	%10, 5 ml	0,5 g sarcosyl 5 ml Tris.HCl (pH:8) ile çözüldü.
Sodyum deoksikolat (DOC)	%0,2, 10 ml	%10'luk stok DOC'tan 0,2 ml alınıp MilliQ su ile 10 ml'ye tamamlandı.
Trikloroasetik asit (TCA)	%72, 50 ml	110 g TCA 50 ml MilliQ su ile çözüldü (%100 TCA). 36 ml %100 TCA üzerine 14 ml MilliQ su ilave edildi. +4°C'de karanlıkta saklandı.
Tris.HCl, pH:8,8	1,5 M, 100 ml	18,15 g Tris tartılarak 80 ml distile suda çözüldü. HCl ile pH:8,8 'e ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı.
Tris.HCl, pH:6,8	0,5 M, 100 ml	6 g Tris tartılarak 80 ml distile suda çözüldü. HCl ile pH:6,8 'e ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı.
SDS	%10, 10 ml	1 g SDS tartılıp 10 ml distile suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.
Amonyum Persülfat (APS)	%10, 10 ml	1 g APS tartılıp 10 ml distile suda çözüldü. Filtre edildi ve +4°C'de saklandı.
6X Yükleme Boyası	0,5 M Tris-HCl pH:6,8 Glycerol (%99,7), %10 SDS, β-Mercaptoethanol, %0,5 (w/v) Bromphenol blue	1 ml 0,5 M Tris-HCl pH:6,8, 2 ml Glycerol %99,7), 1,6ml %10 SDS, 0,4 ml β-Mercaptoethanol, 0,4 ml %0,5 (w/v) Bromphenol blue 2,6 ml distile su ilave edildi.
Akrilamid/Bisakrilamid	%30, 100 ml	29,2 g Akrilamid, 0,8 g Bisakrilamid tartılıp 100 ml distile suda çözüldü. Filtre edildi ve +4°C'de saklandı.
SDS-PAGE Yürütme Tamponu	5X, 300 ml	4,5 g Tris, 21,6 g Glisin ve 1,5 g SDS distile suda çözümlenerek 5X tampon 1X 'e seyreltildi.
SDS-PAGE Sabitleştirici Solüsyon (Fiksatif)	%40 Metanol, %10 Asetik asit, 100 ml	40 ml Metanol ve 10 ml Asetik Asit karıştırılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

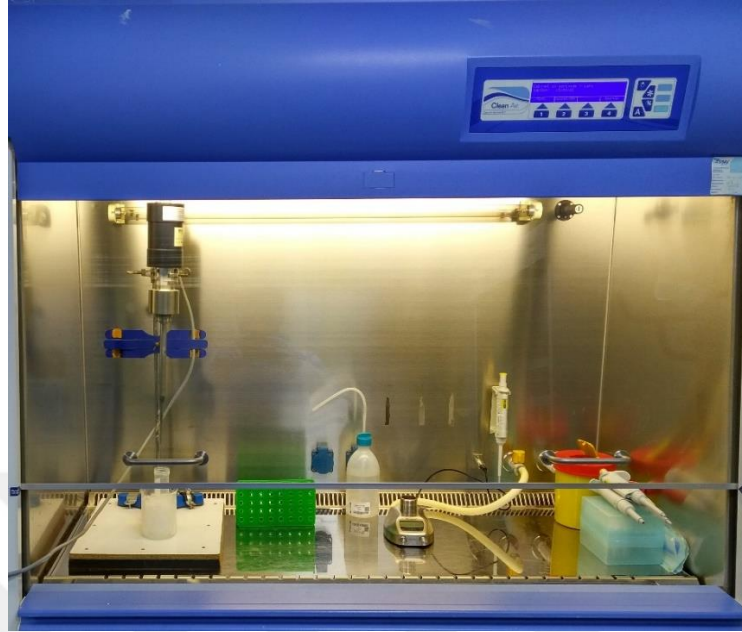
<b>Çözelti / Besiyeri Adı</b>	<b>Konsantrasyonu ve Miktarı</b>	<b>Hazırlanışı</b>
Coomassie Blue boyası	100 ml	Kullanmadan hemen önce hazırlandı. 70 ml stok Coomassie üzerine önce 10 ml ortho-fosforik asit daha sonra 20 ml metanol eklendi. Hazırlanan solüsyon manyetik karıştırıcıda 15 dakika karıştırılarak homojen hale getirildi.
Destaining tamponu (In-Gel Tryptic Digestion)	20 ml	40 mg Amonyum bikarbonat (AmBic) tartıldı, üzerine 10 ml MilliQ su ve 10 ml asetonitril ilave edildi. +4°C'de muhafaza edildi.
Digestion tamponu (25 mM AmBic) (In-Gel Tryptic Digestion)	5 ml	10 mg AmBic tartıldı, 5 ml MilliQ içerisinde çözüldü. +4°C'de muhafaza edildi.
Reducing tamponu (50 mM Tris [2-carboxyethyl] phosphine (TCEP)) (In-Gel Tryptic Digestion)	30 µl	Kullanılmadan hemen önce hazırlandı. 3,3 µl TCEP ile 30 µl digestion tamponu karıştırıldı.
Alkylation tamponu (Iodoasetamit (IAA)), (In-Gel Tryptic Digestion)	35 µl	Kullanılmadan hemen önce karanlıkta hazırlandı. 0,7 mg IAA 7 µl MilliQ su ile çözüldü (5X IAA). Üzerine 28 µl digestion tamponu ilave edildi.
Aktif tripsin (10 ng/µl) (In-Gel Tryptic Digestion)	10 µl	Kullanılmadan hemen önce hazırlandı. 1 µl tripsin üzerine 9 µl digestion tamponu ilave edildi.
Trifloroasetik asit (TFA)	%1, 1 ml	10 µl TFA üzerine 990 µl MilliQ su ilave edildi.
TFA	%0,1, 1 ml	1 µl TFA üzerine 999 µl MilliQ su ilave edildi.
Tris tamponu	0,1 M, 500 ml	6 g Tris tartılarak 450 ml distile suda çözüldü. HCl ile pH:7,6 'e ayarlandı ve 500 ml'ye tamamlandı.
Dithiothreitol (DTT)	0,1 M, 10 ml	0,15 g DTT 10 ml distile suda çözüldü.
Filtre destekli numune hazırlama (FASP) Lizis tamponu	40 ml	0,1 M Tris tamponu (pH: 7,6) içerisinde %4 SDS ve 0,1 M DTT ilave edildi.
Üre Solüsyonu (FASP Kiti)	1 ml	FASP kitinde bulunan Üre tüpü içerisine yine FASP kitinde bulunan

<b>Çözelti / Besiyeri Adı</b>	<b>Konsantrasyonu ve Miktarı</b>	<b>Hazırlanışı</b>
		Tris solüsyonundan 1 ml ilave edildi. Çözülene kadar tüp ters-düz edildi.
10X IAA (FASP Kiti)	100 µl	FASP kitinde bulunan IAA tüpü içerisine üre solüsyonundan 100 µl ilave edildi. Pipetaj yapılarak karıştırıldı.
AmBic	50 mM, 10 ml	40 mg AmBic tartılıp 10 ml distile suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.
Binding tamponu (Afinite kromatografisi / Protein G kolon)	200 ml	20 mM sodyum fosfat, 100 mM NaCL, pH:7,4
Elution tamponu (Afinite kromatografisi / Protein G kolon) (0,1 M Glycine.HCl, pH: 2,7)	200 ml	1,5 g Glycine 150 ml distile su içerisinde çözüldü. HCl ile pH:2,7'ye ayarlandı. 200 ml'ye tamamlandı.
Neutralization tamponu (Afinite kromatografisi / Protein G kolon) (1 M Tris.HCl, pH:9,0)	200 ml	24 g Tris 150 ml distile su içerisinde çözüldü. HCl ile pH:9'a ayarlandı. 200 ml'ye tamamlandı.
Digestion tamponu (50 mM AmBic) (In-Solution Tryptic Digestion)	500 µl	Kullanılmadan hemen önce hazırlandı. 2 mg AmBic tartıldı, 500 µl MilliQ içerisinde çözüldü.
Reducing tamponu (100 mM DTT) (In-Solution Tryptic Digestion)	500 µl	Kit içerisinden çıkan DTT tüpü içerisine 500 µl MilliQ su ilave edildi. İyiçe çözüldükten sonra 50'şer µl porsiyonlanarak -20°C'de saklandı.
Alkylation tamponu (100 mM IAA), (In-Solution Tryptic Digestion)	100 µl	Kullanılmadan hemen önce karanlıkta hazırlandı. 1,8 mg IAA 100 µl MilliQ su ile çözüldü. Etrafı alüminyum folyo ile sarıldı.
Aktif tripsin (100 ng/µl) (In-Solution Tryptic Digestion)	10 µl	Kullanılmadan hemen önce hazırlandı.1 µl stok tripsin üzerine 9 µl MilliQ su ilave edildi.

### 3.2.2. Membran Proteinlerinin İzole Edilmesi

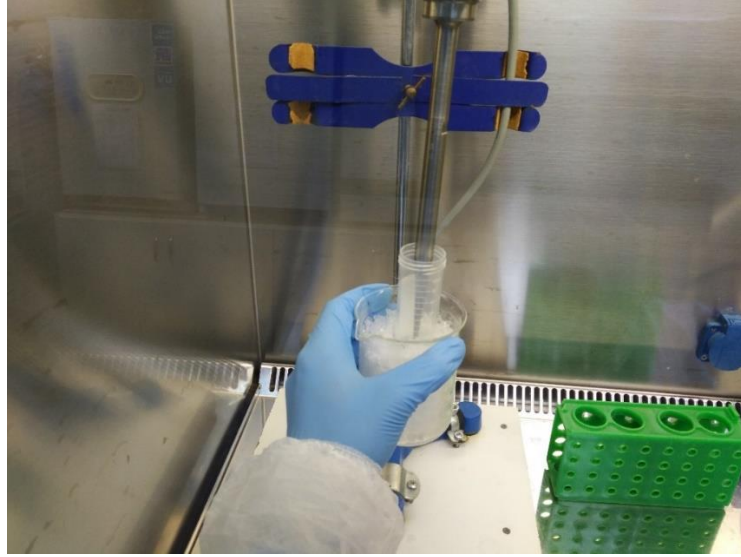
Membran proteini izolasyonu işlemleri sınıf 2 biyogüvenlik kabini (Clean Air Technik, Hollanda) içerisinde gerçekleştirildi (Şekil 3.2). İşlemler sırasında önlük, maske vs. gibi kişisel koruyucu ekipmanlar kullanıldı. Membran proteini izolasyonu işlemi

Ojanen'in protokolü modifiye edilerek uygulandı (Ojanen, Helander, Haahtela, Korhonen, & Laakso, 1993). İzolasyon esnasında yapılan tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.



Şekil 3.2. Membran proteini izolasyonu işlemlerinin yapıldığı ortam.

Brusella izolatı koyun kanlı agar besiyerinde üretildi. Üreyen bakteriler steril plastik öze yardımıyla besiyerinden toplanarak içerisinde steril PBS (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) bulunan falkon tüp içerisinde süspansiyon edildi. Tüp 5000 x g'de 20 dakika santrifüj edilerek bakteriler yıkandı. Bu işlem 2 kere tekrar edildi. Santrifüj sonrasında oluşan pellet buz üzerinde soğutulmuş 5 ml Tris.HCl (pH:8) tamponu ile süspansiyon edildi. Süspansiyon üzerine lizozim (100 µg/µl) solüsyonundan son konsantrasyon 100 µg/ml olacak şekilde (5 µl) ilave edildi. Tüpler 37°C'de 30 dakika inkübe (Sanyo, Japonya) edildi. İnkübasyon sonrasında süspansiyon içerisine bir miktar proteaz inhibitörü (Roche, İsviçre) ilave edildikten sonra sonikasyon (Bandelin, Almanya) işlemi uygulandı (Şekil 3.3). Sonikasyondan sonra elde edilen solüsyon, önceden içerisine çelik boncuklar (Next Advance, Amerika Birleşik Devletleri) ilave edilmiş mikrosantrifüj tüplerine (Eppendorf Safe-Lock, Almanya) alındı. Tüpler Bullet Blender (Next Advance, Amerika Birleşik Devletleri) cihazına koyuldu ve +4°C'de 4 dakika boyunca muamele edildi (Şekil 3.4). Bu işlem 4 kere tekrar edildi. Daha sonra tüplerdeki sıvı çekilerek yeni mikrosantrifüj tüplerine alındı. Tüpler 15,000 x g'de 60 dakika boyunca +4°C'de santrifüj (Beckman Coulter, Amerika Birleşik Devletleri) edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant nazikçe uzaklaştırıldı. Pellet 1 ml soğuk Tris.HCl (pH:8) ile süspansiyon edildi. Örneklerdeki protein miktarları ölçüldü.



**Şekil 3.3.** Bakterilerin sonikasyon işlemi ile parçalanması.



**Şekil 3.4.** Bakterilerin bullet blender cihazında +4°C’de çelik boncuklar ile parçalanması.

Protein miktarlarını ölçebilmek için Bradford Assay (Bradford, 1976) yöntemi kullanıldı. Ölçülecek protein solüsyonundan 10 µl alınarak 10 µl standart tamponu ile karıştırıldı. Karışım üzerine 1 ml 1X bradford reagent (BioRad, Amerika Birleşik Devletleri) eklenerek vortekslendi ve karanlıkta 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından örnekler Nanodrop cihazı (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) ile 595nm’de ölçüldü. Örneklerin ölçülen protein konsantrasyonları daha önce 595 nm’ye göre hazırlanmış sığır serum albümin standart eğrisi ile karşılaştırılarak hesaplandı. Her örnek için ölçümler 3 defa tekrarlandı ve bu tekrarların ortalamalarından elde edilen sonuçlar protein örneklerinin konsantrasyonları olarak kabul edildi.



Protein miktarları belirlenen solüsyonların üzerine %10'luk sarcosyl'den son konsantrasyon %1,5 olacak şekilde (176 µl) ilave edildi ve oda ısısında 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler 15,000 x g'de +4°C'de 90 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant ve pellet ayrı ayrı tüplerde saklandı. Her iki örnek de SDS-PAGE jelinde yürütülerek protein profilleri karşılaştırıldı. SDS-PAGE jeline yüklenmeden önce süpernatant örneklerine protein çöktürme prosedürü uygulandı.

### **3.2.3. Proteinlerin Temizlenmesi ve Çöktürülmesi**

Protein örneklerinin tuzlardan, lipitlerden, deterjanlardan, nükleik asitlerden ve fenolik birleşikler gibi kirleticilerden temizlenmesi gerekmektedir. İzolasyon sonrası elde edilen süpernatanda bulunan proteinleri konsantre etmek ve temizlemek amacıyla TCA/DOC/aseton ile protein çöktürme prosedürü uygulandı. Bu prosedür kapsamında %0,2'lik DOC birinci çöktürme ajanı olarak, %72'lik TCA ikinci çöktürme ajanı olarak, aseton ise yıkama solüsyonu olarak kullanıldı.

Protein izolasyon işleminden sonra elde edilen süpernatant örneğinden 1 ml alınarak temiz bir mikrosantrifüj tüpüne bırakıldı. Üzerine 111 µl %0,2'lik DOC eklendi. Tüp nazıkçe alt-üst edildikten sonra buz üzerinde 20 dakika inkübe edildi. Sonra tüp içerisine 111 µl %72'lik TCA ilave edildi ve nazıkçe alt-üst edildikten sonra buz üzerinde 20 dakika bekletildi. İlgili süre sonunda tüp +4°C'de 15,000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant dikkatlice çekildi ve uzaklaştırıldı. Oluşan pellet üzerine 1 ml soğuk saf aseton eklendi. Pellet iyice çözülene kadar vorteks yapıldı. Daha sonra tüp -20°C'de 30 dakika inkübe edildi. Bu süre içerisinde her 10 dakikada bir vorteks işlemi uygulandı. İnkübasyon süresi sonrasında tüp +4°C'de 15,000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Tüp oda ısısında 5 dakika kurumaya bırakıldı. Sonrasında tüp içindeki pellet 2D tamponu ile çözüldü.

### **3.2.4. Kera-free SDS-PAGE ile Protein Bantlarının Görüntülenmesi**

#### **3.2.4.1. Kera-free SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Yüklenmesi**

Proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırmak için kesintili SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanıldı. Yükleme ve ayırma jeli olmak üzere iki kısımdan oluşan bu jel sistemi Tablo 3.4'de verilen kera-free kimyasallar kullanılarak hazırlandı. Kera-free jel dökülmesi için önceden dikkatlice hazırlanan solüsyonlar

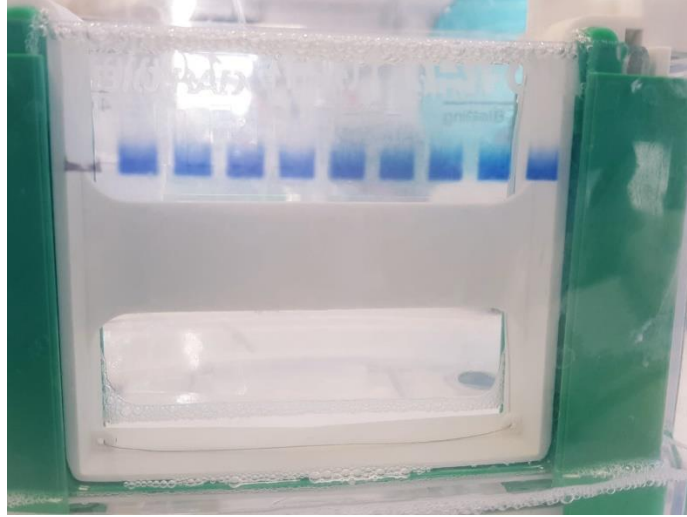
kullanılarak biyogüvenlik kabini içerisinde keratin kontaminasyonu olmamasına özen gösterilerek hazırlandı. Membran proteinlerinin jele daha fazla girebilmesi ve çözülebilmesi için 4M üre içeren %8'lik ayırma jeli ve %4'lük yükleme jeli hazırlandı.

**Tablo 3.4.** Kera-free SDS-PAGE ayırma ve yükleme jeli hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları.

<b>Kullanılan Kimyasallar</b>	<b>Ayırma Jeli (%8)</b>	<b>Yükleme Jeli (%4)</b>
Distile Su (4M üre içeren)	4,64 ml	3 ml
1,5 M Tris, pH:8,8	2,5 ml	-
0,5 M Tris pH:6,8	-	1,25 ml
% 10 SDS	100 µl	50 µl
%30 Akrilamid/BisAkrilamid	2,66 ml	670 µl
% 10 APS	100 µl	50 µl
Tetrametiletildiamin (TEMED)	5 µl	5 µl
<b>Toplam</b>	<b>10 ml</b>	<b>5 ml</b>

Ayırma jeli 50 ml'lik tüp içerisinde hazırlandıktan sonra kendinden 1 mm aralıklı (spacer) kalın ve ince camlar arasına döküldü ve üzerine nazikçe bir miktar izopropanol (Sigma, Amerika Birleşik Devletleri) konularak hem jelin yüzeyinin düzleşmesi sağlandı hem de hava ile olan teması engellendi. Bu şekilde polimerizasyon hızlandırıldı ve aynı zamanda pürüzsüz bir yüzey elde edildi. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra izopropanol döküldü ve jelin yüzeyi saf su ile yıkandı. Jel üzerinde cam plakalar arasında kalan su kurutma kağıdı yardımıyla tamamen uzaklaştırıldı. Yükleme jeli hazırlanarak polimerize olmuş ayırma jelinin üzerine döküldü ve cam plakalara uygun 1 mm genişliğindeki teflon tarak yerleştirildi. Yükleme jeli de polimerize olduktan sonra jellerdeki taraklar çıkartıldı.

SDS-PAGE cam plakaları elektrotların bulunduğu tetracell elektroforez (BioRad, Amerika Birleşik Devletleri) tanklarına yerleştirildi. Elektroforez tankları uygun seviyeye kadar 1X SDS-PAGE yürütme tamponu konularak yürümeye hazır hale getirildi. Brusella'dan membran proteini izolasyonu prosedürü sonunda elde edilen pellet ve süpernatant örneklerinin üzerine 6X yükleme tamponundan 1X olacak şekilde eklenerek 95°C'deki su banyosunda 4 dakika kaynatılarak proteinlerin ileri denatürasyonları sağlandı. Kaynatma süresi sonunda örnekler buza alındı ve kısa bir santrifüj sonrası mikropipet yardımıyla jel içerisindeki kuyucuklara yüklendi. Jel 180V akım verilerek 60 dakika boyunca yürütüldü (Şekil 3.5).



**Şekil 3.5.** SDS-PAGE elektroforez işlemi.

#### **3.2.4.2. SDS-PAGE Jelinin Fiksasyonu ve Boyanması**

Yürütme işlemi bittikten hemen sonra, jeldeki proteinlerin görünür hale getirilmesi için jeller fikse edildi ve boyandı. Fiksasyon için önce jel camlar arasından çıkarıldı. Yükleme jeli kesilerek uzaklaştırıldı. Temiz bir kap içerisine 50 ml SDS-PAGE sabitleştirici solüsyon (fiksatif) eklendi. Ayırma jeli bu kap içerisine bırakıldı. Jel gece boyunca çalkalayıcı (VWR, Amerika Birleşik Devletleri) üzerinde inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.6).



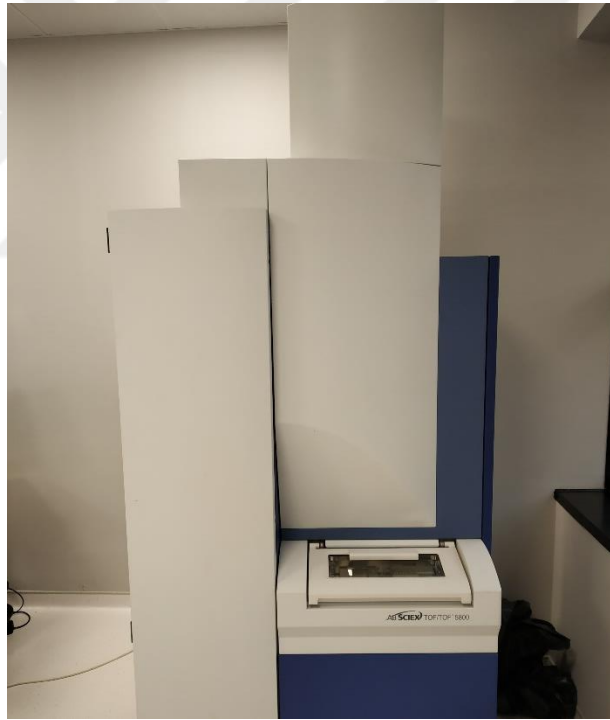
**Şekil 3.6.** SDS-PAGE jelinin gece boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmesi.

Jelin boyanacağı coomassie blue boyası taze şekilde hazırlandı. Fiksatif içerisinde bulunan jel hızlıca MilliQ su ile yıkandı. Hazırlanan boya jel üzerine dikkatlice döküldü ve çalkalayıcı üzerinde gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün jel içerisinde MilliQ su bulunan temiz bir kaba alındı ve birkaç saat boyunca çalkalayıcı üzerinde inkübe edilerek

boyanın fazlasının uzaklaşması sağlandı. Fazla boyadan arındırılan jel son olarak görüntüleme cihazı (BioRad, Amerika Birleşik Devletleri) ile görüntülendi.

### **3.2.5. İzole Edilen Membran Proteinlerinin MALDI/TOF-TOF-MS Analizi ile Gösterilmesi**

SDS-PAGE jelinde görülen bantların membran proteinlerine ait olduklarının gösterilmesi amacıyla MALDI/TOF-TOF-MS analizi gerçekleştirildi (Şekil 3.7). Jeldeki bantlar sadece bant çevresini kapsayacak şekilde bistüri ile dikkatlice kesildi. Tek bir bantı içeren jel parçası temiz bir plastik petri içerisine bırakıldı ve bistüri ile küçük parçalara ayrıldı. Bu işlem tüm bantlar için ayrı ayrı yapıldı. Temiz mikrosantrifüj tüpleri içerisine 100'er µl MilliQ su koyuldu ve her bir protein bandına ait jel parçaları ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne bırakıldı. Sonrasında jel parçalarına tripsin ile kesim prosedürü uygulandı.



**Şekil 3.7.** MALDI/TOF-TOF-MS cihazı.

#### **3.2.5.1. Jel İçindeki Proteinlerin Tripsin ile Kesimi**

Protein bantları 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınarak, üreticinin tavsiye ettiği şekilde In-Gel Tryptic Digestion Kit (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) ile muamele edildi. Protein bantlarının bulunduğu tüp içerisine 30 µl destaining tamponu eklendi ve çalkalayıcıda 15 dakika boyunca çalkalandı. Boya uzaklaştırıldıktan sonra jeller üzerine reducing tamponu eklendi ve 60°C'de 10 dakika inkübe edilerek disülfid bağlarının

kırılması sağlandı. Ardından çözelti pipet yardımıyla çekilerek atıldı ve bağların tekrar kurulmaması için tüpe 30 µl alkylation tamponu ilave edilerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat inkübe edildi. Bu işlemin ardından jeller tekrar 20 µl destaining tamponu ile 15 dakika yıkandı. Ardından yıkama tamponu uzaklaştırıldı ve jeller üzerine 50 µl asetonyitril eklenerek 15 dakika boyunca dehidrasyon sağlandı. Dehidrasyonun sonunda asetonyitril pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve jellerin üzerine 15 µl aktif tripsin solüsyonu eklenerek 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda tüp üzerine 15 µl daha aktif tripsin eklendi. Tüp 30°C'de gece boyu inkübe edildi. Ertesi sabah tüpe 2 kere quick spin ((Scilogex, Amerika Birleşik Devletleri)) ve vorteks (Biosan, Litvanya) işlemi uygulandıktan sonra sonik banyoda (Branson, Amerika Birleşik Devletleri) 15 dakika muamele edildi. Daha sonra tekrar 2 kere quick spin ve vorteks işlemi yapıldı. Kesim işleminin ardından, üst sıvılar temiz tüplere aktarıldı. Tüplerde kalan jel üzerine %1'lük TFA çözeltisi eklenerek 5 dakika çalkalandı. Tüpteki sıvının tamamı kesim reaksiyonundan sonra yeni tüpe koyulan üst sıvının üzerine eklendi. Peptid parçalarının bulunduğu kesim reaksiyonu Speed-Vac (Eppendorf, Almanya) cihazı ile yaklaşık 45 dakika 60°C'de 2500 x g hızda çevrilerek kurutuldu.

### **3.2.5.2. Peptid Örneklerinin MALDI/TOF-TOF-MS Analizi için Hazırlanması**

Speed-Vac cihazından alınan peptid örneği %0,1'lik 10 µl TFA solüsyonu ile çözüldü. Peptid parçaları üreticinin tavsiye ettiği şekilde ZipTip kolonuna bağlandı. Protokol kısaca şu şekilde uygulanmıştır: İlk önce ZipTip kolonu 10µl asetonyitril ile 3 kez yıkanarak ıslatıldı. Ardından da 10 µl %0,1 TFA solüsyonundan 3 kez geçirilerek peptid bağlanması öncesi kolon dengelendi. Dengeleme sonrası peptidlerin kolona bağlanması için örnekler ZipTip kolonundan yavaşça 20 kez geçirildi. Bağlanma sonrası kolona bağlanmayan peptidleri uzaklaştırmak amacı ile 10µl %0,1 TFA ile kolon 3 kez aspire edildi. Bağlanan peptidler 1,4 µl Matriks ( $\alpha$ -Cyano-4hydroxycinnamic) solüsyonu kullanılarak elut edildi ve MALDI Plate'e spotlandı.

### **3.2.5.3. MALDI/TOF-TOF-MS Analizi**

Ziptip sonrası MALDI plate'e yerleştirilen örneklerin MALDI/TOF-TOF-MS (AbSciex, Amerika Birleşik Devletleri) cihazında analizleri yapıldı. MALDI/TOF-TOF-MS bir kütle spektrometresi olup lazer ışığı kullanarak iyonize ettiği peptidleri vakumlu bir tüp içerisinde ayrıştırdıktan sonra kütle/yük (m/z) oranlarına ve peptidlerin amino asit

dizilimlerine göre tanımlamaya yardımcı olmaktadır. Cihazdan elde edilen verilerin online MASCOT data bankasından PROTEIN PILOT programı kullanılarak hangi proteine ait oldukları belirlendi. Elde edilen proteinler arasındaki biyolojik ilişkiyi ortaya koymak ve ilişkili yolları belirlemek için ise STRING ve PANTHER programları kullanıldı.

MALDI kalibrasyonu eksternal veya internal kalibrant kullanıldı ve her bir spektrum için ortalama 200 lazer vuruşu kullanıldı. Elde edilen tüm spektralar (m/z), arama parametreleri; bir hatalı kesim bölgesi, fiksed modifikasyon olarak carbamidomethyl (cysteine), değişken modifikasyon olarak Met oksidasyonu, peptid yükü +1, monoizotopik kütle değerleri, peptid kütle toleransı  $\pm 50$  ppm, fragment kütle toleransı  $\pm 0,25$  Da olarak belirlenerek MASCOT bilgi bankasında analiz edildi.

### **3.2.6. Nano LC-MS/MS Analizi ile Membran Protein İzolasyon Oranının Belirlenmesi**

MALDI/TOF-TOF-MS analizi ile membran proteini varlığı gösterilen örneklerin içerisindeki membran proteini oranını belirlemek için Nano LC-MS/MS analizi gerçekleştirildi. Bu kapsamda brusella izolatından 3.2.2 ve 3.2.3 bölümlerindeki işlemler yeniden uygulandı ve yeniden membran proteini izole edildi. İzole edilen proteinler son santrifüj aşamasından sonra FASP lizis tamponunda çözüldü, protein miktarı belirlendi ve kullanılıncaya kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de (Sanya, Japonya) muhafaza edildi.

#### **3.2.6.1. Nano LC-MS/MS Analizi İçin Örnek Hazırlanması**

İlgili işlemler sonunda elde edilen pellet ve süpernatant örneklerine, üreticinin önerileri doğrultusunda FASP protein kesim kiti (Expedeon, İngiltere) protokolü uygulandı. Örneklerden 30'ar  $\mu\text{l}$  FASP lizis tamponu içerisinde çözüldü. Örnek üzerine 200  $\mu\text{l}$  üre solüsyonu ilave edildi ve tüm solüsyon spin filtre içerisine alındı. Filtre 14,000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpünde biriken sıvı atıldı. Farklı bir tüpe 10X IAA solüsyonundan 10  $\mu\text{l}$  alınıp üzerine 90  $\mu\text{l}$  üre solüsyonu ilave edildi. Hazırlanan bu solüsyon filtre üzerine koyuldu, alüminyum folyo ile sarıldı ve vorteks yapıldı. Filtre karanlıkta ve oda ısısında 20 dakika inkübe edildi. Sonrasında 14,000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpünde biriken sıvı atıldı. Filtre üzerine 100  $\mu\text{l}$  üre solüsyonu ilave edildi ve tekrar 14,000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpünde biriken sıvı atıldı. Bu işlem 2 kere daha tekrarlandı. Filtre üzerine 50 mM AmBic solüsyonundan 100  $\mu\text{l}$  ilave edildi ve 14,000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.

Bu işlem 2 kere daha tekrarlandı. Filtre üzerine 30 µl tripsin solüsyonu eklendi ve vorteks yapıldı. Tüpün ağzı parafilm ile sarılarak 37°C’de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün filtre temiz bir mikrosantrifüj tüpü içerisine alındı. Filtre içerisine 50 mM AmBic solüsyonundan 40 µl ilave edildi, vorteks yapıldı ve 14,000 x g’de 10 dakika santrifüj edildi. Alttaki tüpte biriken sıvı atılmadı. Filtre üzerine yeniden 50 mM AmBic solüsyonundan 40 µl ilave edildi, vorteks yapıldı ve 14,000 x g’de 10 dakika santrifüj edildi. Alttaki tüpte biriken sıvı atılmadı. Filtre üzerine 0,5 M NaCl solüsyonundan 60 µl ilave edildi, vorteks yapıldı ve oda ısısında 1 dakika inkübe edildi. Sonrasında 14,000 x g’de 10 dakika santrifüj edildi. Alttaki toplama tüpünde biriken ve parçalanmış protein fraksiyonlarını içeren sıvı Speed-Vac cihazı ile yaklaşık 45 dakika 60°C’de 2500 x g hızda çevrilerek tamamen kurutuldu (Şekil 3.8). Örnek üzerine 20 µl %0,1 formik asit ilave edildi. Formik asit içeren tüp 5 dakika boyunca çalkalama cihazında çalkalandı ve daha sonra sonik banyo uygulandı (Şekil 3.9). Quick-spin cihazı ile yaklaşık 1 dakika döndürülen tüplerden uygun hacimde örnek alınarak cihaza verildi.



**Şekil 3.8.** Örneklerin Speed-Vac cihazı ile kurutulması.



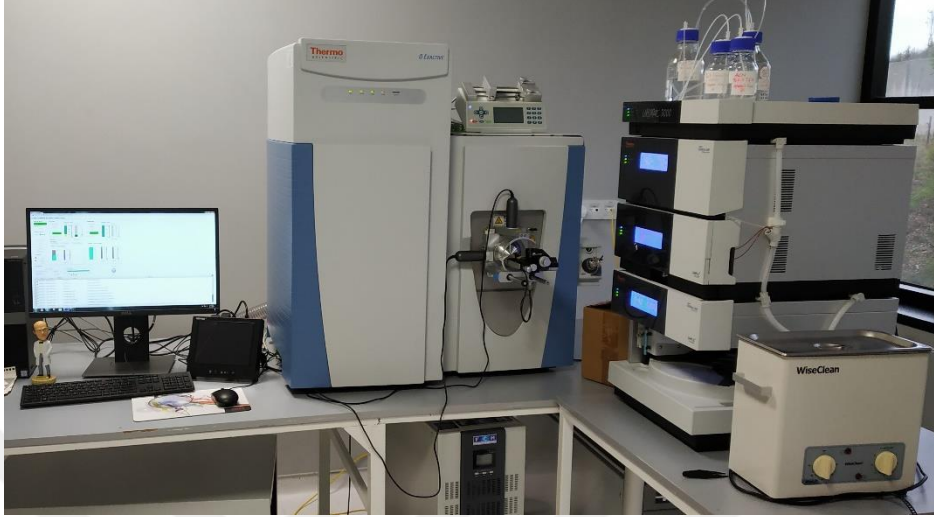
**Şekil 3.9.** Sonik banyo uygulaması ile sıvıdaki baloncukların uzaklaştırılması.

### **3.2.6.2. Hazırlanan Örneğin Nano LC-MS/MS Cihazında Analiz Edilmesi**

Peptidlerin ayırımı Dionex Ultimate 3000 Series RSLC (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) marka bir nano-pompa ile gerçekleştirildi. Bu nano pompa Ultimate 3000 Series TCC-3000RS (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) kolon kompartmanları ile donatılmış olup yine Dionex Ultimate 3000 Series RS (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) oto-örnekleme ünitesine bağlıdır (Şekil 3.10). Sistemin tamamı Xcalibur 4.0 (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) yazılımı ile kontrol edilmektedir. Her bir analiz öncesinde örnekler  $5\text{mm} \times 300\ \mu\text{m}$  i.d.,  $5\ \mu\text{m}$ ,  $100\ \text{Å}$  boyutlarındaki bir C18 materyali içeren yakalama kolonuna (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) dakikada 5 mikrolitre hızla ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kalitesinde su ile hazırlanan %0,05 TFA ve %2 asetonitril içeren çözelti yardımı ile yüklendi (bu aşamada protein ile beraber gelen tuz ve deterjan gibi kirlilikler uzaklaştırılarak sisteme girmesi engellendi). Bu sürenin sonunda peptid elüsyonu iki farklı mobil faz (A ve B) kullanılarak yapıldı. Mobil faz A HPLC kalitesinde su ile hazırlanmış %0,1 (hacim/hacim)'lik formik asit içerirken mobil faz B HPLC kalitesinde asetonitril ile hazırlanmış %0,1 (hacim/hacim)'lik TFA içermektedir. Örnekler Tablo 3.5'te belirtilen gradiyent şartları altında yakalama kolonundan boyutları  $15\ \text{cm} \times 75\ \mu\text{m}$  olan ve  $2\ \mu\text{m}$ ,  $100\ \text{Å}$  çapında C18 materyali ile paketlenmiş Acclaim PepMap RSLC (Thermo Scientific,



Amerika Birleşik Devletleri) analitik bir kolona aktarıldı. Peptidler 130 dk. süreyle ve dakikada 0,3 mikrolite akış hızıyla ayrıştırılarak Thermo Q-exactive kütle spektrometresine gönderildi.



Şekil 3.10. Nano LC-MS/MS cihazı.

Tablo 3.5. nHPLC’de analitik kolona uygulanan mobil fazların gradiyentleri.

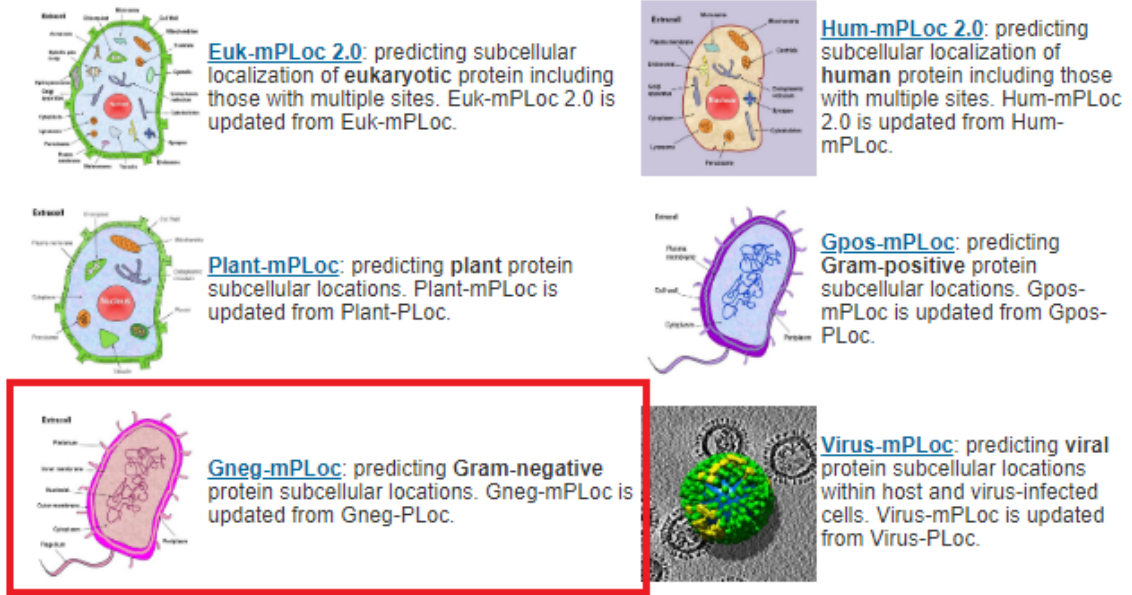
Uygulama aralığı (Dakika)	Mobil B fazı yüzdesindeki artış	Uygulanan Gradyan Tipi
0-45	6-20	lineer
45-75	40	lineer
75-90	90	lineer
90-120	90	Sabit
120-125	6	hızlı düşüş
125-130	94	A fazı ile yıkama

Kolon sıcaklığı 40°C’de tutuldu ve her analizde 2 mikrolitre örnek enjeksiyonu yapıldı. Peptidlerin pozitif yük okuma modunda iyonizasyonunu sağlayabilmek için Nanospray Flex™ (Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) iyon kaynağı kullanıldı. Cihaz parametreleri +2.3 kV voltaj ve 320°C kapiler sıcaklığı olacak şekilde ayarlandı.

### 3.2.6.3. İzole Edilen Membran Proteinini Oranının Belirlenmesi

Nano LC-MS/MS analizi ile tanımlanan proteinlerin hücre içi lokalizasyonu Chou'nun proteinlerin hücre içi lokalizasyonunu tahmin etmek amacıyla geliştirdiği yazılım kullanılarak belirlendi (Chou & Shen, 2008). Bu amaçla <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>. bağlantı adresi 1-30 Mayıs 2019 tarihleri arasında ziyaret edildi. Ekrandaki "Gneg-mPloc" bağlantı adresi tıklanarak Gram negatif bakterilere ait veri tabanına girildi (Şekil 3.11).

#### Cell-PLoc 2.0: A package of web-servers for predicting subcellular localization of proteins in different organisms



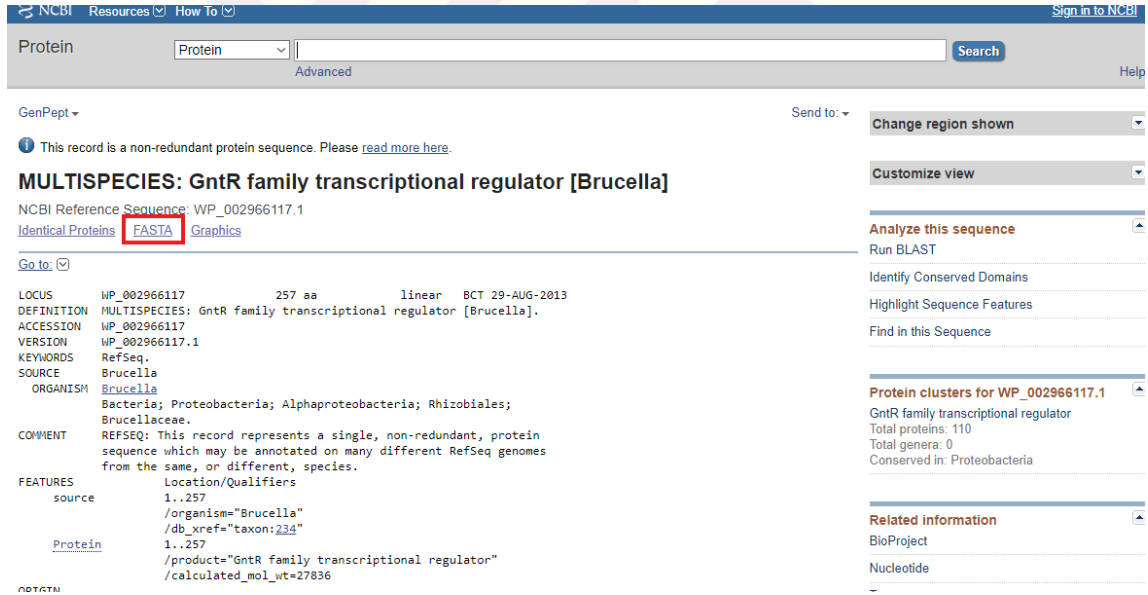
Şekil 3.11. Gneg-mPloc sayfasının görünümü.

Nano LC-MS/MS analiz programının tanımladığı proteinlerin kimlik numaraları (ID) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> bağlantı adresindeki arama çubuğuna yazılarak arama işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Protein kimlik numarası girilen ekran görüntüsü.

Ekranında açılan sayfadan ilgili bağlantı adresine tıklanarak proteinin FASTA formatındaki dizisi elde edildi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Nano LC-MS/MS ile tanımlanan proteinin FASTA formatının görüntülenmesi.

Bu dizi kopyalanarak Chou'nun Gram negatif bakterilerine ait veri tabanı sayfasına yapıştırıldı ve arama gerçekleştirildi (Şekil 3.14).

## Gneg-mPLoc: Predicting subcellular localization of Gram-negative bacterial proteins

| [Read Me](#) | [Data](#) | [Citation](#) | [Download](#) |

Input the Gram-negative protein sequence in Fasta format ([Example](#)):

```
>WP_002966117.1 MULTISPECIES: GntR family transcriptional regulator [Brucella]
MSGNFGAFLPKNLQGSAPSSGAGPLYVQLRQSLAAIRAGQLADGEALPPERDIAEYANISRVTVRKAVD
DLVKAGLLVRRHSGTFVVRPGERVQQLSMLTSFTEDMARRGIATQSRWLERGLYYPSPPEEMKLGSS
ETRVARLGRRLRMVGDMP LAIERASLSSEFLPDPDAVQGS LYAELGRTGFRPVRVQRI AACNIKTS DARI
LGVQEGDAGLSIERLSY LASGRVVEFTKSLYRGDAYDFVAELTIPOS
```

Submit

Clear

### Reference:

Hong-Bin Shen and Kuo-Chen Chou, Gneg-mPLoc: A top-down strategy to enhance the quality of predicting subcellular localization of Gram-negative bacterial proteins, *Journal of Theoretical Biology*, 2010, **264**: 326-333.

Kuo-Chen Chou and Hong-Bin Shen, Cell-PLoc: A package of web-servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms, *Nature Protocols*, 2008, **3**, 153-162.

Kuo-Chen Chou and Hong-Bin Shen: Large-scale predictions of Gram-negative bacterial protein subcellular locations, *Journal of Proteome Research*, 2006, **5**, 3420-8.

If your protein is predicted as Nucleus localization and you want to know its targeting signal, please use our INSP (Identification Nucleus Signal Peptide) prediction software at: <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/INSP/>.

Şekil 3.14. FASTA dizisinin analiz edilmesi.

Program tarafından yapılan analiz sonucunda proteinin tahmin edilen hücre içi lokalizasyonu elde edildi (Şekil 3.15). Bu işlemler Nano LC-MS/MS analiz programı tarafından tanımlanan tüm proteinler için gerçekleştirildi. Tüm proteinlere ait hücre içi lokalizasyonu bilgisi elde edildikten sonra membran proteinlerinin tanımlanan toplam proteinlere olan oranı hesaplandı.

**Gneg-mPLOC: Predicting subcellular localization of Gram-negative bacterial proteins**

[Read Me](#) | [Data](#) | [Citation](#) | [Download](#) |

Your input sequence (257aa) is:

```
>WP_002966117.1 MULTISPECIES: GntR family transcriptional regulator [Brucella]
MSGNFGAFLPKNLQGSAPSSGAGPLYVQLRQSLEAAIRAGQLADGEALPPERDIAEYANI
SRVTVRKAVDDLKAGLLVRRHSGTFVVRPGERVQQSLSMILTSFTEDMARRGIAATQSRW
LERGLYYPSPEEMMKLGLSSETRVARLGRRLRMVGDMLAIERASLSSEFLPDDAVQGS
YAEELGRTGFRPVRAVQRIAAACNIRKSDARILGVQEGDAGLSIERLSYLAAGRVEFTKSL
YRGDAYDFVAELTIQSS
```

----- Gneg-mPLOC Computation Result -----

Query protein	Predicted location(s)
WP_002966117.1 MULTISPECIES: GntR family transcriptional regulator [Brucella]	Cytoplasm.

[Home Page](#)

Contact @ [Hong-Bin](#)

**Şekil 3.15.** Gneg-mPLOC ile proteinin hücredeki yerleşim yerinin saptanması.

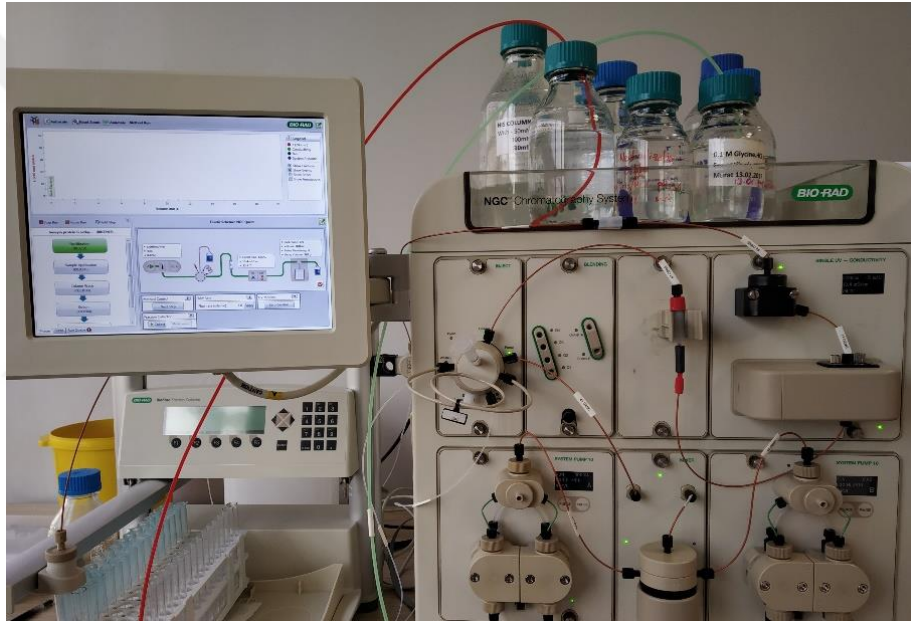
Bu basamağa kadar yapılan analizler ile Ojanen (Ojanen ve ark., 1993)'in membran protein izolasyonu prosedürü kullanılarak brusella'dan membran proteini izole edilebildiği gösterildi. Bu aşamadan sonra bölüm 3.2.2 ve 3.2.3'teki protokoller uygulanarak tüm brusella izolatlarından membran proteinleri izole edildi. İzole edilen proteinler son santrifüj aşamasından sonra immünpresipitasyon (IP) lizis/yıkama tamponunda çözüldü ve kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi.

### 3.3. Brusella Pozitif ve Brusella Negatif İnsan Serumlarının Hazırlanması

Brusella izolatlarından elde edilen membran proteinlerinden hangilerinin insanda antikor yanıtı oluşturduğunu belirlemek için bruselloz geçirmiş insan serumları kullanıldı. Negatif kontrol olarak sağlıklı bireylere ait brusella negatif serumlar çalışmaya dahil edildi. Hem brusella pozitif serumlardaki brusella antikorlarının aktivitelerinin kontrol edilmesi için hem de negatif kontrol olarak kullanılacak serumları belirlemek için tüm serum örnekleri Rose Bengal Aglütinasyon Testi (Seromed, Türkiye) ile kontrol edildi. Bu test için kullanılacak serumlar ve antijen oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletildi. Antijen köpürtülmeden iyice karıştırıldıktan sonra test kartı üzerine 25 µl eklendi. Antijen üzerine eşit miktarda serum ilave edildi. Antijen ve serum bir kürdan yardımıyla karıştırıldı. Test kartı dairesel şekilde hareket ettirilerek reaksiyon gözlemlendi. Kümeleşme şeklinde aglütinasyon görülmesi Rose Bengal pozitif olarak değerlendirildi. RBT pozitif olan 25 hasta serumu ile negatif olan 25 hasta serumu çalışmaya dahil edildi. Pozitif serumlardan 50'şer

$\mu$ l alınıp tek bir tüp içerisinde birleştirilerek brusella pozitif serum havuzu, negatif serumlardan da yine 50'şer  $\mu$ l alınıp tek bir tüp içerisinde birleştirilerek brusella negatif serum havuzu oluşturuldu. Oluşturulan bu iki serum havuzuna tekrar RBT uygulanarak pozitif ve negatif reaksiyon kontrol edildi.

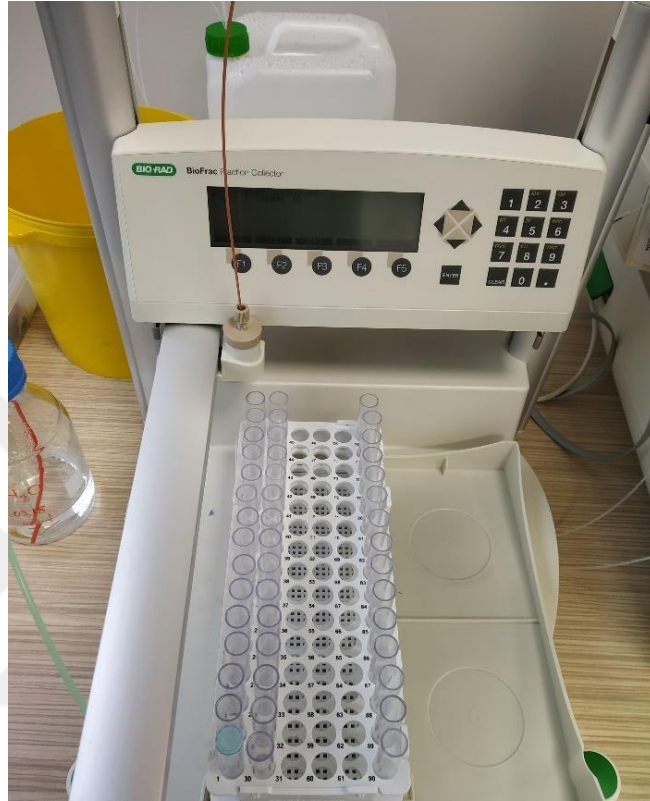
Serum havuzlarındaki antikor dışındaki ürünlerin (albümin vs.) uzaklaştırılarak antikorların saflaştırılması için afinite kromatografisi yöntemi uygulandı. Bunun için sıvı kromatografi sistemi olan NGC cihazı (BioRad, Amerika Birleşik Devletleri) ve antikor saflaştırma işlemlerinde tercih edilen Protein G kolonu (HiTrap, GE, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı (Şekil 3.16). Brusella pozitif ve brusella negatif serumlardaki antikorlar saflaştırılırken aşağıdaki prosedür uygulandı.



**Şekil 3.16.** NGC cihazı ile antikor saflaştırma işlemi.

Serum havuzundan 200  $\mu$ l örnek alınarak 800  $\mu$ l bağlama solüsyonu ile karıştırıldı. Oluşan solüsyon özel bir enjektör ile NGC sistemine yüklendi. Kolondan 10 ml bağlama tamponu geçirilerek kolonun şartlanması sağlandı. Şartlandırma sürecinin ardından enjeksiyon halkası (loop) içerisindeki örnek sabit bağlanma solüsyonu akışı ile kolona aktarıldı. Örnek kolondan geçerken içerisinde bulunan immünglobulinler kolona olan afinitelerinden dolayı kolona bağlandı. Bağlanmayan proteinlerin uzaklaştırılması ve kolonun yıkanması için 10 ml bağlanma solüsyonu sistemden geçirildi. Yıkama işleminin ardından sistemden 5 ml %100 elüsyon solüsyonu geçirilerek kolona bağlanmış immünglobulinlerin kolondan ayrılması sağlandı. Kolondan ayrılan immünglobulin proteinleri 0,5 ml'lik fraksiyonlar halinde toplandı (Şekil 3.17). Elüsyon solüsyonunun

düşük pH'nın protein örneklerine zarar vermesini engellemek için elde edilen fraksiyonlara hızlı bir şekilde 30 µl nötralizasyon solüsyonun eklendi. Bu işlem brusella pozitif ve brusella negatif hasta serumları için ayrı ayrı uygulandı. Toplanan fraksiyonlardaki protein konsantrasyonları Nanodrop cihazı kullanılarak belirlendi.



**Şekil 3.17.** Fraksiyon toplayıcı ile konsantre edilen ve saflaştırılan antikorların toplanması.

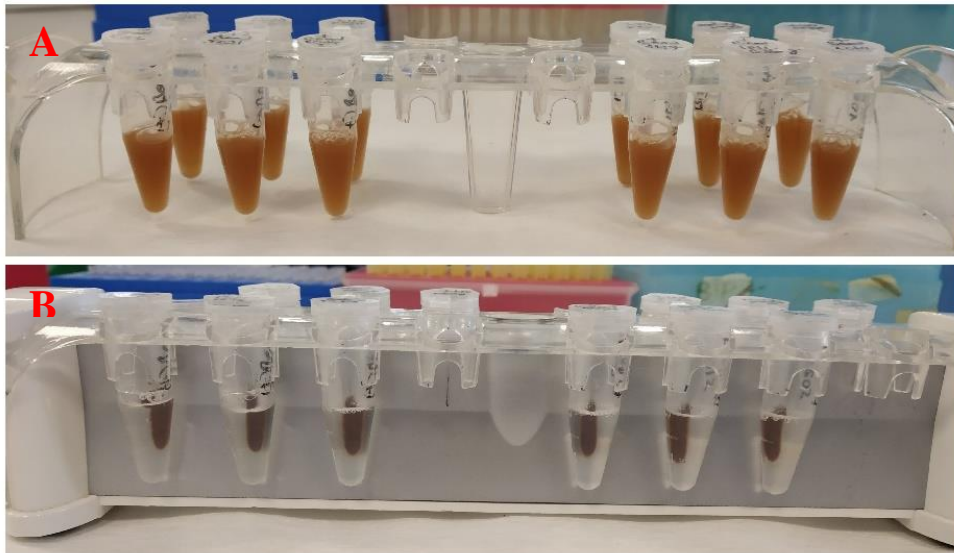
Saflaştırmayı kontrol etmek amacıyla cihaza verilmeden hemen önce sulandırılan serum örnekleri, kolona bağlanmadan akıp giden serum örnekleri (protein özütü) ve kolona bağlanan ürünlerin fraksiyonları SDS-PAGE ile analiz edildi.

#### **3.4. Çalışmada Elde Edilen Brusella'ya ait Proteinler ile Antikor Havuzu Kullanılarak Manyetik Boncuklu İmmünyakalama (MBİ) İşleminin Gerçekleştirilmesi**

Brusella izolatlarından izole edilen membran proteinleri ile Protein G kolondan geçirilip saflaştırılan insan antikorlarının bağlanıp bağlanmadığını test etmek için MBİ kullanıldı.

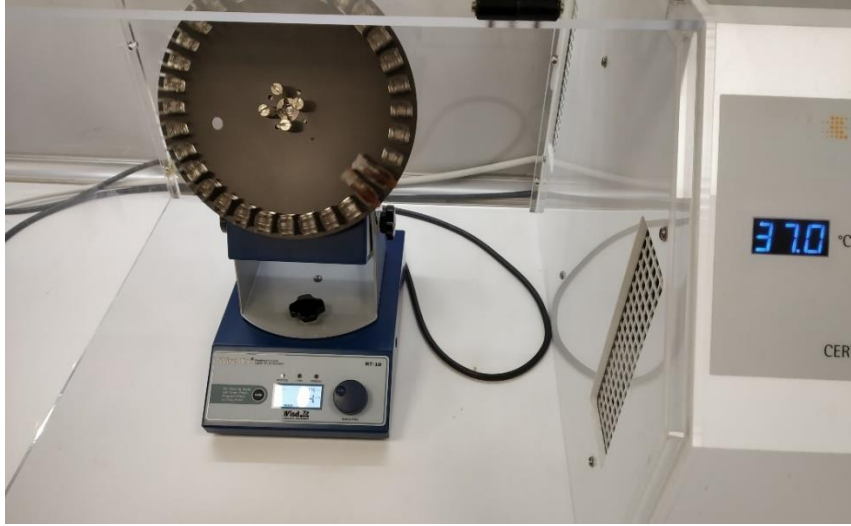
### 3.4.1. Manyetik Boncuklara Antikorların Kaplanması

Manyetik boncuklara antikor kaplanması esnasında Dynebeads Antikor Kaplama Kiti (Invitrogen, Amerika Birleşik Devletleri) protokolü üreticinin önerileri doğrultusunda uygulandı. Yönteme göre; kit içerisindeki manyetik boncuklardan temiz bir mikrosantrifüj tüpü içerisinde 6 mg tartıldı. Boncuklar üzerine 1 ml C1 solüsyonu eklendi ve pipetaj yapıldı. Mikrosantrifüj tüp manyetik spora koyuldu, 1 dakika bekletildi ve süpernatant uzaklaştırıldı (Şekil 3.18). Ayrı bir mikrosantrifüj tüpü içerisine brusella pozitif antikor solüsyonundan 30 µg olacak şekilde ilave edildi. Antikor solüsyonu üzerine toplam hacim 300 µl olacak şekilde C1 solüsyonu eklendi. Bu solüsyon üzerine de 300 µl C2 solüsyonu ilave edildi. Daha sonra bu solüsyon manyetik boncuklar üzerine ilave edildi ve pipetaj yapıldı. Boncukları içeren mikrosantrifüj tüpü roller karıştırıcı (WiseMix, Güney Kore) içerisinde koyularak gece boyu 37°C’de inkübasyona (Sartorius, Almanya) bırakıldı (Şekil 3.19).



**Şekil 3.18.** Manyetik Dynabead boncuklarının görüntüsü. A: Boncukların homojen süspansiyon şekli B: Boncukların manyetik spordaki görüntüsü.





**Şekil 3.19.** Örneklerin roller karıştırıcıda 37°C’de inkübasyonu.

Ertesi gün mikrosantrifüj tüpü manyetik spora koyuldu, 1 dakika bekletildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Mikrosantrifüj tüpü içerisine 800 µl HB solüsyonu (%0,1 Tween 20 eklendi) ilave edildi ve pipetaj yapıldı. Tüp manyetik spora koyuldu, 1 dakika bekletildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Mikrosantrifüj tüpü içerisine 800 µl LB solüsyonu (%0,1 Tween 20 eklendi) ilave edildi ve pipetaj yapıldı. Tüp manyetik spora koyuldu, 1 dakika bekletildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Mikrosantrifüj tüpü içerisine 800 µl SB solüsyonu ilave edildi ve pipetaj yapıldı. Tüp manyetik sporda 1 dakika bekletildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem iki kere tekrar edildi. Mikrosantrifüj tüpü içerisine yeniden 800 µl SB solüsyonu ilave edildi ve pipetaj yapıldı. Mikrosantrifüj tüpü roller karıştırıcı içerisine koyularak 15 dakika boyunca oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Tüp manyetik spora koyuldu, 1 dakika bekletildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Manyetik boncuk konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde tüp içerisine 600 µl SB solüsyonu ilave edildi. Sonrasında immünyakalama protokolü uygulandı.

### **3.4.2. Manyetik Boncuklara Antikor Kaplandığının Gösterilmesi**

Antikor ile kaplanmış manyetik boncuklardan 100 µl alınıp bir tüp içerisine bırakıldı. Boncuklar üzerine 10 µl 2X yükleme boyası eklenerek süspansiyon edildi ve 95°C’deki su banyosunda 4 dakika kaynatıldı. Bu sayede manyetik boncuklara kaplanan antikorların sıvı faza geçmesi sağlandı. Daha sonra tüp manyetik sporda 1 dakika bekletildi ve süpernatant temiz bir tüpe alındı. Bir adet SDS-PAGE jeli hazırlandı. Protein marker ve elde edilen süpernatant jele yüklendi. Jel 180V akım verilerek 60 dakika boyunca yürütüldü. Yürüme

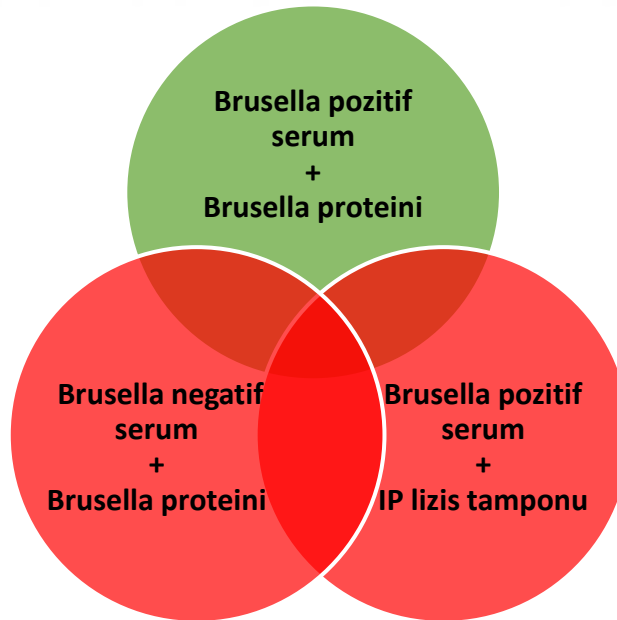
işleminde sonra jel fikse edilip commassie blue ile boyandı. Fazla boyadan arındırılan jel son olarak görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

### 3.4.3. Manyetik Boncuklu İmmünyakalama İşlemi

Manyetik boncuklara kaplanmış brusella antikorları ile brusella membran proteinlerine aşağıda detayları verilen MBI prosedürü uygulandı.

Brusella pozitif ve negatif antikor kaplanmış manyetik boncuklar, brusella proteinleri ve IP lizis tamponu kullanılarak 3 farklı MBI deneyi yapıldı (Şekil 3.20).

1. Bruselloz pozitif serum kaplanmış manyetik boncuk ve brusella proteinleri: Bu deneyin amacı, insanda brusella antikorlarının hangi brusella proteinlerine karşı oluştuğunun belirlenmesidir.
2. Bruselloz negatif serum kaplanmış manyetik boncuk ve brusella proteinleri: Bu deneyin amacı, insan serumunda bulunan ve brusella proteinleri ile yalancı pozitif reaksiyon veren antikorların olup olmadığının belirlenmesidir.
3. Bruselloz pozitif serum kaplanmış manyetik boncuk ve IP lizis tamponu: Bu deneyin amacı ise brusella proteinlerinin süspansedildiği IP lizis tamponundan kaynaklanan yalancı pozitif reaksiyonun belirlenmesidir.



**Şekil 3.20.** Çalışma kapsamında yapılan MBI deneyleri. Yeşil alanda bulunan proteinler ortak immünodominant proteinleri temsil etmektedir. Diğer alanlarda bulunan proteinler dikkate alınmamıştır.

Brusella antikorları kaplanmış manyetik boncuklardan 100 µl alınarak temiz bir tüpe koyuldu, manyetik sporda 1 dakika bekletildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bölüm 3.3'te

elde edilen proteinlerden 2 mg olacak şekilde temiz bir tüpe koyuldu ve IP lizis tamponu ile 600 µl tamamlandı. Bu solüsyon manyetik boncuklar üzerine bırakıldı ve iyice pipetaj yapıldı. Boncukları içeren mikrosantrifüj tüpü roller karıştırıcı içerisine koyularak gece boyu +4°C’de (Uğur, Türkiye) inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.21). Ertesi gün mikrosantrifüj tüpü manyetik spora koyuldu, 1 dakika bekletildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Tüp içerisine 500 µl IP lizis tamponu ilave edildi ve süspansedildi. Bu aşama 2 kere tekrar edildi. Manyetik boncuklar 500 µl MilliQ su ile süspansedildi ve manyetik spora koyuldu. Süpernatant uzaklaştırıldı, tüp içerisine 100 µl elüsyon tamponu eklendi ve nazikçe 30 saniye vorteks yapıldı. Tüp içerisine 15 µl nötralizasyon tamponu eklendikten sonra manyetik sporda 1 dakika bekletildi. Süpernatant dikkatlice alındı ve bölüm 3.2.3’teki protein çöktürme/temizleme prosedürü uygulandı. Prosedür sonunda tüp dibinde oluşan pellet 25 µl AmBic (50 mM) ile süspansedildi ve Nano LC-MS/MS analizi için tripsin ile kesim işlemi yapıldı.



**Şekil 3.21.** Örneklerin roller karıştırıcıda +4°C’de inkübasyonu.

### **3.5. Nano LC-MS/MS Analizi ile İmmünodominant Proteinlerin Tanımlanması**

#### **3.5.1. Sıvı İçindeki Proteinlerin Tripsin ile Kesimi**

In-Solution Tryptic Digestion and Guanidination Kit (Thermo, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak üreticinin önerileri doğrultusunda aşağıdaki protokol uygulandı.

İmmünyakalama işlemi sonunda elde edilen sıvı üzerine 1,5 µl reducing tamponu ilave edildi. Mikrosantrifüj tüpü 95°C’de 5 dakika inkübe edildi, sonrasında 15-20 dakika oda ısısında bekletilerek soğuması sağlandı. Tüp içerisine 3 µl alkylolation tamponu eklendi. Karanlıkta ve oda ısısında 20 dakika bekletildi. Örnek üzerine 1 µl aktif tripsin ilave edildi ve 37°C’de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda örnek üzerine 1 µl daha aktif tripsin eklendikten sonra gece boyu 30°C’de inkübe edildi. Ertesi gün mikrosantrifüj tüpü Speed-Vac cihazı ile yaklaşık 45 dakika 60°C’de 2500 x g hızda çevrilerek kurutuldu. Örnek üzerine 10 µl %0,1 formik asit ilave edildi. Formik asit içeren tüp 5 dakika boyunca çalkalama cihazında çalkalandı ve daha sonra sonik banyo uygulandı. Quick-spin cihazı ile yaklaşık 1 dakika döndürülen tüplerden uygun hacimde örnek alınarak cihaza verildi.

### **3.5.2. Hazırlanan Örneğin Nano LC-MS/MS Cihazında Analiz Edilmesi**

Bölüm 3.2.6.1’deki protokol aynen uygulanarak örnekler Nano LC-MS/MS cihazında analiz edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Brusella İzolatlarının Tanımlanması

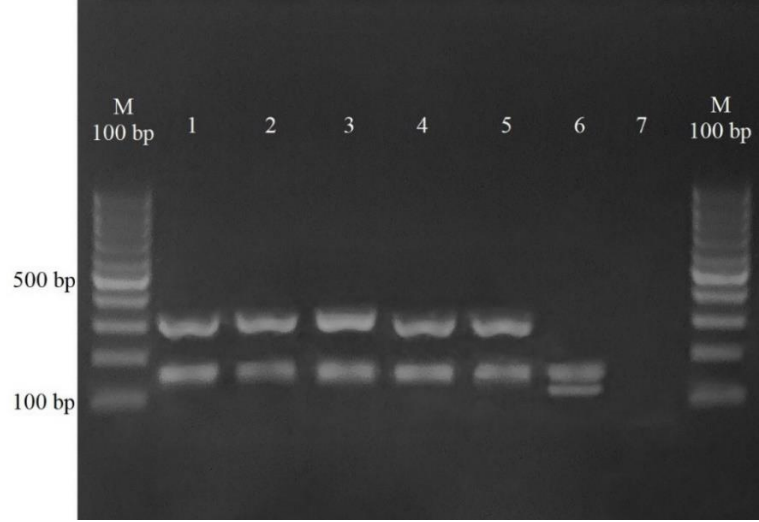
Brusella izolatlarının koyun kanlı agar'daki 48 saatlik inkübasyonu sonucu oluşan koloni görünümü Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Brusella'nın koyun kanlı agar besiyerindeki üreme görüntüsü.

Üreyen kolonilerden yapılan DNA izolasyonu sonrasında klasik PZR işlemi gerçekleştirildi. Primer dizileri BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programında analiz edilerek bant yükseklikleri hesaplandı. Gerçekleştirilen PZR işleminde bant büyüklükleri *Brucella* spp için 151 bp; *Brucella abortus* için 135 bp; *Brucella melitensis* için ise 301 bp idi. PZR sonrasında ürünlerin agaroz jel elektroforezi ile yürütülmesi sonrasında elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.2'de görülmektedir. Çalışmaya dahil edilen 4 brusella izolatın jel görüntüsü de BLAST analizinde hesaplanan bant yükseklikleri ile uyumlu şekilde elde edilmiştir.

İzolatların *Brucella melitensis* olduğu teyit edildikten sonra bakterilerden membran proteini izolasyonu işlemleri gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 4.2.** Klasik PZR sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 1:1062, 2: 1177, 3: 5031, 4:5112, 5: PK- *B.melitensis*, 6: PK- *B.abortus*, 7: Negatif kontrol.

#### 4.2. Membran Proteini İzolasyonu

Membran proteini izolasyonu için Ojanen'in (Ojanen ve ark., 1993) protokolü uygulandı. Membran proteini izolasyonu protokolü esnasında izole protein miktarının belirlenmesi için yapılan Bradford ölçümü sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** İzolasyon sonrasında Bradford yöntemi ile yapılan protein ölçümü sonuçları.

Ölçüm sayısı	Sonuç (µg/ml)
1. ölçüm	712,9
2. ölçüm	735,4
3. ölçüm	626,2
4. ölçüm	906,4
<b>Ortalama</b>	<b>745,2</b>

Protein miktarı hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Ölçüm sonucu} \times \frac{1}{10} \times 20 \times \frac{1}{1000}$$

Formülde:

10 → solüsyondan alınıp ölçüm yapılan protein miktarını (µl) belirtmektedir.

20 → 2D tamponu sığır serum albümin ölçüm standardını belirtmektedir.

1000 → µg/ml'den µg/µl'ye çevirmek için kullanılan standardı belirtmektedir.

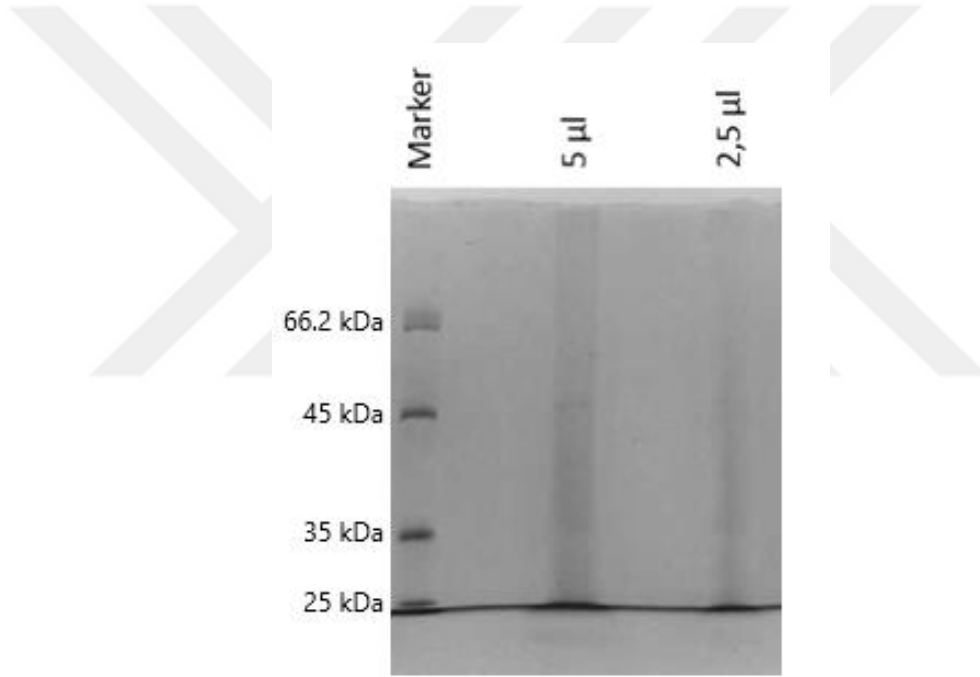
$$745,2 \times \frac{1}{10} \times 20 \times \frac{1}{1000}$$

Ölçüm sonucunda elde edilen 745,2 µg/ml değeri formülde yerine koyularak hesap yapıldı. Sonuçta 1,49 µg/µl değeri elde edildi.

### 4.3. Kera-free SDS-PAGE ile Protein Bantlarının Görüntülenmesi

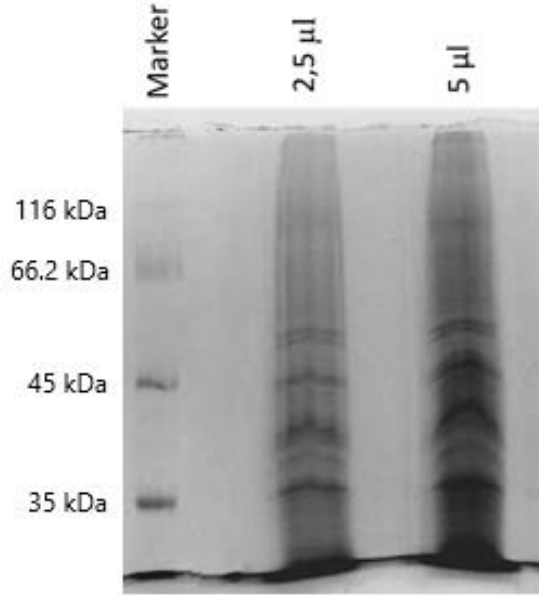
Protein ölçümü işleminden sonra örnek santrifüj edilerek pellet ve süpernatant elde edildi. Hem pellet hem de süpernatanda bulunan proteinleri görüntülemek için SDS-PAGE jeli hazırlandı ve örnekler jele yüklendi. Süpernatant jele yüklenmeden önce temizleme/çöktürme işlemi uygulandı.

Pellet örneğinden 5 µl ve 2,5 µl alınarak 6X yükleme boyası ile karıştırıldı. Protein marker ile birlikte sırayla jele yüklendi. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.3'te belirtilmiştir. Pellet örneğinden sadece 5 µl yüklenen kuyuda tek bir protein bandı elde edilmiştir.



**Şekil 4.3.** Pellet örneğinden hazırlanan SDS-PAGE jelinin görüntüsü.

Süpernatant örneğinden de 2,5 µl ve 5 µl olmak üzere 2 farklı örnek hazırlandı. Örnekler 6X yükleme boyası ile karıştırıldı ve protein marker ile beraber SDS-PAGE jeline yüklendi. Süpernatant örneğine ait jel görüntüsü Şekil 4.4'te sunulmuştur. Bu jelde farklı yüksekliklerde bantlar olduğu görüldü. Elde edilen bu bantlarda membran proteini olup olmadığını araştırıldı. Bu amaçla jeldeki ilgili bantlar bistüri ile kesildi. Proteinler jelden izole edilerek MALDI/TOF-TOF-MS cihazında analiz edildi.



**Şekil 4.4.** Süpernatant örneğinden hazırlanan SDS-PAGE jelinin görüntüsü.

#### **4.4. Membran Protein İzolasyonunun MALDI/TOF-TOF-MS Analizi ile Gösterilmesi**

Süpernatant örneklerinin yüklendiği jeldeki bantlardan en fazla protein içeren 5 bant kesilerek MALDI/TOF-TOF-MS analizi yapıldı. Analiz sonuçlarına göre kesilen 5 banttandır 3 tanesi membran proteini içerirken diğer 2 bant sitoplazmik proteinler içermektedir. Analiz sonucunda tanımlanan proteinlerin tanımlayıcı bilgileri Tablo 4.2’de gösterilmiştir.



**Tablo 4.2.** MALDI/TOF-TOF-MS analizi sonucu tanımlanan proteinlerin özellikleri.

Bağlantı Adı	Kütle	Skor	Expect	Eşleşme	pI değeri	Kapsama oranı (%)	Açıklaması	Yerleşimi
EFG_BRUMB	76247	193	1.6e-014	28	5,05	33	Elongation factor G OS= <i>Brucella melitensis</i> biotype 2 (strain ATCC 23457) GN=fusA PE=3 SV=1	Sitoplazma
BHUA_BRUME	72888	86	0.00083	16	5,71	24	Heme transporter bhuA OS= <i>Brucella melitensis</i> GN=bhuA PE=2 SV=2	Dış membran
ATPB_BRUME	54757	146	8.1e-010	22	5,48	36	ATP synthase subunit beta OS= <i>Brucella melitensis</i> GN=atpD PE=3 SV=1	İç membran
ATPA_BRUMB	54855	102	2,00e-05	15	6,1	30	ATP synthase subunit alpha OS= <i>Brucella melitensis</i> biotype 2 (strain ATCC 23457) GN=atpA PE=3 SV=1	İç membran
EFTU_BRUA2	42578	203	1,60e-15	18	5,29	31	Elongation factor Tu OS= <i>Brucella melitensis</i> GN=tufA PE=3 SV=1	Sitoplazma

#### 4.5. İzole Edilen Membran Proteinlerinin Nano LC-MS/MS Analizi Sonuçları

MALDI/TOF-TOF-MS sonuçlarına göre membran proteini varlığı gösterilen örneklerdeki membran proteini oranını belirlemek için Nano LC-MS/MS analizi yapıldı. Bu amaçla brusella izolatından yeniden protein izole edildi. Süpernatant temizleme/çöktürme işlemi uygulandıktan sonra FASP protokolü ile örnekler Nano LC-MS/MS için hazır hale getirildi.

Nano LC-MS/MS cihazında toplam 641 protein tanımlandı (Bkz. EK:1).

#### 4.6. Membran Protein İzolasyon Oranının Belirlenmesi

Tanımlanan tüm proteinler <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/> bağlantı adresinde bulunan “Gneg-mPloc” yazılımı ile analiz edilerek hücre içerisindeki lokasyonları belirlendi. Analiz sonucuna göre 641 proteinin 381 (%59,4) tanesi membran, 219 tanesi sitoplazma, 31 tanesi periplazma, 7 tanesi hücre dışı ve 3 tanesi fimbria olarak tanımlandı. Tanımlanan bu proteinlerin bazıları Tablo 4.3’te gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.** Nano LC-MS/MS sonucuna göre tanımlanan bazı proteinlerin kodları, isimleri ve tahmin edilen lokasyonları.

Protein kodu	Protein İsmi	Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu
WP_002963714.1	MULTISPECIES: L,D-transpeptidase [ <i>Brucella</i> ]	Membran
WP_002963483.1	MULTISPECIES: large conductance mechanosensitive channel protein MscL [ <i>Brucella</i> ]	Membran
WP_002966660.1	MULTISPECIES: metal ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Membran
WP_002966116.1	MULTISPECIES: N-acetylglucosamine kinase [ <i>Brucella</i> ]	Membran
WP_002964719.1	MULTISPECIES: porin family protein [ <i>Brucella</i> ]	Membran
WP_002964530.1	MULTISPECIES: outer membrane protein assembly factor BamD [ <i>Brucella</i> ]	Membran

Protein kodu	Protein İsmi	Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu
WP_002964802.1	MULTISPECIES: peptidoglycan - binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Membran
WP_002964281.1	MULTISPECIES: UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)glucosamine N-acyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964874.1	MULTISPECIES: MarR family transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965068.1	MULTISPECIES: response regulator transcription factor [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964393.1	MULTISPECIES: class II fructose-bisphosphatase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_005968973.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Fimbrium
WP_002963645.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Fimbrium
WP_002964839.1	MULTISPECIES: glycine zipper 2TM domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Fimbrium
WP_002967351.1	MULTISPECIES: nitrate reductase subunit beta [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002965941.1	MULTISPECIES: Fe(3+) ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002966234.1	MULTISPECIES: catalase [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_004681614.1	MULTISPECIES: nitrate reductase subunit alpha [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002967363.1	MULTISPECIES: sugar ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002964637.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre dışı
WP_002971287.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre dışı

Membran proteini izolasyon oranı %59,4 olarak hesaplandı. Bu sonuca göre, uygulanan protokol kabul edilebilir bulundu ve tüm brusella izolatlarından membran proteini izolasyonu gerçekleştirildi.

#### 4.7. Brusella İzolatlarından İzole Edilen Protein Miktarları

Tüm brusella izolatlarından bölüm 3.2.2’de anlatılan protokol ile farklı günlerde 2’şer kez protein izolasyonu gerçekleştirildi. İzolatlara ait Bradford protein ölçümü sonuçları Tablo 4.4’de sunulmuştur.

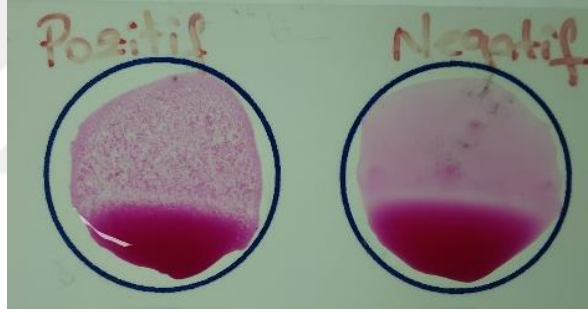
**Tablo 4.4.** Brusella izolatlarına ait protein ölçüm sonuçları ve elde edilen toplam protein miktarı.

İzolat Adı	İzolasyon / Ölçüm için alınan hacim	Ölçüm Sonuçları	Ortalama Ölçüm sonucu	Toplam protein miktarı (mg)
<i>B. melitensis</i> 1062	1. İzolasyon / 5 µl	307,4	288,52	3,17
		258,7		
		318,4		
		336,6		
		221,5		
	2. izolasyon / 5 µl	530,9	433,86	
		310,4		
		374,4		
		493,9		
		459,7		
<i>B. melitensis</i> 1177	1. izolasyon / 5 µl	316,7	276,12	3,11
		289,2		
		268		
		216,1		
		290,6		
	2. izolasyon / 5 µl	520,8	504,74	
		508,2		
		565,1		
		387		
		542,6		
<i>B. melitensis</i> 5031	1. izolasyon / 5 µl	160	198,58	3,38
		221,8		
		209,4		
		231		
		170,7		
	2. izolasyon / 5 µl	680,4	648,06	
		615,5		
		648,3		
<i>B. melitensis</i>	1. izolasyon / 5 µl	120,3		
		182,3		

İzolat Adı	İzolasyon / Ölçüm için alınan hacim	Ölçüm Sonuçları	Ortalama Ölçüm sonucu	Toplam protein miktarı (mg)
		241,1	182,36	3,61
		125,6		
		242,5		
	2. izolasyon / 5 µl	637,8	722,95	
		657,3		
		816,3		
		780,4		

#### 4.8. Bruselloz Pozitif ve Bruselloz Negatif İnsan Serumlarının Hazırlanması

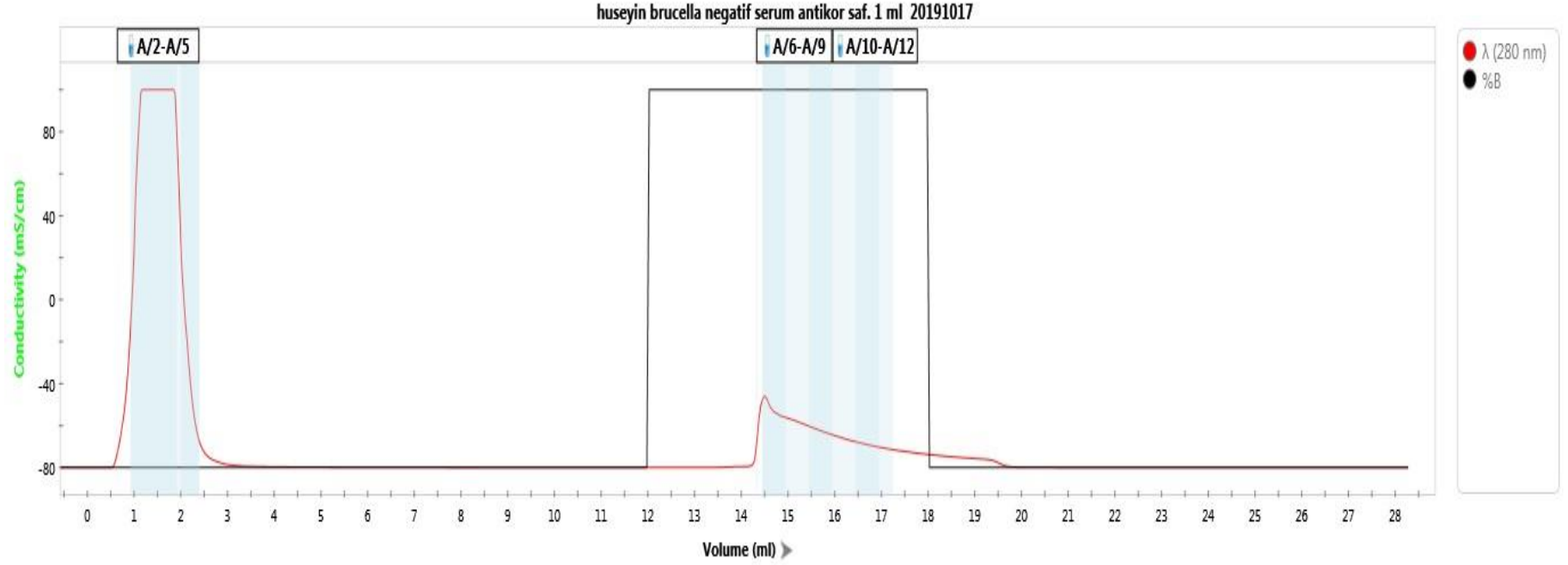
Çalışmaya dahil edilen 25 pozitif ve 25 negatif serumdan oluşturulan pozitif serum havuzu ve negatif serum havuzu ile RBT çalışıldı. Test sonucunda pozitif serum havuzu örneğinde yoğun şekilde aglütinasyon görülürken negatif serum havuzu örneğinde hiçbir reaksiyon görülmedi (Şekil 4.5).



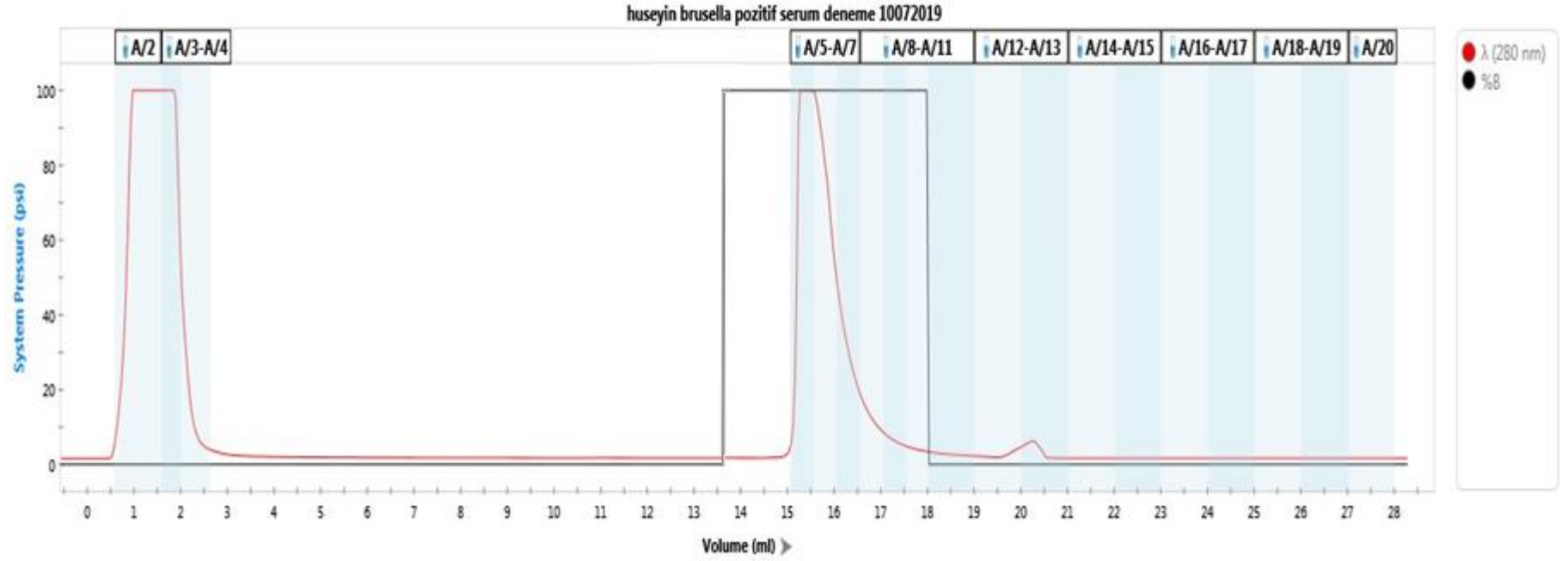
**Şekil 4.5.** Serum havuzları ile yapılan RBT sonucu. Soldaki pozitif, sağdaki ise negatif reaksiyonu göstermektedir.

Serum havuzu örnekleri NGC protein saflaştırma sistemi yardımı ile Protein G kolondan geçirildi. Bu sayede serumda bulunan immünglobülinler saflaştırıldı ve konsantre edildi. Önce negatif serum havuzu örneği cihaza verildi. Cihaza ait fraksiyon toplayıcı ile örneğe ait elüsyonlar mikrosantrifüj tüplerine toplandı. Protein G kolondan geçen serum örneğine ait kromatogram Şekil 4.6 sunulmuştur. Kolonda tutunan ve elüsyon işlemi ile kolondan ayrılıp tüplere toplanan A6-A12 arasındaki fraksiyonlarda çok az miktarda antikor olduğu görülmektedir.

Daha sonra pozitif serum örneğine ait örnek cihaza verildi. Protein G kolondan geçen serum örneği kromatogramı Şekil 4.7'de belirtilmiştir. A5-A7 arasındaki fraksiyonlarda bulunan kırmızı pik değeri kolona tutunmuş yüksek miktarda antikor olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.6. Negatif serum havuzu örneğine ait NGC cihazı kromatogramı. A6/A12 arasındaki bölmeler toplanan fraksiyonları göstermektedir.



Şekil 4.7. Pozitif serum havuzu örneğine ait NGC cihazı kromatogramı. A5/A20 arası bölmeler toplanan fraksiyonları göstermektedir.

Cihazdan toplanan ve pozitif ve negatif serum örneklerindeki antikorları içeren fraksiyon tüplerindeki protein miktarları 280 nm’de Nanodrop cihazı ile ölçüldü. Sonuçlar Tablo 4.5 ve 4.6’da bulunmaktadır. Pozitif serum havuzu ile negatif serum havuzu arasında protein içerme oranlarına göre farklılık olduğu görülmektedir.

**Tablo 4.5.** Negatif serum havuzu fraksiyonlarının Nanodrop ölçüm sonuçları.

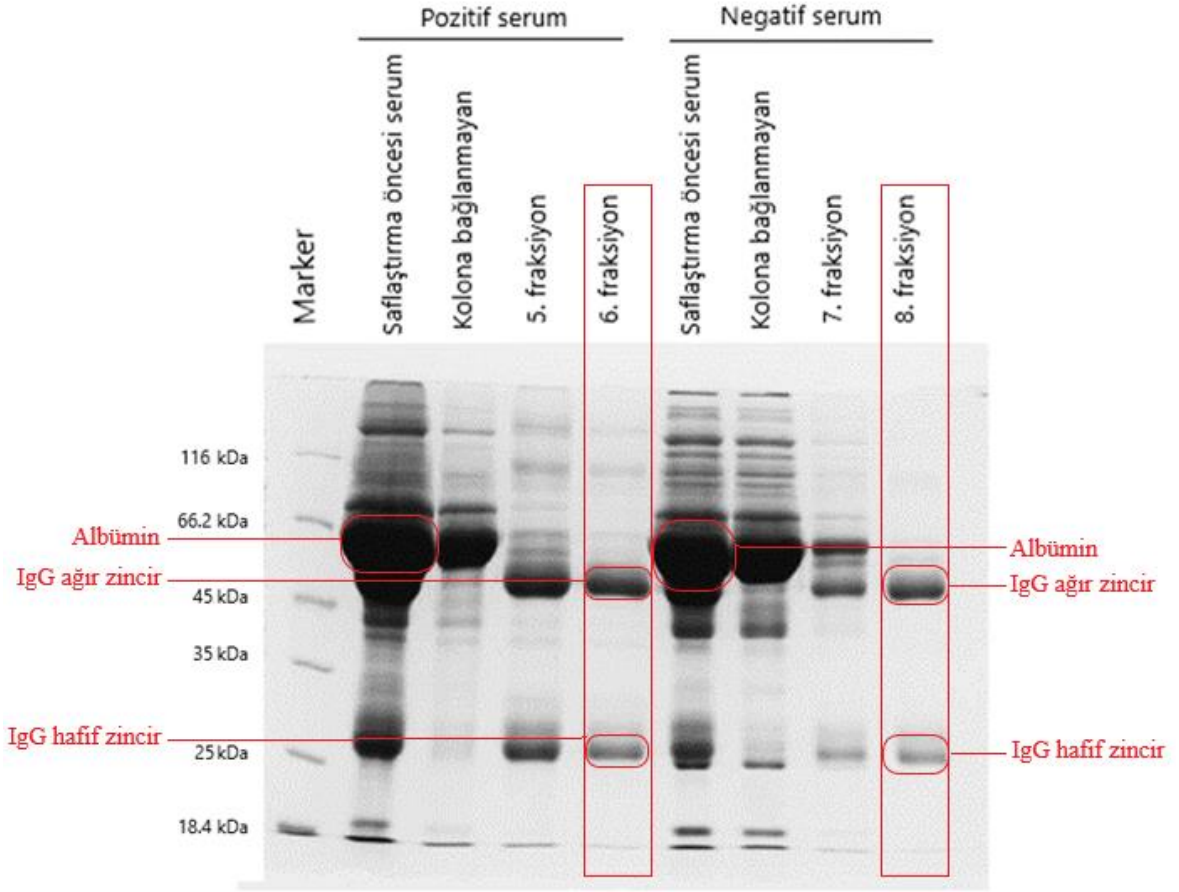
Fraksiyon numarası	Ölçüm sonucu (mg/ml)	Ölçüm sonucu ortalaması
7. fraksiyon	0,49	<b>0,51</b>
7. fraksiyon	0,53	
7. fraksiyon	0,53	
8. fraksiyon	0,39	<b>0,37</b>
8. fraksiyon	0,38	
8. fraksiyon	0,34	
9. fraksiyon	0,24	<b>0,27</b>
9. fraksiyon	0,29	
9. fraksiyon	0,3	

**Tablo 4.6.** Pozitif serum havuzu fraksiyonlarının Nanodrop ölçüm sonuçları.

Fraksiyon numarası	Ölçüm sonucu (mg/ml)	Ölçüm sonucu ortalaması
5. fraksiyon	1,73	<b>1,75</b>
5. fraksiyon	1,78	
5. fraksiyon	1,75	
6. fraksiyon	0,87	<b>0,86</b>
6. fraksiyon	0,86	
6. fraksiyon	0,85	
7. fraksiyon	0,63	<b>0,65</b>
7. fraksiyon	0,65	
7. fraksiyon	0,66	

Cihaza verilen pozitif ve negatif serum örneklerini, kolona bağlanmadan geçen serum proteinleri ve kolona bağlanan örnekleri içeren fraksiyonların SDS-PAGE jelindeki görüntüleri Şekil 4.7.’de sunulmuştur. Cihaza verilen serum örneğindeki protein profili ile kolonda tutunan ve elüsyon işlemi ile kolondan ayrılıp tüplere toplanan örneklerin protein profili karşılaştırıldığında saflaştırma işleminin gerçekleştiği görülmektedir. Pozitif serum deneylerinde 6. fraksiyon, negatif serum deneylerinde ise 8. fraksiyon kullanıldı.

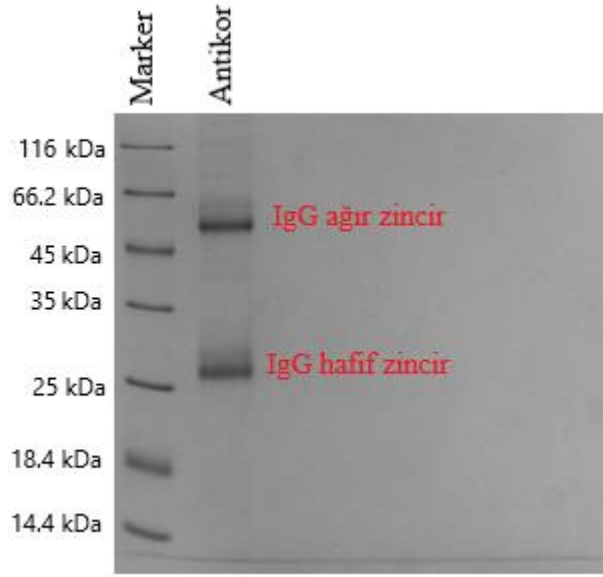




**Şekil 4.8.** Brusella pozitif ve negatif serumun saflaştırma öncesi ve sonrası fraksiyonların SDS-PAGE jel görüntüsü.

#### 4.9. Manyetik Boncuklara Antikorların Kaplanması

Antikorların manyetik boncuklara bağlanıp bağlanmadığını kontrol etmek için yapılan deney sonucunda elde edilen SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 4.9’de sunulmuştur. Jelde protein marker yanında bulunan üstteki bant immünglobülinlere ait ağır zinciri, alttaki bant ise hafif zinciri göstermektedir.



**Şekil 4.9.** Manyetik boncuklara kaplanan antikorların SDS-PAGE jel görüntüsü.

#### 4.10. MBİ İşlemlerinin Nano LC-MS/MS Analizi Sonuçları

İmmünodominant proteinlerin belirlenmesi amacıyla yapılan 3 farklı MBİ deneyinin sonuçları aşağıda sunulmuştur.

##### 4.10.1. Bruselloz Pozitif Serum Kaplanmış Manyetik Boncuk ve Brusella Proteinleri ile Yapılan MBİ Sonuçları

Bruselloz pozitif insan serumundan saflaştırılan antikorlar ile kaplanmış manyetik boncuklar ve 4 farklı *B. melitensis* izolatu kullanılarak yapılan MBİ deneyleri sonuçları aşağıda belirtilmiştir.

###### 4.10.1.1. *B. melitensis* 1062 İzolatının Sonuçları

*B. melitensis* 1062 izolatu ile yapılan MBİ sonucunda 66 adet protein tanımlandı. Tanımlanan bu proteinler Tablo 4.7’de belirtilmiştir.

**Tablo 4.7.** Pozitif serum ve *B. melitensis* 1062 ile yapılan MBİ sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri.

Protein kodu	Protein İsmi
WP_002966069.1	MULTISPECIES: bacterioferritin [ <i>Brucella</i> ]
WP_004681934.1	sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_100217440.1	MULTISPECIES: sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>
	substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella</i> ]
WP_002968422.1	MULTISPECIES: bacterioferritin [ <i>Brucella</i> ]
WP_086440147.1	MULTISPECIES: sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella</i> ]
WP_094866405.1	MULTISPECIES: sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella</i> ]
WP_004686048.1	MULTISPECIES: sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella</i> ]
WP_004684932.1	sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_101433165.1	sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004686876.1	MULTISPECIES: bacterioferritin [ <i>Brucella</i> ]
WP_004681883.1	MULTISPECIES: bacterioferritin [ <i>Brucella</i> ]
WP_087907903.1	sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_002966636.1	MULTISPECIES: flagellin [ <i>Brucella</i> ]
WP_002967142.1	MULTISPECIES: branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_002965167.1	MULTISPECIES: double-strand break repair protein AddB [ <i>Brucella</i> ]
WP_002971932.1	MULTISPECIES: extracellular solute-binding protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_002963917.1	MULTISPECIES: undecaprenyl-phosphate glucose phosphotransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_002969201.1	MULTISPECIES: VOC family protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_002966349.1	MULTISPECIES: sensor domain-containing diguanylate cyclase [ <i>Brucella</i> ]
WP_002964920.1	MULTISPECIES: nicotinate-nucleotide adenylyltransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_006140578.1	MULTISPECIES: double-strand break repair protein AddB [ <i>Brucella</i> ]
WP_004689334.1	MULTISPECIES: double-strand break repair protein AddB [ <i>Brucella</i> ]
WP_075630341.1	MULTISPECIES: extracellular solute-binding protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_102207968.1	VOC family protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006135593.1	MULTISPECIES: extracellular solute-binding protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_126982354.1	nicotinate-nucleotide adenylyltransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>
WP_065870134.1	double-strand break repair protein AddB [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004687483.1	MULTISPECIES: sensor domain-containing diguanylate cyclase [ <i>Brucella</i> ]
WP_004690511.1	MULTISPECIES: nicotinate-nucleotide adenylyltransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_004684551.1	MULTISPECIES: double-strand break repair protein AddB [ <i>Brucella</i> ]
WP_006268145.1	hypothetical protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_101433313.1	flagellin [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_005974852.1	extracellular solute-binding protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_087907765.1	undecaprenyl-phosphate glucose phosphotransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006138194.1	extracellular solute-binding protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004685172.1	branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004683587.1	MULTISPECIES: undecaprenyl-phosphate glucose phosphotransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_087907895.1	branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006266051.1	extracellular solute-binding protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_005972253.1	MULTISPECIES: extracellular solute-binding protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_087924401.1	double-strand break repair protein AddB [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006254548.1	double-strand break repair protein AddB [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004685561.1	undecaprenyl-phosphate glucose phosphotransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_101419142.1	flagellin [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004686210.1	MULTISPECIES: double-strand break repair protein AddB [ <i>Brucella</i> ]
WP_006153246.1	sensor domain-containing diguanylate cyclase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_005974814.1	hypothetical protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006150625.1	hypothetical protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004681501.1	MULTISPECIES: sensor domain-containing diguanylate cyclase [ <i>Brucella</i> ]
WP_087932920.1	double-strand break repair protein AddB [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_101433269.1	double-strand break repair protein AddB [ <i>Brucella melitensis</i> ]

Protein kodu	Protein İsmi
WP_005974306.1	VOC family protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004684435.1	MULTISPECIES: VOC family protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_006136795.1	double-strand break repair protein AddB [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004685901.1	MULTISPECIES: branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_004681009.1	MULTISPECIES: flagellin [ <i>Brucella</i> ]
WP_006146722.1	hypothetical protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_002967200.1	MULTISPECIES: sensor domain-containing diguanylate cyclase [ <i>Brucella</i> ]
WP_006151957.1	MULTISPECIES: sensor domain-containing diguanylate cyclase [ <i>Brucella</i> ]
WP_087932822.1	sensor domain-containing diguanylate cyclase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004681063.1	MULTISPECIES: branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_006146824.1	extracellular solute-binding protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006190078.1	MULTISPECIES: undecaprenyl-phosphate glucose phosphotransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_006140795.1	hypothetical protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004686489.1	MULTISPECIES: undecaprenyl-phosphate glucose phosphotransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_006146749.1	flagellin [ <i>Brucella melitensis</i> ]

#### 4.10.1.2.*B.melitensis* 1177 İzolatının Sonuçları

*B. melitensis* 1177 izolatu ile yapılan MBİ sonucunda 73 adet protein tanımlandı.

Tanımlanan bu proteinler Tablo 4.8’da belirtilmiştir.

**Tablo 4.8.** Pozitif serum ve *B.melitensis* 1177 ile yapılan MBİ sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri.

Protein kodu	Protein İsmi
WP_002965865.1	MULTISPECIES: glucose-6-phosphate dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]
WP_002964862.1	MULTISPECIES: pyruvate carboxylase [ <i>Brucella</i> ]
WP_002964935.1	MULTISPECIES: IS6-like element IS2020 family transposase [ <i>Brucella</i> ]
WP_002966073.1	MULTISPECIES: iron-responsive transcriptional regulator RirA [ <i>Brucella</i> ]
WP_002966069.1	MULTISPECIES: bacterioferritin [ <i>Brucella</i> ]

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>
WP_004681934.1	sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_005970312.1	MULTISPECIES: acetyl/propionyl/methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha [ <i>Brucella</i> ]
WP_002963981.1	MULTISPECIES: lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_004686287.1	MULTISPECIES: pyruvate carboxylase [ <i>Brucella</i> ]
WP_004685580.1	MULTISPECIES: lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_004683664.1	MULTISPECIES: lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_002965265.1	MULTISPECIES: acetyl/propionyl/methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha [ <i>Brucella</i> ]
WP_086440147.1	MULTISPECIES: sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella</i> ]
WP_002968422.1	MULTISPECIES: bacterioferritin [ <i>Brucella</i> ]
WP_094285334.1	acetyl/propionyl/methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006642007.1	MULTISPECIES: IS6 family transposase [ <i>Brucella</i> ]
WP_101457603.1	IS6-like element IS2020 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004681883.1	MULTISPECIES: bacterioferritin [ <i>Brucella</i> ]
WP_087907903.1	sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006146607.1	acetyl/propionyl/methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004690199.1	MULTISPECIES: iron-responsive transcriptional regulator RirA [ <i>Brucella</i> ]
WP_004688709.1	MULTISPECIES: pyruvate carboxylase [ <i>Brucella</i> ]
WP_101419801.1	pyruvate carboxylase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_032449882.1	IS6-like element IS2020 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004685844.1	pyruvate carboxylase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_118874232.1	acetyl/propionyl/methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_101433165.1	sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006149565.1	glucose-6-phosphate dehydrogenase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004685868.1	IS6-like element IS2020 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_023081119.1	lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>
WP_004682109.1	MULTISPECIES: glucose-6-phosphate dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]
WP_032451232.1	IS6-like element IS2020 family transposase, partial [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004684235.1	MULTISPECIES: pyruvate carboxylase [ <i>Brucella</i> ]
WP_100217440.1	MULTISPECIES: sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella</i> ]
WP_087909581.1	IS6 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004686876.1	MULTISPECIES: bacterioferritin [ <i>Brucella</i> ]
WP_087932918.1	pyruvate carboxylase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_050560556.1	IS6-like element IS2020 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004684932.1	sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004681881.1	MULTISPECIES: iron-responsive transcriptional regulator RirA [ <i>Brucella</i> ]
WP_023081101.1	glucose-6-phosphate dehydrogenase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004686048.1	MULTISPECIES: sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella</i> ]
WP_006144745.1	acetyl/propionyl/methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004690769.1	MULTISPECIES: lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_118890817.1	pyruvate carboxylase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_087910627.1	lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004690290.1	MULTISPECIES: glucose-6-phosphate dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]
WP_006136871.1	pyruvate carboxylase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006071872.1	MULTISPECIES: acetyl/propionyl/methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha [ <i>Brucella</i> ]
WP_087909574.1	pyruvate carboxylase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_094866405.1	MULTISPECIES: sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella</i> ]
WP_124737041.1	pyruvate carboxylase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_081310914.1	carbamoyl-phosphate synthase subunit L [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006136746.1	acetyl/propionyl/methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006152378.1	glucose 1-dehydrogenase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_002965722.1	MULTISPECIES: cupin domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]

Protein kodu	Protein İsmi
WP_002967392.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_002964719.1	MULTISPECIES: porin family protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_004684750.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_019444549.1	ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006192318.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_041596356.1	porin family protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004689729.1	MULTISPECIES: glucose 1-dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]
WP_094977890.1	porin family protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_087907716.1	glucose 1-dehydrogenase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004684110.1	MULTISPECIES: porin family protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_110506821.1	porin family protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_002968561.1	MULTISPECIES: cupin domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_024767861.1	ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004684826.1	cupin domain-containing protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004682517.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_087932854.1	cupin domain-containing protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004688648.1	MULTISPECIES: porin family protein [ <i>Brucella</i> ]

#### 4.10.1.3.B.melitensis 5031 İzolatının Sonuçları

*B. melitensis* 5031 izolatı ile yapılan MBI sonucunda 55 adet protein tanımlandı.

Tanımlanan bu proteinler Tablo 4.9’da belirtilmiştir.

**Tablo 4.9.** Pozitif serum ve *B.melitensis* 5031 ile yapılan MBI sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri.

Protein kodu	Protein İsmi
WP_002964935.1	MULTISPECIES: IS6-like element IS2020 family transposase [ <i>Brucella</i> ]
WP_002966724.1	MULTISPECIES: phage major capsid protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_004685509.1	phage major capsid protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_087909581.1	IS6 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_050560556.1	IS6-like element IS2020 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_032451232.1	IS6-like element IS2020 family transposase, partial [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006261779.1	MULTISPECIES: phage major capsid protein [ <i>Brucella</i> ]



<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>
WP_065895625.1	phage major capsid protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004688126.1	MULTISPECIES: phage major capsid protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_004686539.1	MULTISPECIES: phage major capsid protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_006642007.1	MULTISPECIES: IS6 family transposase [ <i>Brucella</i> ]
WP_046722146.1	phage major capsid protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_032449882.1	IS6-like element IS2020 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004685868.1	IS6-like element IS2020 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_101457603.1	IS6-like element IS2020 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004683466.1	MULTISPECIES: porin family protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_004681792.1	MULTISPECIES: DUF4038 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_002966387.1	MULTISPECIES: chaperonin GroEL [ <i>Brucella</i> ]
WP_002964371.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L7/L12 [ <i>Brucella</i> ]
WP_004681497.1	MULTISPECIES: oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding subunit [ <i>Brucella</i> ]
WP_002967723.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_002964038.1	MULTISPECIES: DsbA family protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_017822065.1	DUF4038 domain-containing protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_087932952.1	N-acetylglucosamine transferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006266922.1	DUF4038 domain-containing protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_011005782.1	hypothetical protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006153248.1	hypothetical protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_087909557.1	DsbA family protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_011005794.1	chaperonin GroEL [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004690145.1	MULTISPECIES: DUF4038 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_017822069.1	chaperonin GroEL [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004685011.1	DUF4038 domain-containing protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006138797.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_006152432.1	DsbA family protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_024767947.1	DUF4038 domain-containing protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004688851.1	MULTISPECIES: chaperonin GroEL [ <i>Brucella</i> ]
WP_024768000.1	DUF4038 domain-containing protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_124737057.1	DUF4038 domain-containing protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_065887266.1	N-acetylglucosamine transferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_101417050.1	N-acetylglucosamine transferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006267642.1	50S ribosomal protein L7/L12 [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006151328.1	porin family protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]

Protein kodu	Protein İsmi
WP_006147191.1	hypothetical protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006151959.1	hypothetical protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_087932869.1	chaperonin GroEL [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006144850.1	DUF4038 domain-containing protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_014490119.1	50S ribosomal protein L7/L12 [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004685536.1	porin family protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006147160.1	DUF4038 domain-containing protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_065879815.1	N-acetylglucosamine transferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_002966790.1	MULTISPECIES: DsbA family protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_006149711.1	chaperonin GroEL [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_126981368.1	N-acetylglucosamine transferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_019444592.1	DsbA family protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004685080.1	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding subunit [ <i>Brucella melitensis</i> ]

#### 4.10.1.4.B.melitensis 5112 İzolatının Sonuçları

*B. melitensis* 5112 izolatu ile yapılan MBİ sonucunda 44 adet protein tanımlandı.

Tanımlanan bu proteinler Tablo 4.10'da belirtilmiştir.

**Tablo 4.10.** Pozitif serum ve *B.melitensis* 5112 ile yapılan MBİ sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri.

Protein kodu	Protein İsmi
WP_087907707.1	IS5 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_002966069.1	MULTISPECIES: bacterioferritin [ <i>Brucella</i> ]
WP_004685522.1	thiol:disulfide oxidoreductase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_002964709.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_087923330.1	IS5 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_087907799.1	IS5 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_127074433.1	IS5 family transposase, partial [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_087910421.1	IS5 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004681883.1	MULTISPECIES: bacterioferritin [ <i>Brucella</i> ]
WP_002968422.1	MULTISPECIES: bacterioferritin [ <i>Brucella</i> ]
WP_127074438.1	IS5 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006152507.1	thiol:disulfide oxidoreductase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_054598420.1	IS5 family transposase, partial [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_087921029.1	IS5 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_101419833.1	IS5 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004686876.1	MULTISPECIES: bacterioferritin [ <i>Brucella</i> ]
WP_101433286.1	ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>
WP_087920851.1	ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_094283661.1	ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_099686910.1	MULTISPECIES: IS5 family transposase [ <i>Brucella</i> ]
WP_002963866.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_002965392.1	MULTISPECIES: [protein-PII] uridylyltransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_002965578.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_006191194.1	MULTISPECIES: [protein-PII] uridylyltransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_094979191.1	ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004685548.1	GNAT family N-acetyltransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006267350.1	[protein-PII] uridylyltransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006138210.1	ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006260298.1	[protein-PII] uridylyltransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006139466.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_006136128.1	hypothetical protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_069129803.1	GNAT family N-acetyltransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_101419127.1	[protein-PII] uridylyltransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006161145.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_006256276.1	[protein-PII] uridylyltransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006137391.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_004683500.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_101419821.1	GNAT family N-acetyltransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_016769572.1	GNAT family N-acetyltransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_071152683.1	[protein-PII] uridylyltransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004686653.1	MULTISPECIES: [protein-PII] uridylyltransferase [ <i>Brucella</i> ]
WP_128675654.1	[protein-PII] uridylyltransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004686505.1	GNAT family N-acetyltransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_002969408.1	MULTISPECIES: M48 family peptidase [ <i>Brucella</i> ]

#### 4.10.2. Bruselloz Negatif Serum Kaplanmış Manyetik Boncuk ve *Brucella* Proteinleri ile Yapılan MBI Sonuçları

Bruselloz negatif insan serumundan saflaştırılan antikorlar ile kaplanmış manyetik boncuklar ve 4 farklı *B. melitensis* izolatu kullanılarak yapılan MBI deneyleri sonuçları aşağıda belirtilmiştir.

##### 4.10.2.1. *B. melitensis* 1062 İzolatının Sonuçları

*B. melitensis* 1062 izolatu ile yapılan MBI sonucunda 5 adet protein tanımlandı. Tanımlanan bu proteinler Tablo 4.11’da belirtilmiştir.

**Tablo 4.11.** Negatif serum ve *B. melitensis* 1062 ile yapılan MBI sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri.

Protein kodu	Protein İsmi
WP_004690210.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_017822103.1	exodeoxyribonuclease III [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004687718.1	MULTISPECIES: exodeoxyribonuclease III [ <i>Brucella</i> ]
WP_024767995.1	exodeoxyribonuclease III [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_002965066.1	MULTISPECIES: exodeoxyribonuclease III [ <i>Brucella</i> ]

##### 4.10.2.2. *B. melitensis* 1177 İzolatının Sonuçları

*B. melitensis* 1177 izolatu ile yapılan MBI sonucunda 12 adet protein tanımlandı. Tanımlanan bu proteinler Tablo 4.12’da belirtilmiştir.

**Tablo 4.12.** Negatif serum ve *B. melitensis* 1177 ile yapılan MBI sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri.

Protein kodu	Protein İsmi
WP_002964266.1	MULTISPECIES: triose-phosphate isomerase [ <i>Brucella</i> ]
WP_002964935.1	MULTISPECIES: IS6-like element IS2020 family transposase [ <i>Brucella</i> ]
WP_006642007.1	MULTISPECIES: IS6 family transposase [ <i>Brucella</i> ]
WP_032449882.1	IS6-like element IS2020 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004685868.1	IS6-like element IS2020 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004681766.1	MULTISPECIES: porin family protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_101457603.1	IS6-like element IS2020 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_087909581.1	IS6 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]

Protein kodu	Protein İsmi
WP_004683846.1	MULTISPECIES: triose-phosphate isomerase [ <i>Brucella</i> ]
WP_050560556.1	IS6-like element IS2020 family transposase [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_032451232.1	IS6-like element IS2020 family transposase, partial [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004685017.1	porin family protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]

#### 4.10.2.3.*B.melitensis* 5031 İzolatının Sonuçları

*B. melitensis* 5031 izolatı ile yapılan MBİ sonucunda 4 adet protein tanımlandı. Tanımlanan bu proteinler Tablo 4.13’da belirtilmiştir.

**Tablo 4.13.** Negatif serum ve *B.melitensis* 5031 ile yapılan MBİ sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri.

Protein kodu	Protein İsmi
WP_002964234.1	MULTISPECIES: HU family DNA-binding protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_004681766.1	MULTISPECIES: porin family protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_004685017.1	porin family protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006190452.1	MULTISPECIES: HU family DNA-binding protein [ <i>Brucella</i> ]

#### 4.10.2.4.*B.melitensis* 5112 İzolatının Sonuçları

*B. melitensis* 5112 izolatı ile yapılan MBİ sonucunda 6 adet protein tanımlandı. Tanımlanan bu proteinler Tablo 4.14’da belirtilmiştir.

**Tablo 4.14.** Negatif serum ve *B.melitensis* 5112 ile yapılan MBİ sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri.

Protein kodu	Protein İsmi
WP_002964234.1	MULTISPECIES: HU family DNA-binding protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_002964266.1	MULTISPECIES: triose-phosphate isomerase [ <i>Brucella</i> ]
WP_004681766.1	MULTISPECIES: porin family protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_004685017.1	porin family protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004683846.1	MULTISPECIES: triose-phosphate isomerase [ <i>Brucella</i> ]
WP_006190452.1	MULTISPECIES: HU family DNA-binding protein [ <i>Brucella</i> ]

#### 4.10.3. Bruselloz Pozitif Serum Kaplanmış Manyetik Boncuk ve IP Lizis Tamponu ile Yapılan MBİ Sonuçları

Bruselloz pozitif insan serumundan saflaştırılan antikörler ile kaplanmış manyetik boncuklar ve IP lizis tamponu kullanılarak yapılan MBİ deneyleri sonucu aşağıda belirtilmiştir.

IP lizis tamponu ile yapılan MBİ sonucunda 9 adet protein tanımlandı. Tanımlanan bu proteinler Tablo 4.15’de belirtilmiştir.

**Tablo 4.15.** IP lizis tamponu ile yapılan MBİ sonucunda tanımlanan proteinlerin kodları ve isimleri.

Protein kodu	Protein İsmi
WP_004684051.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_004682630.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_002963560.1	MULTISPECIES: tetratricopeptide repeat protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_127030815.1	hypothetical protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004685451.1	tetratricopeptide repeat protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006137704.1	tetratricopeptide repeat protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_006144674.1	tetratricopeptide repeat protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]
WP_004691809.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]
WP_006137785.1	hypothetical protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]

#### 4.11. MBİ Sonuçlarının Analizi

Dört farklı *B.melitensis* izolatından elde edilen proteinler ile yapılan tüm MBİ sonuçları Tablo 4.16’de belirtilmiştir.

**Tablo 4.16.** MBİ sonrasında tanımlanan protein sayıları.

İzolat	Tanımlanan protein sayısı	
	Pozitif serum	Negatif serum
<i>B. melitensis</i> 1062	66	5
<i>B. melitensis</i> 1177	73	12
<i>B. melitensis</i> 5031	55	4
<i>B. melitensis</i> 5112	44	6
IP lizis tamponu	9	--

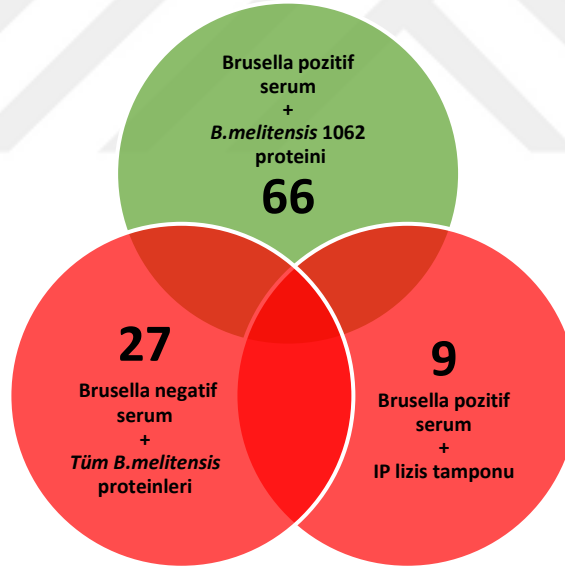
Bir izolata ait sonuçlar hem diğer izolatların negatif serum ile yapılan MBİ sonuçlarıyla (Örneğin; *B.melitensis* 1062 proteini + bruselloz pozitif serum kaplanmış MBİ

sonucu ile diğer izolatların bruselloz negatif serum kaplanmış MBİ sonuçları) hem de IP lizis tamponu ile yapılan MBİ sonuçlarıyla karşılaştırıldı. Bruselloz negatif serumla yapılan MBİ’de bulunan proteinler diğer MBİ sonuçlarında da varsa bu proteinler çapraz pozitiflik olarak değerlendirilip immünodominant protein olarak dikkate alınmadı.

Bruselloz negatif serumla yapılan MBİ’lerin sonuçlarına göre toplam 27 protein, IP lizis tamponu ile yapılan MBİ sonucuna göre ise 9 protein tanımlanmıştır. Bu iki MBİ işleminde ortak protein belirlenmemiştir. Bu sonuçlar tüm izolatların venn şemalarında gösterilmiştir.

#### 4.11.1. *B.melitensis* 1062 MBİ Sonuçları

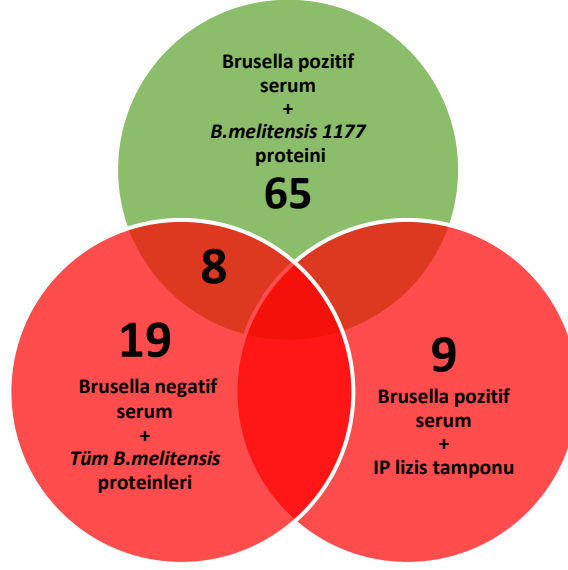
*B.melitensis* 1062 izolatının sonuçları Şekil 4.9’de belirtilmiştir. Yapılan MBİ ile 66 protein tanımlanmıştır. Negatif serumla yapılan MBİ ile tanımlanan 27 proteinin ve IP lizis tamponu ile yapılan MBİ ile tanımlanan 9 proteinin hiçbirisinin *B.melitensis* 1062 izolatı ile yapılan MBİ ile tanımlanmadığı belirlenmiştir.



**Şekil 4.10.** *B.melitensis* 1062’nin tüm *B.melitensis* proteinlerinin negatif serum MBİ sonuçları ile karşılaştırılmasına ait Venn şeması.

#### 4.11.2. *B.melitensis* 1177 MBİ Sonuçları

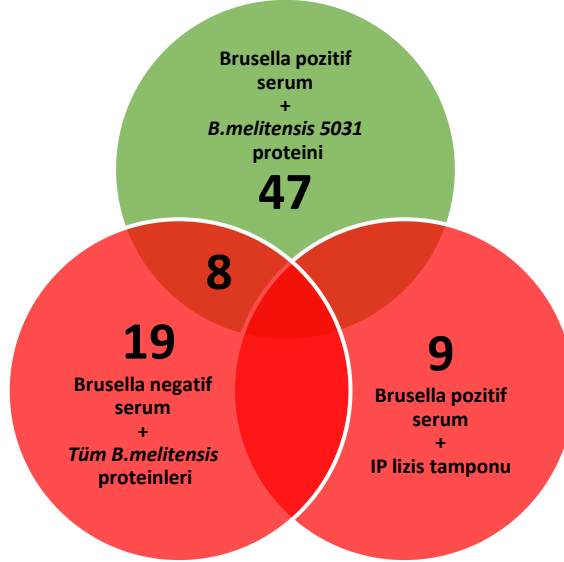
*B.melitensis* 1177 izolatının sonuçları Şekil 4.10’de belirtilmiştir. Yapılan MBİ ile 73 protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerden 8 tanesinin negatif serumla yapılan MBİ ile de tanımlanmadığı belirlenmiştir. IP lizis tamponu ile yapılan MBİ ile ortak protein bulunmamıştır.



**Şekil 4.11.** *B.melitensis* 1177'nin tüm *B.melitensis* proteinlerinin negatif serum MBİ sonuçları ile karşılaştırılmasına ait Venn şeması.

#### 4.11.3. *B.melitensis* 5031 MBİ Sonuçları

*B.melitensis* 5031 izolatının sonuçları Şekil 4.11'de belirtilmiştir. Yapılan MBİ ile 55 protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerden 8 tanesinin negatif serumla yapılan MBİ ile de tanımlanmadığı belirlenmiştir. IP lizis tamponu ile yapılan MBİ ile ortak protein bulunmamıştır.

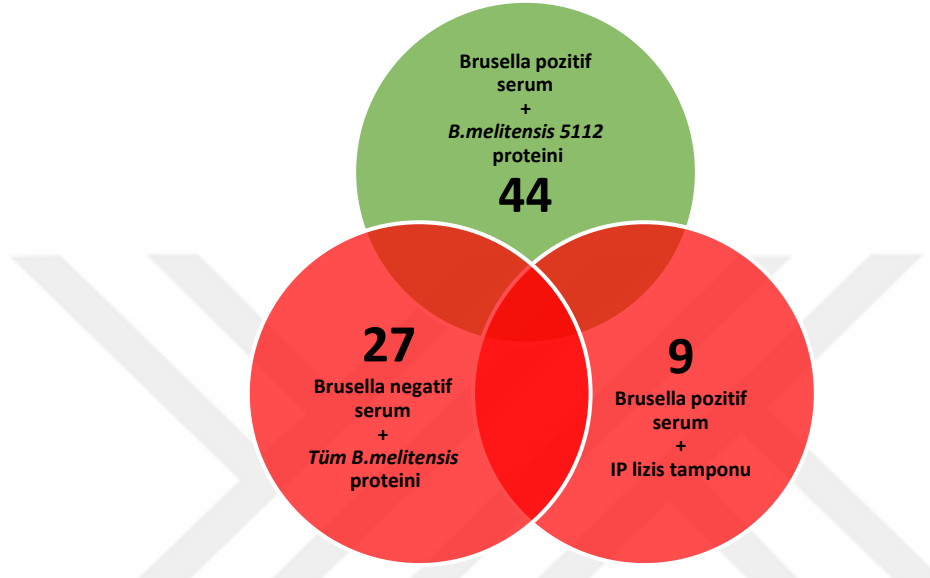


**Şekil 4.12.** *B.melitensis* 5031'in tüm *B.melitensis* proteinlerinin negatif serum MBİ sonuçları ile karşılaştırılmasına ait Venn şeması.



#### 4.11.4. *B.melitensis* 5112 MBİ Sonuçları

*B.melitensis* 5112 izolatının sonuçları Şekil 4.12’de belirtilmiştir. Yapılan MBİ ile 44 protein tanımlanmıştır. Negatif serumla yapılan MBİ ile tanımlanan 27 proteinin ve IP lizis tamponu ile yapılan MBİ ile tanımlanan 9 proteinin hiçbirisinin *B.melitensis* 5112 izolatı ile yapılan MBİ ile tanımlanmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.13. *B.melitensis* 5112’nin tüm *B.melitensis* proteinlerinin negatif serum MBİ sonuçları ile karşılaştırılmasına ait Venn şeması.

#### 4.11.5. *B. melitensis* İzolatlarında Ortak Olan Proteinler

- “**Bacterioferritin**” proteininin “WP\_002966069.1, WP\_002968422.1, WP\_004686876.1, WP\_004681883.1” erişim numaralı proteinleri *B.melitensis* 1062, 1177 ve 5112 izolatlarında ortak olarak bulunmuştur.
- “**sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB**” proteininin “WP\_004681934.1, WP\_100217440.1, WP\_086440147.1, WP\_094866405.1, WP\_004686048.1, WP\_004684932.1, WP\_101433165.1 ve WP\_087907903.1” erişim numaralı proteinleri ise *B.melitensis* 1062 ve 1177 izolatlarında ortak olarak bulunmuştur.

## 5. TARTIŞMA

*Brucella* cinsi bakteriler bruselloz hastalığı etkenidir. Bruselloz hastalığı evcil ve vahşi hayvanlarda düşük ve kısırlığa, insanlarda ise akut veya kronik enfeksiyonlara neden olur (Lapaque ve ark., 2005). Bruselloz Orta Doğu, Akdeniz kıyıları, Asya, Afrika, Güney ve Orta Amerika'daki bazı ülkelerde endemik bir zoonozdur (Rubach ve ark., 2013). Dünya genelinde yılda ortalama 500.000 insan bruselloz tanısı almaktadır (Byndloss & Tsolis, 2016). Türkiye'de ise insanlarda 6457 (2017 yılı) hayvanlarda ise 5496 (2011 yılı) brusella olgusu rapor edilmiştir (Türkiye, 2011, 2017).

*Brucella melitensis* insanlar için en virulan olan türdür, 10-100 adet bakteri bile hastalık oluşturabilir (Pappas ve ark., 2006; Winter ve ark., 1996; Young, 1983). Ülkemizde de tüm Dünya'da olduğu gibi brusella bakterisi enfekte çiğ süt ve peynir-krema gibi süt ürünlerinin tüketilmesi, enfekte hayvana ait salgılara temas edilmesi veya kontamine aerosollerin solunması ile bulaşır (Young, 1983; Yumuk & O'Callaghan, 2012).

Bruselloz tanısı özellikle ekonomik yönden geri kalmış ülkelerde serolojik testler ile konulur. Ancak serolojik testlerin özgüllüğü çok yüksek değildir. Serolojik testlerde antijen olarak genellikle hücre ekstraktları veya LPS fraksiyonları kullanılmaktadır. Bunun sonucunda da bazı mikroorganizmalara karşı oluşan antikorlar ile çapraz reaksiyon meydana gelmekte ve bu durum tanıda hatalı pozitifliklere sebep olmaktadır (Yagupsky ve ark., 2019). Bu nedenle brusella'ya yüksek derecede spesifik immünojenik proteinlerin tanımlanması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışma ile Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden izole edilmiş brusella izolatlarında ortak immünojen protein varlığının immünoproteomik yöntemle araştırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmada bölgeleri temsil etmesi amacıyla Marmara Bölgesi'nden, İç Anadolu Bölgesi'nden, Doğu Anadolu Bölgesi'nden ve Ege Bölgesi'nden toplam dört izolat kullanılmıştır.

İmmünyakalama katı bir faza bağlanmış spesifik antikorlar kullanılarak antijenlerin afinite saflaştırmasıdır. Bu çalışmada hasta serumlarıyla hazırlanan serum havuzundan elde edilen antikorlar manyetik boncuklara kaplanarak brusella proteinleri ile immünyakalama reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. AMIDA olarak isimlendirilen bu yöntem kullanılarak poliakrilamid jel elektroforezi esnasında özellikle çözünür olmayan membran proteinlerinin jelde yürütülmesindeki zorluklar ekarte edilmiştir. AMIDA yönteminde, protein karışımının 2D-PAGE'de olduğu gibi spotlara ayrıştırılması gerekmediği için yüksek miktarda antijen ile çalışılabilmektedir. Daha fazla protein ile çalışmak testin hassasiyetini arttırmaktadır. Bununla birlikte, hasta serumunun Protein G kolondan geçirilmesi sonucunda serumda

yüksek miktarda bulunan albümin ortamdan uzaklaşmakta, sonuç olarak spesifik olmayan çapraz reaksiyonlar daha az görülmektedir (Rauch & Gires, 2008). Bu gibi avantajlarından dolayı bu tez çalışmasında immünoproteomik test olarak AMIDA yöntemi kullanılmıştır. Literatürde AMIDA yönteminin kullanıldığı brusella proteomu ile ilgili çalışma saptanmamıştır.

Zhao ve ark. tarafından yapılan ve *B. melitensis* M5 biyotip I aşısı suşunun kullanıldığı bir çalışmada membran proteinleri 2D-PAGE ile ayrıştırılmış (Zhao ve ark., 2011). Jel 15 adet anti-brusella pozitif sığır serumu ile oluşturulan serum havuzu ve 23 adet anti-brusella negatif sığır serumu ile oluşturulan serum havuzu (negatif kontrol) ile blotlanmış. Western-blot işlemi sonucunda immünoaktif olan proteinler jelden toplanıp tripsin ile kesim işleminden sonra MALDI/TOF-MS ile tanımlanmış. Jelde toplam 426 protein spotu belirlenmiş. Bu spotların 21 tanesi immünoaktif protein olarak yayınlanmıştır. Bu tez çalışmasında ise total membran proteini izole edilen 4 farklı izolattan toplam 211 protein tanımlanmıştır. En az sayıda protein tanımlanan izolatta bile 38 adet immünoaktif protein tanımlanması başarılmıştır. Bu tez çalışmasında daha fazla protein tanımlanmasının başlıca nedenleri; uygulanan membran proteini izolasyonu protokolü ve immünoproteomik tekniğin ilk kez bu alanda uyarlanması olduğunu düşünmekteyiz. Kullanılan AMIDA tekniği ile özellikle çözünür olmayan membran proteinlerinin poliakrilamid jelde yürütmesinde karşılaşılan sorunları ortadan kaldırdığı için daha fazla protein tanımlanmasını sağladığı şeklinde yorumlanmıştır. Zhao ve ark.'ları çalışmalarında sığır serumları kullanmışken bu çalışmada insan serumları kullanılmıştır. Her iki çalışmada kullanılan bakterilerin ve serumların farklı olması da farklı sonuçların alınmasına sebep olduğunu düşünmekteyiz. Zhao ve ark.'ları tarafından immünoaktif protein olarak tanımlanan “porin”, “Chaperonin GroEL”, “Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase” ve “50S ribosomal protein”leri bu tez çalışmasında da immünoaktif olarak saptanmıştır. Ancak bu proteinlerin hiçbiri kullanmış olduğumuz dört izolatta ortak immünodominant protein olarak belirlenmemiştir.

Yang ve ark. tarafından yapılan ve *B. melitensis* 16M biyotip I referans suşunun kullanıldığı bir çalışmada total proteinler 2D-PAGE jeller ile spotlara ayrılmış (Yang ve ark., 2011). Jellerden bir tanesi akut bruselloz geçiren 2 hastadan elde edilen serumlar ile hazırlanan serum ile, diğer jel ise *B. melitensis* ile enfekte olmuş 12 adet keçiden alınan serumlardan oluşturulan serum ile blotlanmış. Western-blot işlemi sonucunda immünoaktif olan proteinler jelden toplanıp tripsin ile kesim işleminden sonra LC-MS/MS ile tanımlanmış. Çalışma sonunda 600'den fazla protein spotu elde edilmiş. Bunlardan 23 tanesi insan serumları ile yapılan blotlamada, 33 tanesi ise keçi serumları ile yapılan

blotlamada immünoaktif olarak tanımlanmış. On bir tane protein hem insanda hem de keçide ortak immünojen olarak bulunmuş. Bu tezde insanda aşı uygulamasına aday immunodominant protein seçimi hedeflendiği için insan serumu kullanılması tercih edilmiştir. Bruselloz hastası 25 kişiye ait serumlardan bir havuz oluşturulup en etkin immunodominant protein saptanmaya çalışılmıştır. Yang ve ark.'larının immünojen olarak saptadığı proteinlerin hiçbirisi bu tez çalışmasında araştırılan immünojen proteinler içerisinde yer almamaktadır. Bunun sebebi her iki çalışmada kullanılan immünojen protein tanımının farklı amaçlar için kullanılmasıdır. Yang ve ark.'ları çalışmalarında araştırdıkları tek bir suşun hem insan hem de hayvan serumunda ortak immünoaktif olan proteinlerini immünojen olarak tanımlarken, bu tez çalışmasında araştırılan 4 farklı izolatın en az ikisinde immünoaktif olan proteinler insan serum havuzu kullanılması sonucunda immünojen protein olarak değerlendirilmiştir.

Wareth ve ark.'ları tarafından yapılan bir çalışmada *B. abortus* ve *B.melitensis*'in immünojen proteinleri araştırılmıştır (Wareth ve ark., 2016). Türkiye'deki bir inekten izole edilmiş tek bir *Brucella abortus*'un immünoaktif proteinlerinin de değerlendirildiği bu çalışmada *B. abortus* ve *B.melitensis* izolatlarından total protein izolasyonu yapıldıktan sonra 2D-PAGE ile spotlar elde edilmiş. Bu 2D-PAGE jeli ve Mısır'daki enfekte sığır, manda, koyun ve keçilerden elde edilen serumlar kullanılarak Western-Blot yapılmış. İmmünoaktif olan proteinler MALDI/TOF-MS ile analiz edilmiş. Analiz sonucunda *B.melitensis* izolatında 20 protein, Türkiye'den izole edilen *B.abortus* izolatında ise 25 protein immünoaktif olarak tanımlanmış. Bu tez çalışmasında immünojen olarak saptanan "Bacterioferritin" proteini, benzer şekilde Wareth ve ark.'ları tarafından hem *B.melitensis* hem de *B.abortus* izolatında immünoaktif olarak tespit edilmiş. Bunun dışında *B.melitensis*'te "Amino acid ABC transporter substrate-binding protein", *B. abortus*'ta ise "Chaperonin GroEL" bu tez çalışmasındaki sonuçlarla benzer şekilde immünoaktif olarak tanımlanmıştır. Ancak her iki protein bu tez çalışmasında da immünoaktif olarak tanımlanmasına rağmen ortak immünojen protein olarak tespit edilmemiştir. Wareth ve ark.'ları "Fumarylacetoacetate hydrolase" proteinini hem *B. abortus* hem de *B. melitensis* izolatlarının tüm hayvan (sığır, manda, koyun ve keçi) serumlarıyla yapılan immünoproteomik analizlerinde ortak immünojen protein olarak tespit etmişlerdir. Ancak Wareth ve ark.'ları, bu tez çalışmasından farklı olarak, insan serumları ile değil enfekte hayvan serumları kullanarak immünojen proteinleri araştırmışlardır. Bunun dışında kullanılan immünoproteomiks tekniği de bu tez çalışmasında

kullanılan AMIDA tekniğinden farklıdır. Tanımlanan immünodominant proteinlerin farklı olmasının her iki çalışma arasındaki bu farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında “Bacterioferritin (Bfr)” *B.melitensis* 1062, 1177 ve 5112 izolatlarında, “sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB” ise *B.melitensis* 1062 ve 1177 izolatlarında ortak immünodominant protein olarak tanımlanmıştır.

Bfr, merkezi bir demir depolama boşluğunu çevreleyen, kabaca küresel bir protein kabuğu oluşturan 24 adet aynı alt birimden oluşan ve hem içeren bir demir depolayan multimerik proteindir (Frolow, Kalb, & Yariv, 1994). Bfr sadece bakterilerde bulunur ve hücrel metabolizmada önemli bir role sahip olan “hem” içeren ferritin sınıfına aittir. Bakterioferritin demir homeostazını kontrol eder ve metali biyolojik olarak kullanılabilir ve toksik olmayan bir formda depolar (Almirón & Ugalde, 2010; Andrews, 2010). Bfr'nin varlığı *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis* ve *Mycobacterium leprae* gibi patojenler dahil çok çeşitli mikroorganizmada tespit edilmiştir (Brooks ve ark., 1991; Inglis, Stevenson, Hosie, & Sharp, 1994; Moore, Mann, & Bannister, 1986; Perry, Lucier, Sikkema, & Brubaker, 1993; Pessolani ve ark., 1994). Bfr *B. melitensis*'te ısı, oksidasyon ve asit streslerine karşı sentezlenen bir protein olarak da tanımlanmıştır (Teixeira-Gomes, Cloeckert, & Zygmunt, 2000). Aynı zamanda *B. melitensis*'in Bfr proteini, enfekte sığırlarda güçlü lenfoproliferatif tepki oluşturduğu ve IFN- $\gamma$  üretimini arttırdığı için T hücre-immünodominant antijeni olarak kabul edilmiştir (Denoel ve ark., 1997). *B. abortus* ile yapılan bir çalışmada Bfr'nin, doğal olarak enfekte olmuş sığırlarda güçlü antijenik özelliğe sahip olduğu, bu proteinin serolojik tanıda potansiyel brusella belirteci olarak uygulanabileceği düşünülmüştür (Philippe A. Denoel ve ark., 1995; Pajuaba ve ark., 2012). Rekombinant *B.abortus* Bfr proteini ile yapılan ve sığır brusellozu tanısında kullanılmak üzere oluşturulan ELISA testinde özgüllük %93,6, duyarlılık ise %85,33 olarak tespit edilmiştir (Hop ve ark., 2016). Ancak literatürde insan serumlarıyla çalışılmış ve Bfr'nin antijen olarak kullanıldığı ELISA ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında insan serumları kullanılarak Bfr'nin immünodominant olduğu gösterilmiştir.

Bruselloz aşısı çalışmalarında Bfr'nin potansiyel belirteç olarak kullanılabilirliğini test etmek amacıyla Al-Mariri ve ark.'ları Bfr antijenini rekombinant protein olarak saflaştırmış ve hücre-aracılı immün sistem adjuvanı olan CpG ODN ile birlikte fareye enjekte edilmiştir. Bfr aşılması sonrası farede uygun bir immün yanıt oluşmuş ancak herhangi bir koruyuculuk tespit edilmemiştir (Al-Mariri ve ark., 2001). Yazarlar Bfr'nin aşısı determinantı olarak uygun

olmadığı yönünde görüş bildirmiştir. Söz konusu çalışma deney hayvanlarında olup insanlarda gelişen antikorlarla herhangi bir karşılaştırma yapılmamıştır.

Bu tez çalışmasında bulunan diğer ortak immünodominant protein “sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB” proteindir. UgpB, ABC taşıyıcı kompleksi UgpABCE'nin bir parçasıdır ve sn-gliserol-3-fosfat'ın hücre içine alınmasında rol oynar. Kompleks iki ATP bağlayıcı protein (UgpC), iki transmembran protein (UgpA ve UgpE) ve bir solute-binding proteinden (UgpB) oluşur. Glycerol-3-phosphate binding ATP-binding cassette (ABC) transporter, çeşitli patojenik ve patojenik olmayan bakterilerin dış zarında bulunur (Czibener & Ugalde, 2012). Gliserol-3-fosfat, glikoliz ve fosfolipid biyosentezinin metabolik bir ara maddesidir. (Sascha Al Dahouk ve ark., 2013). UgpB proteini ise brusella'nın hücre yüzeyinde bulunur ve epitelyal hücrelerin enfeksiyonu sırasında adezin ve invazin olarak rol oynar (Castañeda-Roldán ve ark., 2006). UgpB'nin brusella'da ikili bir işlevi olabileceği ve besin stresinin konakçı hücrelerin istilasına neden olup olmayacağını araştırılması ile açıklığa kavuşturulabileceği belirtilmektedir (Al Dahouk ve ark., 2013).

Literatür incelendiğinde “sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB” proteini ile ilgili bruselloz tanısında veya mevcut aşılama kullanımı ile ilgili bir veriye ulaşılamamıştır. Ancak UgpB gen bölgesinin özellikle DNA aşısı olarak kullanılabilmesi ile ilgili bazı çalışmalar mevcuttur. Castaneda-Roldan ve ark.'ları brusella'nın yüzey proteinleri (SP) ile ilgili çalışmalarında SP41 proteinini tanımlamışlardır. SP41 proteininin biyokimyasal analizi sonucunda, bu proteinin birçok bakteri türünde bulunan glycerol-3-phosphate binding ATP-binding cassette (ABC) taşıyıcı proteinine önemli bir homoloji gösteren “*UgpB*” lokusunun öngörülen bir ürünü olduğunu göstermişlerdir (Castañeda-Roldán ve ark., 2006). Al-Mariri ve ark.'ları ise sp41 (UgpB) genini taşıyan DNA/plazmid ile fare immünizasyonu gerçekleştirmiş ve bu sp41'in DNA aşısı olarak kullanılabilirliğini araştırmıştır (Al-Mariri, Akel, & Abbady, 2014). p39 ve sp41 genlerini içeren plazmid DNA'sı ile aşılamanın Th-1'in hem hümmoral hem de hüccresel tipinin ortaya çıkmasına neden olduğunu ve bu plazmid DNA ile aşılama'nın brusella'ya karşı koruma sağlamak için başarılı bir alternatif yöntem olabileceğini göstermişlerdir. Tez çalışmasında da saptanmış olan UgpB proteininin gen bölgesi ile yapılacak DNA aşı çalışmalarının kişide hümmoral ve hüccresel immün yanıtı tetikleme brusellozun önlenmesi açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, Türkiye’den izole edilen 4 farklı *Brusella melitensis* izolatının 3 tanesinde Bfr proteini, 2 tanesinde ise UgpB proteini ortak immüno-dominant protein olarak saptanmıştır. Literatürde bu proteinler veya bunların gen bölgeleriyle ilgili yapılmış ve insandaki brusellozun serolojik tanısında veya aşılama da kullanılmalarıyla ilgili veriler çok az sayıdadır. Özellikle Bfr’nin serolojik tanıda kullanılabileceği bildirilmiş ve sığı r brusellozunun serolojik tanısı için ELISA çalışmaları yapılmış olmasına rağmen insan brusellozunun serolojik tanısı için yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması ile *B. melitensis* izolatlarındaki Bfr proteinin ins anlarda immünojen bir protein olduğu gösterilmiştir. Tez çalışmasında da saptanmış olan UgpB proteininin de potansiyel aşı çalışmalarında kullanılabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışması ile hem Bfr hem de UgpB proteininin immunodominant özellikleri nedeniyle insan brusellozunun serolojik tanısında ve aşı çalışmalarında önemli potansiyele sahip olduğu görülmekte olup daha detaylı in vitro çalışmalar ve hayvan deneyleri yapılarak geliştirilecek bir konu olarak bilim dünyasına sunulmuştur.

## 7. KAYNAKLAR

- Abbady, A. Q., Al-Daoude, A., Al-Mariri, A., Zarkawi, M., & Muyldermans, S. (2012). Chaperonin GroEL a Brucella immunodominant antigen identified using Nanobody and MALDI-TOF-MS technologies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.01.015>
- Abo Assali, L., Al-Mariri, A., Hamad, E., & Abbady, A. Q. (2012). Immunodetection of the recombinant GroEL by the Nanobody NbBruc02. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1109-z>
- Al-Mariri, A., Akel, R., & Abbady, A. (2014). A DNA vaccine encoding p39 and sp41 of Brucella melitensis induces protective immunity in BALB/c mice. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1), 53–62. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100008>
- Al-Mariri, A., Tibor, A., Mertens, P., De Bolle, X., Michel, P., Godefroid, J., ... Letesson, J. J. (2001). Protection of BALB/c mice against Brucella abortus 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.4816-4822.2001>
- Al Dahouk, S., Sprague, L. D., & Neubauer, H. (2013). New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans Isolation of brucellae from blood and tissues. *Rev. Sci. Tech. off. Int. Epiz.*
- Al Dahouk, Sascha, Jubier-Maurin, V., Neubauer, H., & Köhler, S. (2013). Quantitative analysis of the Brucella suis proteome reveals metabolic adaptation to long-term nutrient starvation. *BMC Microbiology*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-199>
- Al Dahouk, Sascha, Loisel-Meyer, S., Scholz, H. C., Tomaso, H., Kersten, M., Harder, A., ... Jubier-Maurin, V. (2009). Proteomic analysis of Brucella suis under oxygen deficiency reveals flexibility in adaptive expression of various pathways. *Proteomics*. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800266>
- Al Dahouk, Sascha, & Nöckler, K. (2011). Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. <https://doi.org/10.1586/eri.11.55>
- Al Dahouk, Sascha, Nöckler, K., Scholz, H. C., Tomaso, H., Bogumil, R., & Neubauer, H. (2006). Immunoproteomic characterization of Brucella abortus 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of Brucella infections. *Journal of Immunological Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.11.003>
- Al Dahouk, Sascha, Scholz, H. C., Tomaso, H., Bahn, P., Göllner, C., Karges, W., ... Nöckler, K. (2010). Differential phenotyping of Brucella species using a newly developed semi-automated metabolic system. *BMC Microbiology*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-269>
- Al Dahouk, Sascha, Tomaso, H., Nöckler, K., Neubauer, H., & Frangoulidis, D. (2003). Laboratory-based diagnosis of brucellosis - A review of the literature Part I: Techniques for direct detection and identification of Brucella spp. *Clinical Laboratory*.
- Almirón, M. A., & Ugalde, R. A. (2010). Iron homeostasis in Brucella abortus: The role of bacterioferritin. *Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s12275-010-0145-3>
- Alton, G. G., & Forsyth, J. R. L. (1996). *Brucella*. In: *Medical Microbiology*. 4th edition. *Medical Microbiology*.
- Altuglu, I., Zeytinoglu, A., Bilgic, A., Kamcioglu, S., Karakartal, G., & Smits, H. (2002). Evaluation of Brucella dipstick assay for the diagnosis of acute brucellosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00456-X](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00456-X)
- Andrews, S. C. (2010). The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.05.010>
- Araj, G. F., Brown, G. M., Haj, M. M., & Madhvan, N. V. (1988). Assessment of Brucellosis Card test in screening patients for brucellosis. *Epidemiology and Infection*. <https://doi.org/10.1017/S0950268800067145>
- Araj, G. F., Lulu, A. R., Mustafa, M. Y., & Khateeb, M. I. (1986). Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute and chronic brucellosis in human beings. *Journal of Hygiene*. <https://doi.org/10.1017/S0022172400063634>
- Araj, George F. (1988). Profiles of brucella-specific immunoglobulin G subclasses in sera of patients with acute and chronic brucellosis. *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease*. [https://doi.org/10.1016/0888-0786\(88\)90004-2](https://doi.org/10.1016/0888-0786(88)90004-2)
- Araj, George F., Kattar, M. M., Fattouh, L. G., Bajakian, K. O., & Kobeissi, S. A. (2005). Evaluation of the PANBIO Brucella immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of human brucellosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.11.1334-1335.2005>
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A. E., Ugalde, R., ... Gorvel, J. P.



- (2005). Cyclic  $\beta$ -1,2-glucan is a brucella virulence factor required for intracellular survival. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni1202>
- Avila-Calderón, E. D., Lopez-Merino, A., Sriranganathan, N., Boyle, S. M., & Contreras-Rodríguez, A. (2013). A history of the development of Brucella vaccines. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2013/743509>
- Bandara, A. B., Sriranganathan, N., Schurig, G. G., & Boyle, S. M. (2005). Carboxyl-terminal protease regulates Brucella suis morphology in culture and persistence in macrophages and mice. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5767-5775.2005>
- Barua, A., Kumar, A., Thavaselvam, D., Mangalgi, S., Prakash, A., Tiwari, S., ... Sathyaseelan, K. (2016). Isolation & characterization of brucella melitensis isolated from patients suspected for human brucellosis in India. *Indian Journal of Medical Research*. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.187115>
- Bonifacino, J. S., Gershlick, D. C., & Dell'Angelica, E. C. (2016). Immunoprecipitation. *Current Protocols in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1002/cpcb.3>
- Borsa, B. A., Aldag, M. E., Yilmaz, M., Dalar, Z. G., & Ozalp, V. C. (2016). Comparison of a novel test (ODAK brucella coombs gel test) with commonly used serological tests in human brucellosis. *Clinical Laboratory*. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2016.160120>
- Bounaadja, L., Albert, D., Chénais, B., Hénault, S., Zygmunt, M. S., Poliak, S., & Garin-Bastuji, B. (2009). Real-time PCR for identification of Brucella spp.: A comparative study of IS711, bcsps31 and per target genes. *Veterinary Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.023>
- Bowman, D. D. (2011). Introduction to the Alpha-proteobacteria: Wolbachia and Bartonella, Rickettsia, Brucella, Ehrlichia, and Anaplasma. *Topics in Companion Animal Medicine*. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.09.002>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Braun, W., & Kelsh, J. (1954). Improved Method for Cultivation of Brucella from the Blood. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.3181/00379727-85-20815>
- Brooks, B. W., Young, N. M., Watson, D. C., Robertson, R. H., Sugden, E. A., Nielsen, K. H., & Becker, S. A. W. E. (1991). Mycobacterium paratuberculosis antigen D: Characterization and evidence that it is a bacterioferritin. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Bryant, C. E., Spring, D. R., Gangloff, M., & Gay, N. J. (2010). The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2266>
- Buchanan, T. M., & Faber, L. C. (1980). Mercaptoethanol brucella agglutination test: Usefulness for predicting recovery from brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Byndloss, M. X., & Tsohis, R. M. (2016). Brucella spp. Virulence Factors and Immunity . *Annual Review of Animal Biosciences*. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111326>
- Can, M. F., & Yalçin, C. (2014). The cost-benefit analysis of alternative brucellosis control strategies in Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2013.9585>
- Cardoso, P. G., Macedo, G. C., Azevedo, V., & Oliveira, S. C. (2006). Brucella spp noncanonical LPS: Structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories*. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-13>
- Caroff, M., Bundle, D. R., Perry, M. B., Cherwonogrodzky, J. W., & Duncan, J. R. (1984). Antigenic S-type lipopolysaccharide of Brucella abortus 1119-3. *Infection and Immunity*.
- Casanova, A., Ariza, J., Rubio, M., Masuet, C., & Díaz, R. (2009). BrucellaCapt versus classical tests in the serological diagnosis and management of human brucellosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. <https://doi.org/10.1128/CVI.00348-08>
- Casao, M. A., Smits, H. L., Navarro, E., & Solera, J. (2003). Clinical utility of a dipstick assay in patients with brucellosis: Correlation with the period of evolution of the disease. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00519.x>
- Cascales, E., & Christie, P. J. (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro753>
- Cassataro, J., Estein, S. M., Pasquevich, K. A., Velikovskiy, C. A., De La Barrera, S., Bowden, R., ... Giambartolomei, G. H. (2005). Vaccination with the recombinant Brucella outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against Brucella melitensis infection. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8079-8088.2005>
- Castañeda-Roldán, E. I., Ouahrani-Bettache, S., Saldaña, Z., Avelino, F., Rendón, M. A., Dornand, J., & Girón, J. A. (2006). Characterization of SP41, a surface protein of Brucella associated with adherence and invasion of host epithelial cells. *Cellular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00754.x>

- Castaneda, M. R. (1947). A Practical Method for Routine Blood Cultures in Brucellosis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.3181/00379727-64-15717>
- Celli, J. (2015). The changing nature of the Brucella-containing vacuole. *Cellular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/cmi.12452>
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.-M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., & Gorvel, J.-P. (2003). Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20030088>
- Cetinkaya, Z., Aktepe, O. C., Ciftci, I. H., & Demirel, R. (2005). Seroprevalence of human brucellosis in a rural area of Western Anatolia, Turkey. *Journal of Health, Population and Nutrition*. <https://doi.org/10.3329/jhpn.v23i2.317>
- Chou, K. C., & Shen, H. Bin. (2008). Cell-PLoc: A package of Web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.494>
- Christie, P. J. (2004). Type IV secretion: The Agrobacterium VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.02.013>
- Clavijo, E., Diaz, R., Anguita, Á., García, A., Pinedo, A., & Smits, H. L. (2003). Comparison of a dipstick assay for detection of Brucella-specific immunoglobulin M antibodies with other tests for serodiagnosis of human brucellosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.4.612-615.2003>
- Cloekaert, A., Vizcaíno, N., Paquet, J. Y., Bowden, R. A., & Elzer, P. H. (2002). Major outer membrane proteins of Brucella spp.: Past, present and future. *Veterinary Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00211-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00211-0)
- Connolly, J. P., Comerci, D., Alefantis, T. G., Walz, A., Quan, M., Chafin, R., ... DelVecchio, V. G. (2006). Proteomic analysis of Brucella abortus cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *Proteomics*. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500730>
- Corbel. (2006). Brucellosis in humans and animals Brucellosis in humans and animals. *WHO*. <https://doi.org/10.2105/AJPH.30.3.299>
- Corbel, M. J. (1997). Brucellosis: An Overview. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid0302.970219>
- Cottrell, T. R., Hall, J. C., Rosen, A., & Casciola-Rosen, L. (2012). Identification of novel autoantigens by a triangulation approach. *Journal of Immunological Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.07.024>
- Czibener, C., & Ugalde, J. E. (2012). Identification of a unique gene cluster of Brucella spp. that mediates adhesion to host cells. *Microbes and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.08.012>
- De Figueiredo, P., Ficht, T. A., Rice-Ficht, A., Rossetti, C. A., & Adams, L. G. (2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of Brucella-host interactions. *American Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.003>
- Dean, A. S., Crump, L., Greter, H., Schelling, E., & Zinsstag, J. (2012). Global Burden of Human Brucellosis: A Systematic Review of Disease Frequency. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001865>
- Deghelt, M., Mullier, C., Sternon, J. F., Francis, N., Laloux, G., Dotreppe, D., ... De Bolle, X. (2014). G1-arrested newborn cells are the predominant infectious form of the pathogen Brucella abortus. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms5366>
- Delpino, M. V., Estein, S. M., Fossati, C. A., Baldi, P. C., & Cassataro, J. (2007). Vaccination with Brucella recombinant DnaK and SurA proteins induces protection against Brucella abortus infection in BALB/c mice. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.07.002>
- Delvecchio, V. G., Kapatral, V., Redkar, R. J., Patra, G., Mujer, C., Los, T., ... Overbeek, R. (2002). The genome sequence of the facultative intracellular pathogen Brucella melitensis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.221575398>
- DelVecchio, V. G., Wagner, M. A., Eschenbrenner, M., Horn, T. A., Kraycer, J. A., Estock, F., ... Mujer, C. V. (2002). Brucella proteomes - A review. *Veterinary Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00239-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00239-0)
- Denoel, P. A., Vo, T. K. O., Weynants, V. E., Tibor, A., Gilson, D., Zygmunt, M. S., ... Letesson, J. J. (1997). Identification of the major t-cell antigens present in the Brucella melitensis B115 protein preparation, Brucellergene OCB. *Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00222615-46-9-801>
- Denoel, Philippe A., Zygmunt, M. S., Weynants, V., Tibor, A., Lichtfouse, B., Briffeuil, P., ... Letesson, J. J. (1995). Cloning and sequencing of the bacterioferritin gene of Brucella melitensis 16M strain. *FEBS Letters*. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00189-G](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00189-G)
- Díaz, R., Casanova, A., Ariza, J., & Moriyón, I. (2011). The rose Bengal test in human brucellosis: A neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000950>
- Doganay, M., & Aygen, B. (2003). Human brucellosis: An overview. *International Journal of Infectious*

- Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1201-9712\(03\)90049-X](https://doi.org/10.1016/S1201-9712(03)90049-X)
- Drevinek, M., Dresler, J., Klimentova, J., Pisa, L., & Hubalek, M. (2012). Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03255.x>
- Farr, S. B., & Kogoma, T. (1991). Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological Reviews*.
- Fatollahzadeh, B., Maleknejad, P., Hejazi, M. J., & Pyri, H. (2009). Development and evaluation of TUMS medium, a novel biphasic culture medium for isolation of *Brucella* spp. from patients. *Iranian Journal of Microbiology*.
- Fernandez-Prada, C. M., Zelazowska, E. B., Nikolich, M., Hadfield, T. L., Roop, R. M., Robertson, G. L., & Hoover, D. L. (2003). Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: Bacterial surface O-polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.2110-2119.2003>
- Ferreira, L., Castaño, S. V., Sánchez-Juanes, F., González-Cabrero, S., Menegotto, F., Orduña-Domingo, A., ... Muñoz-Bellido, J. L. (2010). Identification of *Brucella* by MALDI-TOF mass spectrometry: fast and reliable identification from agar plates and blood cultures. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014235>
- Ficht, T. (2010). *Brucella* taxonomy and evolution. *Future Microbiology*. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.52>
- Forestier, C., Moreno, E., Méresse, S., Phalipon, A., Olive, D., Sansonetti, P., & Gorvel, J. P. (1999). Interaction of *Brucella abortus* lipopolysaccharide with major histocompatibility complex class II molecules in B lymphocytes. *Infection and Immunity*.
- Franco, M. P., Mulder, M., Gilman, R. H., & Smits, H. L. (2007). Human brucellosis. *Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70286-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70286-4)
- Frolow, F., Kalb, J., & Yariv, J. (1994). Structure of a unique twofold symmetric haem-binding site. *Nature Structural Biology*. <https://doi.org/10.1038/nsb0794-453>
- Fulton, K. M., & Twine, S. M. (2013). Immunoproteomics: Current Technology and Applications BT - Immunoproteomics: Methods and Protocols. In K. M. Fulton & S. M. Twine (Eds.) (pp. 21–57). Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-589-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-589-7_2)
- Galińska, E. M., & Zagórski, J. (2013). Brucellosis in humans - Etiology, diagnostics, clinical forms. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*.
- Gee, J. M., Kovach, M. E., Grippe, V. K., Hagijs, S., Walker, J. V., Elzer, P. H., & Roop, R. M. (2004). Role of catalase in the virulence of *Brucella melitensis* in pregnant goats. *Veterinary Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.05.009>
- Gee, J. M., Valderas, M. W., Kovach, M. E., Grippe, V. K., Robertson, G. T., Ng, W. L., ... Roop, R. M. (2005). The *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.2873-2880.2005>
- Giannacopoulos, I., Eliopoulou, M. I., Ziambaras, T., & Papanastasiou, D. A. (2002). Transplacentally Transmitted Congenital Brucellosis Due to *Brucella abortus*. *Journal of Infection*. <https://doi.org/10.1053/jinf.2002.1043>
- Gires, O., Münz, M., Schaffrik, M., Kieu, C., Rauch, J., Ahlemann, M., ... Zeidler, R. (2004). Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4045-8>
- Głowacka, P., Zakowska, D., Naylor, K., Niemcewicz, M., & Bielawska-Drózd, A. (2018). *Brucella* – Virulence factors, pathogenesis and treatment. *Polish Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-029>
- Goel, D., & Bhatnagar, R. (2012). Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects Balb/c mice from virulent *B. abortus* 544. *Molecular Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.02.126>
- Goldstein, J., Hoffman, T., Frasch, C., Lizzio, E. F., Beining, P. R., Hochstein, D., ... Golding, B. (1992). Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines. *Infection and Immunity*.
- Gotuzzo, E., Carrillo, C., & Guerra, J. (1986). An evaluation of diagnostic methods for brucellosis—the value of bone marrow culture. *Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/153.1.122>
- Gupte, S., & Kaur, T. (2016). Diagnosis of Human Brucellosis. *Journal of Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.4172/2329-891x.1000185>
- Gwida, M., Al Dahouk, S., Melzer, F., Rösler, U., Neubauer, H., & Tomaso, H. (2010). Brucellosis - Regionally emerging zoonotic disease? *Croatian Medical Journal*. <https://doi.org/10.3325/cmj.2010.51.289>
- Gwida, M., Neubauer, H., Ilhan, Z., Schmoock, G., Melzer, F., Nöckler, K., ... Al Dahouk, S. (2012). Cross-border molecular tracing of brucellosis in Europe. *Comparative Immunology, Microbiology and*

- Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.012>
- Haag, A. F., Myka, K. K., Arnold, M. F. F., Caro-Hernández, P., & Ferguson, G. P. (2010). Importance of lipopolysaccharide and cyclic  $\beta$ -1,2-glucans in Brucella-mammalian infections. *International Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2010/124509>
- Hadjichristodoulou, C., Voulgaris, P., Toulieres, L., Babalis, T., Manetas, S., Goutziana, G., ... Tselentis, I. (1994). Tolerance of the human brucellosis vaccine and the intradermal reaction test for brucellosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/BF01982185>
- Halling, S. M., Peterson-Burch, B. D., Bricker, B. J., Zuerner, R. L., Qing, Z., Li, L. L., ... Olsen, S. C. (2005). Completion of the genome sequence of Brucella abortus and comparison to the highly similar genomes of Brucella melitensis and Brucella suis. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.187.8.2715-2726.2005>
- Hanci, H., Igan, H., & Uyanik, M. H. (2017). Evaluation of a new and rapid serologic test for detecting brucellosis: Brucella Coombs gel test. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2017.108.112>
- Hill, R. A., & Cook, D. R. (1994). Protein profiles of Brucella suis and Brucella abortus in isoelectric focusing and sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90083-3)
- Hop, H. T., Arayan, L. T., Simborio, H. L., Reyes, A. W. B., Min, W. G., Lee, H. J., ... Kim, S. (2016). An evaluation of ELISA using recombinant Brucella abortus bacterioferritin (Bfr) for bovine brucellosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.01.006>
- Inglis, N. F., Stevenson, K., Hosie, A. H. F., & Sharp, J. M. (1994). Complete sequence of the gene encoding the bacterioferritin subunit of Mycobacterium avium subspecies silvaticum. *Gene*. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90889-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90889-3)
- Iñón De Iannino, N., Briones, G., Tolmasky, M., & Ugalde, R. A. (1998). Molecular cloning and characterization of cgs, the Brucella abortus cyclic  $\beta$ (1-2) glucan synthetase gene: Genetic complementation of Rhizobium meliloti ndvB and Agrobacterium tumefaciens chvB mutants. *Journal of Bacteriology*.
- Kaushik, P., Singh, D. K., Kumar, S. V., Tiwari, A. K., Shukla, G., Dayal, S., & Chaudhuri, P. (2010). Protection of mice against Brucella abortus 544 challenge by vaccination with recombinant OMP28 adjuvanted with CpG oligonucleotides. *Veterinary Research Communications*. <https://doi.org/10.1007/s11259-009-9337-x>
- Keele, B. B., McCord, J. M., & Fridovich, I. (1970). Superoxide dismutase from escherichia coli B. A new manganese-containing enzyme. *Journal of Biological Chemistry*.
- Keleti, G., Feingold, D. S., & Youngner, J. S. (1974). Interferon induction in mice by lipopolysaccharide from Brucella abortus. *Infection and Immunity*.
- Kiliç, S., Ivanov, I. N., Durmaz, R., Bayraktar, M. R., Ayaşlıoğlu, E., Uyanik, M. H., ... Kantardjiev, T. V. (2011). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis genotyping of human Brucella isolates from Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.02538-10>
- Kim, J. A., Sha, Z., & Mayfield, J. E. (2000). Regulation of Brucella abortus catalase. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.3861-3866.2000>
- Kim, J. Y., Sung, S. R., Lee, K., Lee, H. K., Kang, S. Il, Lee, J. J., ... Her, M. (2014). Immunoproteomics of Brucella abortus RB51 as candidate antigens in serological diagnosis of brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.05.009>
- Klade, C. S., Voss, T., Krystek, E., Ahorn, H., Zatloukal, K., Pummer, K., & Adolf, G. R. (2001). Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis. *Proteomics*. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200107\)1:7<890::AID-PROT890>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200107)1:7<890::AID-PROT890>3.0.CO;2-Z)
- Ko, K. Y., Kim, J. W., Her, M., Kang, S. Il, Jung, S. C., Cho, D. H., & Kim, J. Y. (2012). Immunogenic proteins of Brucella abortus to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis. *Veterinary Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.011>
- Köhler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M., & Liautard, J. P. (2002). The analysis of the intramacrophagic virulome of Brucella suis deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.232454299>
- Kolman, S., Maayan, M. C., Gotesman, G., Rozenszajn, L. A., Wolach, B., & Lang, R. (1991). Comparison of the Bactec and lysis concentration methods for recovery of Brucella species from clinical specimens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/BF01975817>
- Lamb, V. L., Jones, L. M., Schurig, G. G., & Berman, D. T. (1979). Enzyme-linked immunosorbent assay for bovine immunoglobulin subclass-specific response to Brucella abortus lipopolysaccharides. *Infection and Immunity*.

- Lamontagne, J., Butler, H., Chaves-Olarte, E., Hunter, J., Schirm, M., Paquet, C., ... Paramithiotis, E. (2007). Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *Journal of Proteome Research*. <https://doi.org/10.1021/pr060636a>
- Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E., & Gorvel, J. P. (2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current Opinion in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.12.003>
- Lee, J. J., Simborio, H. L., Reyes, A. W. B., Kim, D. G., Hop, H. T., Min, W., ... Kim, S. (2014). Proteomic analyses of the time course responses of mice infected with *Brucella abortus* 544 reveal immunogenic antigens. *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12522>
- Lee, J. J., Simborio, H. L., Reyes, A. W. B., Kim, D. G., Hop, H. T., Min, W., ... Kim, S. (2015). Immunoproteomic identification of immunodominant antigens independent of the time of infection in *Brucella abortus* 2308-challenged cattle. *Veterinary Research*. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0147-6>
- Liautard, J. P., Dornard, J., Gross, A., & Köhler, S. (1996). Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiología*.
- Lim, Matthew L., Rickman, L. S. (2004). Brucellosis. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 12(1), 7–14. <https://doi.org/10.1097/01.idc.0000104894.16995.c4>
- Lim, M. L., & Rickman, L. S. (2004). Brucellosis. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. <https://doi.org/10.1097/01.idc.0000104894.16995.c4>
- Lista, F., Reubsæet, F. A. G., De Santis, R., Parchen, R. R., De Jong, A. L., Kieboom, J., ... Paauw, A. (2011). Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiology*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-267>
- Lopez-Merino, A., Asselineau, J., Serre, A., Roux, J., Bascoul, S., & Lacave, C. (1976). Immunization by an insoluble fraction extracted from *Brucella melitensis*: immunological and chemical characterization of the active substances. *Infection and Immunity*.
- Lucero, N. E., Escobar, G. I., Ayala, S. M., Paulo, P. S., & Nielsen, K. (2003). Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05217-0>
- Mahmud, A., Khan, M. T., & Iqbal, A. (2019). Identification of novel drug targets for humans and potential vaccine targets for cattle by subtractive genomic analysis of *Brucella abortus* strain 2308. *Microbial Pathogenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103731>
- Mantecón, M. de los A., Gutiérrez, M. P., Zarzosa, M. del P., Fernández-Lago, L., Colmenero, J. de D., Vizcaíno, N., ... Orduña, A. (2008). Influence of brucellosis history on serological diagnosis and evolution of patients with acute brucellosis. *Journal of Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2008.08.005>
- Mantur, B. G., & Mangalgi, S. S. (2004). Evaluation of conventional Castaneda and lysis centrifugation blood culture techniques for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.9.4327-4328.2004>
- Mantur, B. G., Mulimani, M. S., Bidari, L. H., Akki, A. S., & Tikare, N. V. (2008). Bacteremia is as unpredictable as clinical manifestations in human brucellosis. *International Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2007.09.004>
- Maria-Pilar, J. D. B., Dudal, S., Dornand, J., & Gross, A. (2005). Cellular bioterrorism: How *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. *Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2004.07.010>
- Martirosyan, A., Pérez-Gutierrez, C., Banchereau, R., Dutartre, H., Lecine, P., Dullaers, M., ... Gorvel, J. P. (2012). *Brucella*  $\beta$  1,2 Cyclic Glucan Is an Activator of Human and Mouse Dendritic Cells. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002983>
- Matar, G. M., Khneisser, I. A., & Abdelnoor, A. M. (1996). Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Mayfield, J. E., Bricker, B. J., Godfrey, H., Crosby, R. M., Knight, D. J., Hailing, S. M., ... Tabatabai, L. B. (1988). The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Gene*. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90540-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90540-9)
- McDermott, J., Grace, D., & Zinsstag, J. (2013). Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. *OIE Revue Scientifique et Technique*. <https://doi.org/10.20506/rst.32.1.2197>
- Memish, Z., Mah, M. W., Mahmoud, S. Al, Shaalan, M. Al, & Khan, M. Y. (2000). *Brucella* bacteraemia: Clinical and laboratory observations in 160 patients. *Journal of Infection*. <https://doi.org/10.1053/jinf.1999.0586>
- Mesureur, J., Arend, S., Cellière, B., Courault, P., Cotte-Pattat, P. J., Totty, H., ... Keriel, A. (2018). A MALDI-TOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of *Brucella*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006874>

- Mobley, H. L. T., Island, M. D., & Hausinger, R. P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiological Reviews*.
- Moore, G. R., Mann, S., & Bannister, J. V. (1986). Isolation and properties of the complex nonheme-iron-containing cytochrome b557 (bacterioferritin) from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Inorganic Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0162-0134\(86\)80097-6](https://doi.org/10.1016/0162-0134(86)80097-6)
- Morata, P., Queipo-Ortuño, M. I., Reguera, J. M., Miralles, F., Lopez-Gonzalez, J. J., & Colmenero, J. D. (2001). Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3743-3746.2001>
- Moreno, E., Berman, D. T., & Boettcher, L. A. (1981). Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infection and Immunity*.
- Moreno, Edgardo, & Moriyon, I. (2006). The Genus *Brucella*. In Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, & Erko Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (Third, pp. 315–456). New York: Springer.
- Morgan, W. J. B. (1990). Techniques for the Brucellosis laboratory. *British Veterinary Journal*. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(90\)90017-w](https://doi.org/10.1016/0007-1935(90)90017-w)
- Morris, J. A. (1973). The use of polyacrylamide gel electrophoresis in taxonomy of *Brucella*. *Journal of General Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00221287-76-1-231>
- Navarro, E., Escribano, J., Fernández, J. A., & Solera, J. (2002). Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(02\)00370-X](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(02)00370-X)
- Navarro, Elena, Casao, M. A., & Solera, J. (2004). Diagnosis of human brucellosis using PCR. In *Expert Review of Molecular Diagnostics*. <https://doi.org/10.1586/14737159.4.1.115>
- Nicoletti, P. (1990). Vaccination. In K Nielsen & J. R. Duncan (Eds.), *Animal Brucellosis* (pp. 284–299). Florida: CRC Press.
- Nielsen, Klaus. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00229-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00229-8)
- Nielsen, Klaus, Lin, M., Gall, D., & Jolley, M. (2000). Fluorescence polarization immunoassay: Detection of antibody to *Brucella abortus*. *Methods*. <https://doi.org/10.1006/meth.2000.1038>
- O’Cellaghan, D., Cazevieuille, C., Allardet-Servent, A., Boschiroli, M. L., Bourg, G., Foulongne, V., ... Ramuz, M. (1999). A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01569.x>
- Ojanen, T., Helander, I. M., Haahtela, K., Korhonen, T. K., & Laakso, T. (1993). Outer membrane proteins and lipopolysaccharides in pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Oliveira, S. C., Giambartolomei, G. H., & Cassataro, J. (2011). Confronting the barriers to develop novel vaccines against brucellosis. *Expert Review of Vaccines*. <https://doi.org/10.1586/erv.11.110>
- Orduña, A., Almaraz, A., Prado, A., Gutierrez, M. P., Garcia-Pascual, A., Dueñas, A., ... Torres, A. R. (2000). Evaluation of an immunocapture-agglutination test (brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Otlu, S., Sahin, M., Atabay, H. I., & Unver, A. (2008). Serological investigations of brucellosis in cattle, farmers and veterinarians in the Kars district of Turkey. *Acta Veterinaria Brno*. <https://doi.org/10.2754/avb200877010117>
- Pabuccuoglu, O., Ecemis, T., El, S., Coskun, A., Akcali, S., & Sanlidag, T. (2011). Evaluation of serological tests for diagnosis of brucellosis. *Japanese Journal of Infectious Diseases*.
- Pajuaba, A. C. A. M., Silva, D. A. O., Almeida, K. C., Cunha-Junior, J. P., Pirovani, C. P., Camillo, L. R., & Mineo, J. R. (2012). Immunoproteomics of *Brucella abortus* reveals differential antibody profiles between S19-vaccinated and naturally infected cattle. *Proteomics*. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100185>
- Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., & Tsianos, E. (2005). Review article: Brucellosis. *The New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04905.x>
- Pappas, G., & Papadimitriou, P. (2007). Challenges in *Brucella* bacteraemia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.06.011>
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., & Tsianos, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70382-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6)
- Park, W. Bin, Im, Y. Bin, Shim, S., & Yoo, H. S. (2018). Analysis of protein expression in *Brucella abortus* mutants with different growth rates by two-dimensional gel electrophoresis and LC-MS/MS peptide analysis. *Journal of Veterinary Science*. <https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.2.216>
- Pasquevich, K. A., García Samartino, C., Coria, L. M., Estein, S. M., Zwerdling, A., Ibañez, A. E., ... Cassataro, J. (2010). The Protein Moiety of *Brucella abortus* Outer Membrane Protein 16 Is a New

- Bacterial Pathogen-Associated Molecular Pattern That Activates Dendritic Cells In Vivo, Induces a Th1 Immune Response, and Is a Promising Self-Adjuvanting Vaccine against Systemic . *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902209>
- Pasquevich, K. A., Ibañez, A. E., Coria, L. M., Samartino, C. G., Estein, S. M., Zwerdling, A., ... Cassataro, J. (2011). An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016203>
- Paulsen, I. T., Seshadri, R., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Read, T. D., ... Fraser, C. M. (2002). The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.192319099>
- Percin, D. (2013). Microbiology of *Brucella*. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. <https://doi.org/10.2174/1574891x11308010004>
- Perkins, S. D., Smither, S. J., & Atkins, H. S. (2010). Towards a *Brucella* vaccine for humans. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00211.x>
- Perry, R. D., Lucier, T. S., Sikkema, D. J., & Brubaker, R. R. (1993). Storage reservoirs of hemin and inorganic iron in *Yersinia pestis*. *Infection and Immunity*.
- Pessolani, M. C. V., Smith, D. R., Rivoire, B., Mc Cormick, J., Hefta, S. A., Cole, S. T., & Brennan, P. J. (1994). Purification, characterization, gene sequence, and significance of a bacterioferritin from *Mycobacterium leprae*. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.180.1.319>
- Polt, S. S., Dismukes, W. E., Flint, A., & Schaeffer, J. (1982). Human brucellosis caused by *Brucella canis*. Clinical features and immune response. *Annals of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-97-5-717>
- Poonawala, H., Conner, T. M., & Peaper, D. R. (2018). The brief case: Misidentification of *Brucella melitensis* as *Ochrobactrum anthropi* by matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.00914-17>
- Porte, F., Liautard, J. P., & Köhler, S. (1999). Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infection and Immunity*.
- Probert, W. S., Schrader, K. N., Khuong, N. Y., Bystrom, S. L., & Graves, M. H. (2004). Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1290-1293.2004>
- Purwar, S., Metgud, S. C., Mutnal, M. B., Nagamoti, M. B., & Patil, C. S. (2016). Utility of serological tests in the era of molecular testing for diagnosis of human brucellosis in endemic area with limited resources. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/15525.7311>
- Queipo-Ortuño, M. I., Garcia-Ordoñez, M. A., Colmenero, J. D., & Morata, P. (1999). Hydrogen peroxide improves the efficiency of a peripheral blood PCR assay for diagnosis of human brucellosis. *BioTechniques*. <https://doi.org/10.2144/99272bm06>
- Queipo-Ortuño, Maria Isabel, De Dios Colmenero, J., Macias, M., Bravo, M. J., & Morata, P. (2008). Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. <https://doi.org/10.1128/CVI.00270-07>
- Rasool, O., Freer, E., Moreno, E., & Jarstrand, C. (1992). Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. *Infection and Immunity*.
- Rasooly, G., Olitzki, A. L., & Sulitzeanu, D. (1966). Immunization against *Brucella* with killed vaccines. Immunizing activity in mice of *Brucella* cell walls and of fractions derived from them. *Israel Journal of Medical Sciences*.
- Rauch, J., & Gires, O. (2008). SEREX, proteomex, AMIDA, and beyond: Serological screening technologies for target identification. *Proteomics - Clinical Applications*. <https://doi.org/10.1002/prca.200780064>
- Redkar, R., Rose, S., Bricker, B., & DelVecchio, V. (2001). Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Molecular and Cellular Probes*. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2000.0338>
- Renoux, M., & Tinelli, R. (1973). Phenol-water fractions from smooth *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* immunochemical analysis and biologic behavior. *Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/127.2.139>
- Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M., & Lopez-Goni, I. (1995). Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*.
- ROSE, J. E., & ROEPKE, M. H. (1957). An acidified antigen for detection of nonspecific reactions in the plate-agglutination test for bovine brucellosis. *American Journal of Veterinary Research*.
- Rubach, M. P., Halliday, J. E. B., Cleaveland, S., & Crump, J. A. (2013). Brucellosis in low-income and middle-income countries. *Current Opinion in Infectious Diseases*.

- <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283638104>
- RUIZ CASTANEDA, M. (1961). Laboratory diagnosis of brucellosis in man. *Bulletin of the World Health Organization*, 24(1), 73–84. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13744655>
- Sali, M., De Maio, F., Tarantino, M., Garofolo, G., Tittarelli, M., Sacchini, L., ... Adone, R. (2018). Rapid and safe one-step extraction method for the identification of Brucella strains at genus and species level by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197864>
- Sangari, F. J., Seoane, A., Rodríguez, M. C., Agüero, J., & Lobo, J. M. G. (2007). Characterization of the urease operon of Brucella abortus and assessment of its role in virulence of the bacterium. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.01244-06>
- Sanjuan-Jimenez, R., Colmenero, J. D., & Morata, P. (2017). Lessons learned with molecular methods targeting the BCSP-31 membrane protein for diagnosis of human brucellosis. *Clinica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.03.014>
- Sayan, M., Yumuk, Z., Bilenoglu, O., Erdenlig, S., & Willke, A. (2009). Genotyping of Brucella melitensis by rpoB gene analysis and re-evaluation of conventional serotyping method. *Japanese Journal of Infectious Diseases*.
- Sayin Kutlu, S., Çelikbaş, A., Ergönül, Ö., Kutlu, M., Dokuzoğuz, B., Aksaray, S., & Güvener, E. (2003). The value of immunoglobulin G avidity test for the serological diagnosis of brucellosis. *Mikrobiyoloji Bulteni*.
- Scholz, H. C., Nöckler, K., Lner, C. G., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., ... De, B. K. (2010). Brucella inopinata sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.011148-0>
- Seleem, M. N., Boyle, S. M., & Sriranganathan, N. (2008). Brucella: A pathogen without classic virulence genes. *Veterinary Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.023>
- Seleem, M. N., Boyle, S. M., & Sriranganathan, N. (2010). Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Veterinary Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.021>
- Shemesh, A. A., & Yagupsky, P. (2011). Limitations of the standard agglutination test for detecting patients with brucella melitensis bacteremia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0704>
- Smith, L. D., & Ficht, T. A. (1990). Pathogenesis of brucella. *Critical Reviews in Microbiology*. <https://doi.org/10.3109/10408419009105726>
- Smits, H. L., Abdoel, T. H., Solera, J., Clavijo, E., & Diaz, R. (2003). Immunochromatographic Brucella-Specific Immunoglobulin M and G Lateral Flow Assays for Rapid Serodiagnosis of Human Brucellosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.6.1141-1146.2003>
- Sola-Landa, A., Pizarro-Cerdá, J., Grilló, M. J., Moreno, E., Moriyón, I., Blasco, J. M., ... López-Goñi, I. (1998). A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in Brucella abortus and controls cell invasion and virulence. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00913.x>
- Sowa, B. A., Kelly, K. A., Ficht, T. A., & Adams, L. G. (1992). Virulence associated proteins of Brucella abortus identified by paired two-dimensional gel electrophoretic comparisons of virulent, vaccine and LPS deficient strains. *Applied and Theoretical Electrophoresis : The Official Journal of the International Electrophoresis Society*.
- SPINK, W. W., HALL, J. W., FINSTAD, J., & MALLETT, E. (1962). Immunization with viable Brucella organisms. Results of a safety test in humans. *Bulletin of the World Health Organization*.
- Starr, T., Ng, T. W., Wehrly, T. D., Knodler, L. A., & Celli, J. (2008). Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00718.x>
- Sümer, H., Sümer, Z., Alim, A., Nur, N., & Özdemir, L. (2003). Seroprevalence of Brucella in an elderly population in mid-Anatolia, Turkey. *Journal of Health Population and Nutrition*. <https://doi.org/10.3329/jhpn.v21i2.201>
- Tabatabai, L. B., & Pugh, G. W. (1994). Modulation of immune responses in Balb/c mice vaccinated with Brucella abortus CuZn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. *Vaccine*. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(94\)90035-3](https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90035-3)
- Teixeira-Gomes, A. P., Cloeckaert, A., Bézard, G., Bowden, R. A., Dubray, G., & Zygmunt, M. S. (1997). Identification and characterization of Brucella ovis immunogenic proteins using two-dimensional electrophoresis and immunoblotting. In *Electrophoresis*. <https://doi.org/10.1002/elps.1150180824>
- Teixeira-Gomes, A. P., Cloeckaert, A., Bézard, G., Dubray, G., & Zygmunt, M. S. (1997). Mapping and identification of Brucella melitensis proteins by two-dimensional electrophoresis and microsequencing. *Electrophoresis*. <https://doi.org/10.1002/elps.1150180128>
- Teixeira-Gomes, A. P., Cloeckaert, A., & Zygmunt, M. S. (2000). Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in Brucella melitensis. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.5.2954-2961.2000>



- Tiwari, S., Kumar, A., Thavaselvam, D., Mangalgi, S., Rathod, V., Prakash, A., ... Sathyaseelan, K. (2013). Development and comparative evaluation of a plate enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant outer membrane antigens Omp28 and Omp31 for diagnosis of human brucellosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. <https://doi.org/10.1128/CVI.00111-13>
- Türkiye. (2011). Yıllara Göre Brusella Tarama Ve Pozitif Vaka Sayıları. Retrieved from <https://www.tarimorman.gov.tr/Konu/1016/Yillara-Gore-Brusella-Tarama-ve-Pozitif-Vaka-Sayilari>
- Türkiye. (2017). Bruselloz İstatistik Verileri. Retrieved from <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/zoonotikvektorel-bruselloz/istatistik>
- Ulu Kilic, A., Metan, G., & Alp, E. (2013). Clinical Presentations and Diagnosis of Brucellosis. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. <https://doi.org/10.2174/1574891x11308010007>
- Unver, A., Erdogan, H. M., Atabay, H. I., Sahin, M., & Celebi, O. (2006). Isolation, identification, and molecular characterization of *Brucella melitensis* from aborted sheep fetuses in Kars, Turkey. *Revue de Medecine Veterinaire*.
- VERSHILOVA, P. A. (1961). The use of live vaccine for vaccination of human beings against brucellosis in the USSR. *Bulletin of the World Health Organization*.
- Wagner, M. A., Eschenbrenner, M., Horn, T. A., Kraycer, J. A., Mujer, C. V., Hagijs, S., ... DelVecchio, V. G. (2002). Global analysis of the *Brucella melitensis* proteome: Identification of proteins expressed in laboratory grown culture. *Proteomics*. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200208\)2:8<1047::AID-PROT1047>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200208)2:8<1047::AID-PROT1047>3.0.CO;2-8)
- Wareth, G., Eravci, M., Weise, C., Roesler, U., Melzer, F., Sprague, L. D., ... Murugaiyan, J. (2016). Comprehensive identification of immunodominant proteins of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* using antibodies in the sera from naturally infected hosts. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms17050659>
- Watarai, M., Makino, S. I., Fujii, Y., Okamoto, K., & Shirahata, T. (2002). Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cellular Microbiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00195.x>
- Winter, A. J., Schurig, G. G., Boyle, S. M., Sriranganathan, N., Bevins, J. S., Enright, F. M., ... Kopec, J. D. (1996). Protection of BALB/c mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitensis* and *Brucella suis* biovar 4. *American Journal of Veterinary Research*.
- World Health Organization. (1997). *Fact Sheet N173*. Geneva.
- Yagupsky, P. (1999). Detection of brucellae in blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Yagupsky, Pablo, & Baron, E. J. (2005). Laboratory exposures to brucellae and implications for bioterrorism. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid1108.041197>
- Yagupsky, Pablo, Morata, P., & Colmenero, J. D. (2019). Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1), e00073-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-19>
- Yang, Y., Wang, L., Yin, J., Wang, X., Cheng, S., Lang, X., ... Zhang, R. (2011). Immunoproteomic analysis of *Brucella melitensis* and identification of a new immunogenic candidate protein for the development of brucellosis subunit vaccine. *Molecular Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.08.009>
- Young, E. J. (1983). Human brucellosis. *Reviews of Infectious Diseases*, 5(5), 821–842. <https://doi.org/10.1093/clinids/5.5.821>
- Young, E. J. (1991). Serologic diagnosis of human brucellosis: Analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. *Reviews of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/clinids/13.3.359>
- Young, E. J., Borchert, M., Kretzer, F. L., & Musher, D. M. (1985). Phagocytosis and killing of *Brucella* by human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/151.4.682>
- Yüce A, A. Ç. S. (2006). Türkiye’de Bruselloz: Genel Bakış. *Klinik Dergisi*, 19(3), 87–97.
- Yumuk, Z., & O’Callaghan, D. (2012). Brucellosis in Turkey - an overview. *International Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.12.011>
- Zai, X., Yang, Q., Yin, Y., Li, R., Qian, M., Zhao, T., ... Chen, W. (2017). Relative quantitative proteomic analysis of *Brucella abortus* reveals metabolic adaptation to multiple environmental stresses. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02347>
- Zerva, L., Bourantas, K., Mitka, S., Kansouzidou, A., & Legakis, N. J. (2001). Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1661-1664.2001>
- Zhao, Z. P., Yan, F., Ji, W. H., Luo, D. Y., Liu, X., Xing, L., ... Wang, X. L. (2011). Identification of immunoreactive proteins of *Brucella melitensis* by immunoproteomics. *Science China Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s11427-011-4218-2>

## 8. ÖZGEÇMİŞ

<b><u>Kişisel Bilgiler</u></b>	
Adı Soyadı	Hüseyin UZUNER
Doğum Yeri ve Tarihi	İzmit, 05/08/1986
İletişim Adresi	Donanma Mah. Anafartalar Cad. Yamaçevler Sitesi No:56 A Blok Daire:5 41660 Gölcük/Kocaeli
Telefon	05447392951
E-posta	huseyin_uzuner@yahoo.com.tr
Eğitim Bilgileri (Tarih Sırasına Göre)	2000-2004: Gölcük İhsaniye Anadolu Lisesi (Tabancı dil ağırlıklı) 2005-2010: Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (1 yılı İngilizce hazırlık programı) 2010-2013: Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Yüksek Lisans) 2013-2020: Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Doktora)
Mesleki Deneyim/ İşyeri Bilgileri	2012-2020: Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (Araştırma Görevlisi)
Yabancı Dil Bilgileri	YÖKDİL:92,5
Üye Olduğu Mesleki / Sosyal Kuruluşlar	Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği
<b><u>Bilimsel Etkinlikler</u></b>	
Makaleler	1: Kucukoglu V, <b>Uzuner H</b> , Kenar H, Karadenizli A. In vitro antibacterial activity of ciprofloxacin loaded chitosan microparticles and their effects on human lung epithelial cells. Int J Pharm. 2019 Oct 5;569:118578. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118578. Epub 2019 Jul 27. 2: <b>Uzuner H</b> , Karadenizli A, Er DK, Osmani A. Investigation of the efficacy of alcohol-based solutions on adenovirus serotypes 8, 19 and 37, common causes of epidemic keratoconjunctivitis, after an adenovirus outbreak in hospital. J Hosp Infect. 2018 Nov;100(3):e30-e36. doi: 10.1016/j.jhin.2018.05.011. Epub 2018 May 21.

	<p>3: Yamanoglu R, Efendi E, Kolayli F, <b>Uzuner H</b>, Daoud I. Production and mechanical properties of Ti-5Al-2.5Fe-xCu alloys for biomedical applications. <i>Biomed Mater.</i> 2018 Jan 30;13(2):025013. doi: 10.1088/1748-605X/aa957d.</p> <p>4: Kasap M, Karadenizli A, Akpınar G, <b>Uzuner H</b>, Ayimugu A, Karaosmanoğlu K, Er DK. Comparative Analysis of Proteome Patterns of <i>Francisella tularensis</i> Isolates from Patients and the Environment. <i>Curr Microbiol.</i> 2017 Feb;74(2):230-238. doi: 10.1007/s00284-016-1178-6. Epub 2016 Dec 19.</p> <p>5: Er DK, Dündar D, <b>Uzuner H</b>, Osmani A. Relationship between phylogenetic groups, antibiotic resistance and patient characteristics in terms of adhesin genes in cystitis and pyelonephritis isolates of <i>Escherichia coli</i>. <i>Microb Pathog.</i> 2015 Dec;89:188-94. doi: 10.1016/j.micpath.2015.10.014. Epub 2015 Oct 28.</p> <p>6: Eriş E, Yüksel N, Pirhan D, Karadenizli A, Aslan M, Gacar G, Erman G, Subaş C, <b>Uzuner H</b>, Yldz DK, Karaöz E. Evaluation of Effect of Topical Tacrolimus Treatment on Herpetic Stromal Keratitis in a Rat Model. <i>Eye Contact Lens.</i> 2016 May;42(3):163-70. doi: 10.1097/ICL.000000000000162.</p> <p>7: Er D. K. , <b>Uzuner H.</b>, Genç S., Keçeli S. A. "Germ Tüp Testinin Müeller Hinton Agar ve Serumda Karşılaştırılması", Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, cilt.1, ss.30-34, 2015</p> <p>8: Tamer GS, Dündar D, <b>Uzuner H</b>, Baydemir C. Evaluation of immunochromatographic test for the detection of antibodies against <i>Echinococcus granulosus</i>. <i>Med Sci Monit.</i> 2015 Apr 29;21:1219-22. doi: 10.12659/MSM.893155.</p>
Projeler	<p><b>1:</b> Brusella Bakteriyofajının Brusella Bakteri Kültüründe Litik Etkisinin Zaman Eğrisi Üzerinden Araştırılması ve Litik Etkinin Pik Seviyeye Ulaştığı Zamanın Belirlenmesi KARAGÜL M.S.(YÜRÜTÜCÜ), <b>UZUNER H.</b>, KARADENİZLİ A. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, 2019 - Devam Ediyor</p> <p><b>2:</b> Hibridoma Teknolojisi İle Gfp ve Beta-Aktin Proteinlerine Karşı Monoklonal Antikor Üretilmesi KARADENİZLİ A. (YÜRÜTÜCÜ) , KASAP M., <b>UZUNER H.</b>, SARUHAN M., OKUMUŞ E. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, 2019 - Devam Ediyor</p> <p><b>3:</b> Hastane Enfeksiyon Etkeni Olan Vankomisine Dirençli Enterokokların Saptanmasında Yeni Bir Hızlı Tanı Yönteminin Geliştirilmesi KARADENİZLİ A. (YÜRÜTÜCÜ) , <b>UZUNER H.</b> , MAJETİC A. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, 2017 – 2019</p>

	<p><b>4:</b> Geyve Zeytin Yaprağı Ve Propolisin Herpes Simplex Virus Tip 1 Üzerindeki Antiviral Etkinliğinin Belirlenmesi ve Asiklovir İle Karşılaştırılması</p> <p>ALTINDIŞ M. (YÜRÜTÜCÜ), ARSLAN F.G., KARADENİZLİ A., <b>UZUNER H.</b></p> <p>Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, 2016 – 2017</p> <p><b>5:</b> Antibakteriyel Özellikleri Geliştirilmiş Titanyum Alaşımlarının Toz Metalurjisi ile Üretimi</p> <p>YAMANOĞLU R. (YÜRÜTÜCÜ) , KOLAYLI F. , EFENDİ E., <b>UZUNER H.</b></p> <p>Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, 2015 – 2017</p> <p><b>6:</b> Üriner Sistem Enfeksiyonu Etkeni Olan <i>Escherchia coli</i> İzolatlarında, ST131 Sekans Tipinin ve Alt Klonlarının Belirlenmesi</p> <p>ER D. K. (YÜRÜTÜCÜ) , <b>UZUNER H.</b> , DÜNDAR D.</p> <p>TÜBİTAK Projesi, 2015 – 2016</p> <p><b>7:</b> Kocaeli Üniversitesinde Troponin I ve CK MB tanı kitlerinin üretilmesi</p> <p>KARADENİZLİ A. (Yürütücü), KASAP M., AKPINAR G., <b>UZUNER H.</b>, ER D.K., GENÇ S.</p> <p>CB Strateji ve Bütçe Başkanlığı (Kalkınma Bakanlığı) Projesi, 2013 - 2015</p>
Bildiriler	<p><b>1:</b> YAMANOĞLU R. , Khoshnaw F., KOLAYLI F. , <b>UZUNER H</b> Antibacterial Properties of Stainless Steel Coated on Ti6Al4V Alloy. International Conference on Medical and Biosciences, Beijing, Çin, 15 - 16 Haziran 2019 (Uluslararası)</p> <p><b>2:</b> ÖZASLAN V., <b>UZUNER H.</b> , KARADENİZLİ A. , KENAR H. Diyabetik Ayak İnfeksiyonlarının Antimikrobiyal Tedavisinde Kullanılabilecek Siprofloksasin ve Amfoterisin B Yüklü Kitosan Mikropartiküller. V. Ulusal Diyabetik Ayak İnfeksiyonları Simpozyumu - Uluslararası Katılımlı, İzmir, Türkiye, 3 - 06 May 2018, ss.66 (Uluslararası Katılımlı)</p> <p><b>3:</b> YAZICI ÖZÇELİK E. , <b>UZUNER H.</b> , ÖZDEMİR İ., KARADENİZLİ A. STX1 and STX2 frequency in patients prediagnosed with haemolytic uremic syndrome in Turkey. 10th Balkan Congress of Microbiology, 16 - 18 November 2017 (Uluslararası)</p> <p><b>4:</b> ALTINDIŞ M., ASLAN F. G. , <b>UZUNER H.</b> , KARADENİZLİ A.</p> <p>Geyve Zeytin Yaprağı Ve Propolisin Herpes Simplex Virus Tip 1 Üzerindeki Antiviral Etkinliğinin Belirlenmesi ve Asiklovir İle</p>

Karşılaştırılması. 7. Tepecik Enfeksiyon Günleri BUHASDER Kongresi, Türkiye, 1 - 05 November 2017 (Ulusal)

**5:** ER D. K. , DÜNDAR D. , **UZUNER H.** ST131 Escherichia coli And Its H30 And H30-RX Subclones In Turkey. 7th Congress Of European Microbiologists, İspanya, 9 - 13 July 2017

**6:** ÖZASLAN V., **UZUNER H.** , KARADENİZLİ A. , YILMAZ ÖZDOĞAN C., KENAR H. Antibacterial activity of ciprofloxacin loaded chitosan microparticles against E. coli and P. aeruginosa and their cytotoxic effect on human lung epithelial cells 22nd International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED 2017), 12 - 14 May 2017

**7:** **UZUNER H.** , KARADENİZLİ A. , ER D. K. , OSMANİ A. Epidemik Keratokonjunktivit Etkeni Adenovirüs19 Ve 37 Üzerine Antiseptik Kombinasyonlarının Etkisinin Araştırılması. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 16 - 20 Kasım 2016 (Ulusal)

**8:** TAŞTAN R. , **UZUNER H.** , KARADENİZLİ A. Hayvancılık Sektöründe Çalışanların Zoonotik Hastalık Riskleri ve İş Güvenliğine Tek Sağlık Yaklaşımı. 1. Uluslararası İş Güvenliği ve Çalışan Sağlığı Kongresi, Kocaeli, Türkiye, 6 - 07 May 2016 (Uluslararası)

**9:** ER D. K. , **UZUNER H.** , GENÇ S., KEÇELİ S. A. , OTAĞ F. Evaluation of Mueller-Hinton Agar for Germ Tube Test. 7th Trends in Medical Mycology, Lizbon, Portekiz, 09 October 2015, ss.1 (Uluslararası)

**10:** KARADENİZLİ A. , KASAP M. , ER D. K. , AYIMUGU A., KARAOSMANOĞLU K., AKPINAR G. , **UZUNER H.** Proteomic analysis of Francisella tularensis subspecies holarctica isolates from patients and environment in tularemia epidemics. 8th International Conference on Tularemia, 28 September - 01 October 2015 (Uluslararası)

**11:** DUYMAZ F. Z. , GENÇ S., OSMANİ A., **UZUNER H.** , DÜNDAR D. Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus Suşlarının Vankomisin Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarında Yıllar İçindeki Değişim. 36. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Türkiye, 12 - 16 November 2014 (Ulusal)

**12:** SÖNMEZ TAMER Z. G. , DÜNDAR D. , BAYDEMİR C. , **UZUNER H.** Kistik Ekinokokkoz Tanısında İmmünokromatografik Testin Araştırılması. 7. Ulusal Hidatidoloji Kongresi, Türkiye, 6 - 08 September 2014 (Ulusal)

**13:** ER D. K. , DÜNDAR D. , **UZUNER H.** , OSMANİ A. Relationship between phylogenetic groups, antibiotic resistance and patient characteristics in terms of adhesin genes in cystitis and pyelonephritis isolates of Escherichia coli. 24th European Congress of

	<p>Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, İspanya, 10 - 13 Mayıs 2014, ss.11-15 (Uluslararası)</p> <p><b>14:</b> KARADENİZLİ A. , GÜRBÜZ Y. S. , ÖZDEMİR L., ER D. K. , <b>UZUNER H.</b> , ERÇİN M. C. Detection of Francisella tularensis DNA in paraffin embedded appendix tissue samples by RT TaqMan PCR. International Symposium on Francisella Tularensis and Tularemia, Nevşehir, Türkiye, 19 - 22 Haziran 2013 (Uluslararası)</p> <p><b>15:</b> KARADENİZLİ A. , Özdemir L., ER D. K. , <b>UZUNER H.</b> Survival of Francisella tularensis in Amies Agar with charcoal under different temperature conditions. International Symposium on Francisella tularensis and Tularemia, Nevşehir, Türkiye, 19 June 2013, ss.26 (Uluslararası)</p> <p><b>16:</b> ÖZDEMİR L., KARADENİZLİ A. , <b>UZUNER H.</b> , ER D. K. Türkiye’de ilk kez besi hayvanlarında ve bakıcılarında çiftlik hayvanları ile ilişkili metisiline dirençli Staphylococcus aureus (LA – MRSA) kolonizasyonunun araştırılması. 35.Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Aydın, Türkiye, 03 November 2012, ss.156 (Ulusal)</p> <p><b>17:</b> KARADENİZLİ A. , TÜRKER G. , <b>UZUNER H.</b> , ER D. K. , KOLAYLI F. , ORUÇ M., ve ark. Yenidoğan yoğun bakım ünitesinde ortaya çıkan konjunktivit salgısında Adenovirus araştırılması ve moleküler yöntemle tiplendirilmesi. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Aydın, Türkiye, 03 November 2012, ss.155 (Ulusal)</p> <p><b>18:</b> ERGİN Ç., KARADENİZLİ A. , OTKUN M., AKAYA Y., SATILMIŞ KİRİŞ Ö., AKÇALI A., <b>UZUNER H.</b> Francisella tularensis antikorları pozitif olan hasta serum örneklerinde Bartonella henselae antikorlarının araştırılması 7. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, Türkiye, 5 - 08 Haziran 2012 (Ulusal)</p> <p><b>19:</b> <b>UZUNER H.</b> , DÜNDAR D. Pseudomonas aeruginosa Suşlarının Bazı Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesinde Vitek 2 nin Performansı. I. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Türkiye, 12 - 16 November 2011 (Ulusal)</p> <p><b>20:</b> DÜNDAR D. , SÖNMEZ TAMER Z. G. , <b>UZUNER H.</b> Proteus Cinsi Bakterilerde Imipenem Direnci. I. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Türkiye, 12 - 16 November 2011 (Ulusal)</p> <p><b>21:</b> SÖNMEZ TAMER Z. G. , DÜNDAR D. , <b>UZUNER H.</b> Kistik ekinokokkozis tanısında immünokromatografik testin yeri var mı. I. Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 12 - 16 Kasım 2011 (Ulusal).</p>
Ödüller	<p>1: BUHASDER 2017 Kongresi Poster Sunumu Birincilik Ödülü Bulaşıcı Hastalıkları Önleme Derneği, Kasım 2017</p> <p>ALTINDIŞ M., ASLAN F. G. , <b>UZUNER H.</b> , KARADENİZLİ A.</p>

Kitap Bölümleri	<p><b>1: UZUNER H. , KARADENİZLİ A.</b> “Adenovirüsler, Parvovirüsler, Poksvirüsler” “Temel, Klinik ve Tanısal Tıbbi Viroloji”, Editör: Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ, Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR, Doç. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU, Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara, ss.135-154, 2018 (Tanınmış Uluslararası Yayınevi)</p> <p><b>2: UZUNER H. , KARADENİZLİ A.</b> “Bunyavirüsler” “Temel, Klinik ve Tanısal Tıbbi Viroloji”, Editör: Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ, Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR, Doç. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU, Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara, ss.291-302, 2018 (Tanınmış Uluslararası Yayınevi)</p>
-----------------	--



## 9. EKLER

### EK-1: Etik Kurul Onayı



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
Tıp Fakültesi Dekanlığı



Sayı : 80418770-010.99/6530  
Konu : Araştırma Projesi Başlığı  
Değişikliği Hk.

23/01/2020

Sayın Prof.Dr. Aynur KARADENİZLİ

İlgi : 08/01/2020 tarihli, 2045 sayılı ve "Araştırma Projesi Başlığı Değişikliği Hk." konulu yazı

Sorumlu araştırmacısı olduğunuz 2019/179 numaralı projeniz için değişiklik talebiniz için yapmış olduğunuz başvurunuz etik kurulumuzun 22 Ocak 2020 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve aşağıdaki karar alınmıştır.

Dr. Öğr. Üyesi Ashhan AKPINAR  
Raportör

GOKAEK-2020/1.01 2019/176 proje numaralı "Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden izole edilen Brucella izolatlarında ortak immünojenik antijenlerin Serolojik Proteom Analizi (SERPA) kullanılarak araştırılması" başlıklı proje için araştırma protokolünde bir değişiklik yapılmamakla birlikte yalnızca araştırma başlığının değiştirilmesi talebi değerlendirilmiş,

Araştırma başlığının "Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden izole edilen Brucella melitensis izolatlarından elde edilen ortak immünodominant proteinlerin immüno proteomik yöntemle araştırılması" olarak değiştirilmesi uygun bulunmuştur.

23/01/2020 Sek.

: H.S.KIROĞLU





T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR  
ETİK KURULU



Etik Kurul Bilgileri	Adı	Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	Adres	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Ara Kat 41380 Umuttepe Yerleşkesi /KOCAELİ
	Telefon	0262 303 74 50
	Faks	0262 303 74 63
	E-Posta	gokaetikkurul@kocaeli.edu.tr

Başvuru Bilgileri	Araştırmanın Adı	Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden izole edilen Brusella izolatlarından elde edilen ortak immünodominant proteinlerin Serolojik Proteom Analizi (SERPA) kullanılarak araştırılması			
	Araştırma Proje Numarası	KÜ GOKAEK 2019/176			
	Sorumlu Araştırmacı Unvanı/Adı/Soyadı	Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ			
	Sorumlu Araştırmacının Uzmanlık Alanı	Tıbbi Mikrobiyoloji			
	Araştırma Merkezi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD			
	Destekleyici	KÜ BAPB			
	Araştırmanın Türü	Doktora Tezi			
	Araştırmaya Katılan Merkezler	Tek Merkezli <input checked="" type="checkbox"/>	Çok Merkezli <input type="checkbox"/>	Ulusal <input checked="" type="checkbox"/>	Uluslararası <input type="checkbox"/>

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Var	Yok	Açıklama
	Başvuru Dilekçesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Başvuru Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırmanın Türü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Kan, İdrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle yapılacak araştırma
	Araştırma Protokolü	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Kullanılacak Form Örnekleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Aydınlatılmış Onam Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırma Bütçesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Literatür Örneği	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Taahhütname	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Biyolojik Materyal Transfer Anlaşması	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	İzin Belgeleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Başhekimlik Onayı	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Özgeçmişler	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Değişiklik Bilgi Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Proje Sonuç Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Diğer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu

Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
Onay formu	08.05.2019/KOGOEK01.4	1/2

Karar Bilgileri	Karar No: KÜ GOKAEK 2019/10.13	Proje No: 2019/176	Tarih : 19/06/2019
	Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik açıdan, <input checked="" type="checkbox"/> Uygun bulunmuştur. <input type="checkbox"/> Eksikliklerin tamamlanması koşulu ile uygun bulunmuştur.* <input type="checkbox"/> Uygun bulunmamıştır.*		

Dayanakları	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi; İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi
-------------	--

#### Etik Kurul Üyeleri

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Toplantıda Bulunma		İmza
Prof. Dr. Kadir Babaoğlu Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İ. Erdem Okay Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	izinli
Prof. Dr. Haluk Emre Özel Üye	Restoratif Diş Tedavisi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Özlem Yıldız Gündoğdu Üye	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	izinli
Prof. Dr. Canan Baydemir Üye	Biyostatistik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yusufhan Yazır Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Semil Selcen Göçmez Üye	Farmakoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ceyla Eraldemir Üye	Biyokimya	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğretim Üyesi Aslıhan Akpınar Raportör	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

\* Gerekeçe ve öneriler:

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
	Onay formu	08.05.2019/KOGOEK01.4	2/2

**EK 2. LC-MS/MS sonucunda elde edilen proteinlerin tahmin edilen lokasyonları**

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_004684703.1	MULTISPECIES: thiazole synthase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965756.1	MULTISPECIES: 3-isopropylmalate dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966226.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002971281.1	MULTISPECIES: TldD/PmbA family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965058.1	MULTISPECIES: inorganic diphosphatase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963604.1	MULTISPECIES: CvpA family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963714.1	MULTISPECIES: L,D-transpeptidase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004684011.1	MULTISPECIES: SCO family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002969323.1	MULTISPECIES: 5-oxoprolinase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964873.1	MULTISPECIES: GntR family transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002969412.1	MULTISPECIES: twin-arginine translocase subunit TatB [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964719.1	MULTISPECIES: porin family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966764.1	MULTISPECIES: serine hydroxymethyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964648.1	MULTISPECIES: ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963625.1	MULTISPECIES: cytochrome c oxidase subunit II [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002969568.1	MULTISPECIES: pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964363.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S10 [Rhizobiales]	Hücre membranı
WP_002967351.1	MULTISPECIES: nitrate reductase subunit beta [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002963611.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S6 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964350.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L5 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964281.1	MULTISPECIES: UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)glucosamine N-acyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_050590265.1	trigger factor [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_002964874.1	MULTISPECIES: MarR family transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965461.1	MULTISPECIES: thiamine phosphate synthase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965793.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966095.1	MULTISPECIES: ABC transporter permease subunit [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966847.1	MULTISPECIES: RIP metalloprotease RseP [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964265.1	MULTISPECIES: preprotein translocase subunit SecG [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966660.1	MULTISPECIES: metal ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966116.1	MULTISPECIES: N-acetylglucosamine kinase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965941.1	MULTISPECIES: Fe(3+) ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002965908.1	MULTISPECIES: BA14K family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964883.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963986.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965405.1	MULTISPECIES: LPS export ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004686684.1	MULTISPECIES: YbaB/EbfC family nucleoid-associated protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964319.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004686396.1	MULTISPECIES: protein translocase subunit SecD [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963797.1	MULTISPECIES: orotate phosphoribosyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963618.1	MULTISPECIES: beta-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965068.1	MULTISPECIES: response regulator transcription factor [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964973.1	MULTISPECIES: GNAT family N-acetyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966106.1	MULTISPECIES: alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002964604.1	MULTISPECIES: LysR family transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963836.1	MULTISPECIES: nucleoside-diphosphate kinase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965096.1	MULTISPECIES: acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit alpha [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964539.1	MULTISPECIES: undecaprenyldiphospho-muramoylpentapeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002967109.1	MULTISPECIES: bifunctional hydroxymethylpyrimidine kinase/phosphomethylpyrimidine kinase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966234.1	MULTISPECIES: catalase [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002964386.1	MULTISPECIES: DUF192 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004681889.1	MULTISPECIES: DsbA family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963432.1	MULTISPECIES: urease subunit gamma [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963945.1	MULTISPECIES: NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoI [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004683764.1	MULTISPECIES: STAS domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964835.1	MULTISPECIES: DUF1036 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963614.1	MULTISPECIES: 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964823.1	MULTISPECIES: DUF1013 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964530.1	MULTISPECIES: outer membrane protein assembly factor BamD [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964875.1	MULTISPECIES: F0F1 ATP synthase subunit epsilon [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964287.1	MULTISPECIES: UMP kinase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964425.1	MULTISPECIES: cobalamin biosynthesis protein CobW [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002971443.1	MULTISPECIES: PAS domain-containing sensor histidine kinase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964310.1	MULTISPECIES: NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase QueF [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002963689.1	MULTISPECIES: mannose-1-phosphate guanylyltransferase/mannose-6-phosphate isomerase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964837.1	MULTISPECIES: DUF2312 domain-containing protein [ <i>Brucellaceae</i> ]	Hücre membranı
WP_002964393.1	MULTISPECIES: class II fructose-bisphosphatase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965120.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002967737.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L30 [ <i>Brucellaceae</i> ]	Hücre membranı
WP_002971893.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966970.1	MULTISPECIES: fructose-6-phosphate aldolase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_024767881.1	propionyl-CoA synthetase [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Sitoplazma
WP_002969420.1	MULTISPECIES: MerR family transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004683856.1	MULTISPECIES: glutamate--tRNA ligase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004685983.1	MULTISPECIES: MFS transporter [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964239.1	MULTISPECIES: RNA chaperone Hfq [ <i>Brucellaceae</i> ]	Hücre membranı
WP_004686688.1	isovaleryl-CoA dehydrogenase [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_002964357.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L22 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966390.1	MULTISPECIES: class II fumarate hydratase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965226.1	MULTISPECIES: RNA-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963962.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S4 [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965875.1	MULTISPECIES: glutamine synthetase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966966.1	MULTISPECIES: ATP-binding cassette domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963946.1	MULTISPECIES: NADH-quinone oxidoreductase subunit J [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964060.1	MULTISPECIES: glycosyltransferase family 2 protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964699.1	MULTISPECIES: response regulator transcription factor [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_006136447.1	MULTISPECIES: Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter NhaA [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964802.1	MULTISPECIES: peptidoglycan -binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_005967531.1	MULTISPECIES: dihydroxyacetone kinase subunit L [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002971872.1	MULTISPECIES: cobaltochelataze subunit CobS [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002967278.1	MULTISPECIES: amino acid ABC transporter permease [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963937.1	MULTISPECIES: NADH-quinone oxidoreductase subunit A [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966740.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964374.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L11 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_011069144.1	MULTISPECIES: virulence factor family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_024767964.1	citrate (Si)-synthase [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_004684264.1	MULTISPECIES: F0F1 ATP synthase subunit alpha [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002970710.1	MULTISPECIES: ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963608.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L9 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004681235.1	MULTISPECIES: SPFH/Band 7/PHB domain protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964366.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S12 [Rhizobiales]	Hücre membranı
WP_002963538.1	MULTISPECIES: tetratricopeptide repeat protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_049751145.1	cob(I)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_002972182.1	MULTISPECIES: MFS transporter [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_005968973.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Fimbrium.
WP_004686514.1	LPS-assembly protein LptD [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_004683012.1	MULTISPECIES: F0F1 ATP synthase subunit B [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_024767999.1	ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002965411.1	MULTISPECIES: Hsp20 family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004686380.1	MULTISPECIES: PLP-dependent aminotransferase family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964625.1	MULTISPECIES: MarR family transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_005970312.1	MULTISPECIES: acetyl/propionyl/methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002968080.1	MULTISPECIES: iron-sulfur cluster carrier protein ApbC [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963949.1	MULTISPECIES: NADH-quinone oxidoreductase subunit M [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966579.1	MULTISPECIES: plasmid partitioning protein RepA [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966550.1	MULTISPECIES: SDR family oxidoreductase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964814.1	MULTISPECIES: transketolase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004686268.1	MULTISPECIES: ATP-dependent chaperone ClpB [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964773.1	MULTISPECIES: adenylosuccinate synthase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964236.1	MULTISPECIES: ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963775.1	MULTISPECIES: thiol:disulfide oxidoreductase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004683649.1	MULTISPECIES: glutathione S-transferase family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004683866.1	MULTISPECIES: outer membrane protein assembly factor BamA [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963675.1	MULTISPECIES: LPS biosynthesis N-formyltransferase WbkC [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004686562.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965459.1	MULTISPECIES: thiaminase II [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002969491.1	MULTISPECIES: ubiquinone biosynthesis hydroxylase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002967092.1	MULTISPECIES: organic solvent tolerance protein OstA [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966069.1	MULTISPECIES: bacterioferritin [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964513.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı



<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_004681614.1	MULTISPECIES: nitrate reductase subunit alpha [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002965379.1	MULTISPECIES: S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase/class III alcohol dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964337.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L17 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965535.1	MULTISPECIES: DUF2948 family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964509.1	MULTISPECIES: DUF2853 family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964353.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S17 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963613.1	MULTISPECIES: ACP S-malonyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_080682825.1	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Sitoplazma
WP_002964492.1	MULTISPECIES: TetR/AcrR family transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002967308.1	MULTISPECIES: cytochrome bd oxidase subunit I [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964899.1	MULTISPECIES: LemA family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963544.1	MULTISPECIES: F0F1 ATP synthase subunit C [ <i>Brucellaceae</i> ]	Hücre membranı
WP_002964289.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S2 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002970991.1	MULTISPECIES: signal peptidase I [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964749.1	MULTISPECIES: response regulator [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964272.1	MULTISPECIES: transcriptional repressor LexA [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002967115.1	MULTISPECIES: sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter ATP-binding protein UgpC [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966591.1	MULTISPECIES: TonB-dependent receptor [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965062.1	MULTISPECIES: cell division ATP-binding protein FtsE [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963907.1	MULTISPECIES: transcription antitermination factor NusB [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964216.1	MULTISPECIES: acriflavine resistance protein B [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965745.1	MULTISPECIES: alkene reductase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_024768002.1	acid-activated Periplazmaic chaperone HdeA [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_088835781.1	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase HisB [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Sitoplazma
WP_002964352.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L14 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964901.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S16 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002970964.1	MULTISPECIES: LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964943.1	MULTISPECIES: phosphoenolpyruvate--protein phosphotransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965156.1	MULTISPECIES: response regulator transcription factor [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004686442.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963851.1	MULTISPECIES: DUF992 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964101.1	MULTISPECIES: glycosyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002967281.1	MULTISPECIES: sn-glycerol-3-phosphate import ATP-binding protein UgpC [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966386.1	MULTISPECIES: co-chaperone GroES [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965489.1	MULTISPECIES: SDR family oxidoreductase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964601.1	MULTISPECIES: pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965053.1	MULTISPECIES: histidinol-phosphate transaminase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004684290.1	MULTISPECIES: NAD-glutamate dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966228.1	MULTISPECIES: glutamine-hydrolyzing GMP synthase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966967.1	MULTISPECIES: high-affinity branched-chain amino acid ABC transporter permease LivM [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964375.1	MULTISPECIES: transcription termination/antitermination protein NusG [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964647.1	MULTISPECIES: cytochrome b [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964178.1	MULTISPECIES: acetyl-CoA hydrolase/transferase family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002964332.1	MULTISPECIES: recombinase RecA [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964627.1	MULTISPECIES: HAMP domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966849.1	MULTISPECIES: DUF1849 family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964975.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L19 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002967157.1	MULTISPECIES: isochorismatase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964824.1	MULTISPECIES: NAD(P)H quinone oxidoreductase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963712.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002967363.1	MULTISPECIES: sugar ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_004681510.1	MULTISPECIES: Ldh family oxidoreductase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_129558693.1	multidrug efflux RND transporter Periplazmaic adaptor subunit BepD [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_002964361.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L4 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963862.1	MULTISPECIES: ETC complex I subunit region [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965683.1	MULTISPECIES: tetratricopeptide repeat protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965482.1	MULTISPECIES: sugar ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002971209.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002969270.1	MULTISPECIES: chain-length determining protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_011069084.1	MULTISPECIES: PhoH family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004682072.1	M81 family peptidase [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_004686203.1	MULTISPECIES: DNA starvation/stationary phase protection protein Dps [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_127064422.1	acetyl-CoA C-acetyltransferase [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Sitoplazma
WP_002964372.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L10 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004686424.1	MULTISPECIES: pyruvate dehydrogenase complex dihydrolipoamide acetyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002964322.1	MULTISPECIES: TAXI family TRAP transporter solute-binding subunit [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965929.1	MULTISPECIES: MurR/RpiR family transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963720.1	MULTISPECIES: transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964642.1	MULTISPECIES: redox-regulated ATPase YchF [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965898.1	MULTISPECIES: sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter ATP-binding protein UgpC [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963597.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963577.1	MULTISPECIES: enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabI [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964243.1	MULTISPECIES: sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965746.1	MULTISPECIES: Lrp/AsnC family transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965759.1	MULTISPECIES: aspartate-semialdehyde dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964261.1	MULTISPECIES: phosphopyruvate hydratase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964637.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Extracell
WP_002965031.1	MULTISPECIES: universal stress protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964036.1	MULTISPECIES: acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004681957.1	MULTISPECIES: amino acid ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_024767924.1	50S ribosomal protein L15 [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_002963616.1	MULTISPECIES: acyl carrier protein [Rhizobiales]	Sitoplazma
WP_002965359.1	MULTISPECIES: sulfate/molybdate ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965460.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002968051.1	MULTISPECIES: 3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabA [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965676.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965662.1	MULTISPECIES: alpha/beta hydrolase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002967099.1	MULTISPECIES: aspartate aminotransferase family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964340.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S13 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002969361.1	MULTISPECIES: IMP dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964222.1	MULTISPECIES: peptidylprolyl isomerase [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002969462.1	MULTISPECIES: pyruvate, phosphate dikinase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965713.1	MULTISPECIES: D-amino-acid transaminase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963607.1	MULTISPECIES: class I SAM-dependent methyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_005971076.1	MULTISPECIES: acyl-CoA dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964588.1	MULTISPECIES: Na/Pi cotransporter family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965608.1	MULTISPECIES: glutathione S-transferase family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_127030812.1	aldehyde dehydrogenase family protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Sitoplazma
WP_004684267.1	MULTISPECIES: F0F1 ATP synthase subunit delta [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965281.1	MULTISPECIES: DNA polymerase III subunit gamma/tau [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964359.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L2 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964067.1	MULTISPECIES: protein-L-isoaspartate O-methyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963526.1	MULTISPECIES: cytochrome-c oxidase, cbb3-type subunit II [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_024767985.1	acyl-CoA dehydrogenase [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_002963780.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002963770.1	MULTISPECIES: electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964815.1	MULTISPECIES: type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002969353.1	MULTISPECIES: FadR family transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965384.1	MULTISPECIES: global response regulator transcription factor RegA [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_004681804.1	MULTISPECIES: PIG-L family deacetylase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_014489415.1	alpha/beta fold hydrolase [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Sitoplazma
WP_004684538.1	MULTISPECIES: Tim44/TimA family putative adaptor protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966840.1	MULTISPECIES: Lon protease [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965061.1	MULTISPECIES: ABC transporter permease [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964354.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L29 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965136.1	MULTISPECIES: protein-export chaperone SecB [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966503.1	MULTISPECIES: ferrochelatase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963462.1	MULTISPECIES: polyphosphate kinase 2 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964345.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S5 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965171.1	MULTISPECIES: acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase subunit beta [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964998.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964348.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S8 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964491.1	MULTISPECIES: ketol-acid reductoisomerase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966087.1	MULTISPECIES: UDP-glucose 4-epimerase GalE [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964246.1	MULTISPECIES: nitrogen regulation protein NR(II) [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966738.1	MULTISPECIES: peptidylprolyl isomerase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964526.1	MULTISPECIES: aminopeptidase P family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964640.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L25 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964376.1	MULTISPECIES: preprotein translocase subunit SecE [ <i>Brucellaceae</i> ]	Hücre membranı
WP_002966912.1	MULTISPECIES: prolipoprotein diacylglyceryl transferase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964682.1	MULTISPECIES: choline ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002965322.1	MULTISPECIES: argininosuccinate synthase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964056.1	MULTISPECIES: Fe-S cluster assembly ATPase SufC [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966404.1	MULTISPECIES: FCD domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966416.1	MULTISPECIES: CoA ester lyase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963878.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004684457.1	MULTISPECIES: succinate--CoA ligase subunit alpha [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964894.1	MULTISPECIES: bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase PurH [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004686484.1	MULTISPECIES: NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoE [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_069129866.1	5-carboxymethyl-2-hydroxyruconate semialdehyde dehydrogenase [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Sitoplazma
WP_002964836.1	MULTISPECIES: N-formylglutamate amidohydrolase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002967303.1	MULTISPECIES: peptide ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002966107.1	MULTISPECIES: 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase (2-methylpropanoyl-transferring) subunit alpha [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965004.1	MULTISPECIES: hydroxyacylglutathione hydrolase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965771.1	MULTISPECIES: translational GTPase TypA [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_075620510.1	MULTISPECIES: GTP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963805.1	MULTISPECIES: ribonuclease III [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965274.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S1 [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963972.1	MULTISPECIES: phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurQ [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964378.1	MULTISPECIES: CBS domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965694.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002964533.1	MULTISPECIES: cell division protein FtsZ [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004681894.1	MULTISPECIES: bifunctional UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase/glucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase GlnU [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_126608807.1	MULTISPECIES: Re/Si-specific NAD(P)(+) transhydrogenase subunit alpha [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004681807.1	MULTISPECIES: nitrate reductase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002969805.1	MULTISPECIES: phosphatidylserine decarboxylase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004684099.1	MULTISPECIES: histidine phosphotransferase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004683466.1	MULTISPECIES: porin family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002971287.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Extracell.
WP_002965677.1	MULTISPECIES: NAD(P)(+) transhydrogenase (Re/Si-specific) subunit beta [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002971481.1	MULTISPECIES: outer membrane protein assembly factor BamE [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002969582.1	MULTISPECIES: DMT family transporter [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004684016.1	MULTISPECIES: UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002971512.1	MULTISPECIES: porin [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004692089.1	MULTISPECIES: cadmium-translocating P-type ATPase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966800.1	MULTISPECIES: valine--tRNA ligase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965185.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L20 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965370.1	MULTISPECIES: dipeptidase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963534.1	MULTISPECIES: aromatic acid exporter family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964174.1	MULTISPECIES: 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_024767970.1	dUTP diphosphatase [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_004683920.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L6 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002971032.1	MULTISPECIES: GGDEF domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı



<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002963984.1	MULTISPECIES: beta-ketoacyl-ACP synthase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964269.1	MULTISPECIES: indole-3-glycerol phosphate synthase TrpC [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002968615.1	MULTISPECIES: cardiolipin synthase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964431.1	MULTISPECIES: acyl-CoA dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965531.1	MULTISPECIES: translation initiation factor IF-1 [Rhizobiales]	Sitoplazma
WP_006137374.1	ribonuclease D [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Sitoplazma
WP_002971432.1	MULTISPECIES: efflux RND transporter Periplazmaic adaptor subunit [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964021.1	MULTISPECIES: preprotein translocase subunit YajC [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964258.1	MULTISPECIES: pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) E1 component subunit alpha [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966771.1	MULTISPECIES: NADH-quinone oxidoreductase subunit G [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963435.1	MULTISPECIES: urease accessory protein UreE [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964616.1	MULTISPECIES: acyl-CoA thioesterase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004685465.1	ABC transporter ATP-binding protein/permease [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_002966241.1	MULTISPECIES: phosphomannomutase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965227.1	MULTISPECIES: translation initiation factor IF-2 [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963760.1	MULTISPECIES: DegQ family serine endoprotease [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965213.1	MULTISPECIES: tRNA (adenosine(37)-N6)-threonylcarbamoyltransferase complex dimerization subunit type 1 TsaB [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma Extracell
WP_002965247.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S20 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004686395.1	MULTISPECIES: sulfate ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_004682852.1	multidrug efflux RND transporter permease subunit BepE [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_002965536.1	MULTISPECIES: UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002964351.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L24 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963939.1	MULTISPECIES: NADH-quinone oxidoreductase subunit C [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963772.1	MULTISPECIES: AMP nucleosidase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965225.1	MULTISPECIES: transcription termination/antitermination protein NusA [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964358.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S19 [Rhizobiales]	Hücre membranı
WP_002963709.1	MULTISPECIES: magnesium transporter CorA [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002971243.1	MULTISPECIES: invasion associated locus B family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964234.1	MULTISPECIES: HU family DNA-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964743.1	MULTISPECIES: RNA polymerase sigma factor RpoH [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004684447.1	dihydrolipoyl dehydrogenase [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Sitoplazma
WP_002965210.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965622.1	MULTISPECIES: 2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002969587.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964330.1	MULTISPECIES: alanine--tRNA ligase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963796.1	MULTISPECIES: GTP pyrophosphokinase rsh [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965966.1	MULTISPECIES: aldehyde dehydrogenase family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964525.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L11 methyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963524.1	MULTISPECIES: cytochrome-c oxidase, cbb3-type subunit III [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002964574.1	MULTISPECIES: linear amide C-N hydrolase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002969557.1	MULTISPECIES: type I methionyl aminopeptidase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966105.1	MULTISPECIES: 2-oxo acid dehydrogenase subunit E2 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004683948.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002967276.1	MULTISPECIES: sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter ATP-binding protein UgpC [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966212.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963630.1	MULTISPECIES: cytochrome c oxidase subunit 3 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_006262370.1	MULTISPECIES: ATP-binding cassette domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964780.1	MULTISPECIES: ATP-dependent metalloproteinase FtsH/Yme1/Tma family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963853.1	MULTISPECIES: phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963622.1	MULTISPECIES: guanylate kinase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002970916.1	MULTISPECIES: outer membrane protein assembly factor [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004684610.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964048.1	MULTISPECIES: thioredoxin-dependent thiol peroxidase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004684614.1	MULTISPECIES: cytochrome c family protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002963925.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S9 [ <i>Brucellaceae</i> ]	Hücre membranı
WP_002967866.1	MULTISPECIES: dihydroxyacetone kinase subunit L [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963896.1	MULTISPECIES: porphobilinogen synthase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_005970254.1	MULTISPECIES: YdcF family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963636.1	MULTISPECIES: peroxiredoxin [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002964015.1	MULTISPECIES: serine--tRNA ligase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965409.1	MULTISPECIES: PTS IIA-like nitrogen-regulatory protein PtsN [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_024767981.1	MULTISPECIES: GDP-mannose 4,6-dehydratase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002968215.1	MULTISPECIES: FadR family transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964355.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L16 [ <i>Brucellaceae</i> ]	Hücre membranı
WP_002964834.1	MULTISPECIES: pyruvate kinase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002964402.1	MULTISPECIES: porin family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964032.1	MULTISPECIES: NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit NDUFA12 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963985.1	MULTISPECIES: acyl carrier protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966909.1	MULTISPECIES: MBL fold metallo-hydrolase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963975.1	MULTISPECIES: DUF1476 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965047.1	MULTISPECIES: argininosuccinate lyase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964339.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S11 [ <i>Brucellaceae</i> ]	Hücre membranı
WP_002965402.1	MULTISPECIES: signal peptide peptidase SppA [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963596.1	MULTISPECIES: TIGR00730 family Rossmann fold protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004686256.1	MULTISPECIES: malate dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964590.1	MULTISPECIES: carbamoyl-phosphate synthase small subunit [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004684456.1	MULTISPECIES: 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964862.1	MULTISPECIES: pyruvate carboxylase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964595.1	MULTISPECIES: carbamoyl-phosphate synthase large subunit [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964776.1	MULTISPECIES: phosphoserine transaminase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964776.1	MULTISPECIES: DUF2147 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002967219.1	MULTISPECIES: alanine racemase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964493.1	MULTISPECIES: potassium transporter Kup [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004683710.1	MULTISPECIES: acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965181.1	MULTISPECIES: alpha/beta hydrolase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964167.1	MULTISPECIES: competence/damage-inducible protein A [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964611.1	MULTISPECIES: DUF1176 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002971389.1	MULTISPECIES: response regulator transcription factor [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002964877.1	MULTISPECIES: F0F1 ATP synthase subunit gamma [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964327.1	MULTISPECIES: NADP-dependent isocitrate dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965789.1	MULTISPECIES: D-ribose ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002966968.1	MULTISPECIES: F0F1 ATP synthase subunit beta [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004685845.1	MULTISPECIES: branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002968728.1	MULTISPECIES: proline--tRNA ligase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965775.1	MULTISPECIES: fructose-bisphosphate aldolase class II [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963786.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966975.1	MULTISPECIES: CoA-acylating methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_024767984.1	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Sitoplazma
WP_002964812.1	MULTISPECIES: cell division protein ZapA [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964007.1	MULTISPECIES: arginine--tRNA ligase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964050.1	MULTISPECIES: tyrosine--tRNA ligase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964856.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L32 [ <i>Brucellaceae</i> ]	Hücre membranı
WP_002965176.1	MULTISPECIES: YdcF family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002967440.1	MULTISPECIES: crotonase/enoyl-CoA hydratase family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964122.1	MULTISPECIES: P-II family nitrogen regulator [ <i>Brucellaceae</i> ]	Hücre membranı
WP_002964062.1	MULTISPECIES: DEAD/DEAH box helicase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002967723.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004686317.1	sensor histidine kinase [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_002964221.1	MULTISPECIES: peptidylprolyl isomerase [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_004684481.1	MULTISPECIES: cysteine synthase A [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002964346.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L18 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964131.1	MULTISPECIES: NAD <sup>+</sup> synthase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002969295.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964140.1	MULTISPECIES: ABC transporter [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963483.1	MULTISPECIES: large conductance mechanosensitive channel protein MscL [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004683873.1	MULTISPECIES: ribosome recycling factor [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002968488.1	MULTISPECIES: glycine cleavage system protein GcvH [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964608.1	MULTISPECIES: Lrp/AsnC family transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966364.1	MULTISPECIES: DNA mismatch repair endonuclease MutL [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964746.1	MULTISPECIES: transcriptional repressor [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002967027.1	MULTISPECIES: 16S rRNA (guanine(527)-N(7))-methyltransferase RsmG [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004685217.1	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Sitoplazma
WP_002964038.1	MULTISPECIES: DsbA family protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002964971.1	MULTISPECIES: succinate dehydrogenase, hydrophobic membrane anchor protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964231.1	MULTISPECIES: single-stranded DNA-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002971918.1	MULTISPECIES: succinate dehydrogenase, cytochrome b556 subunit [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002970090.1	MULTISPECIES: elongation factor Tu [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964800.1	MULTISPECIES: inositol monophosphatase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965301.1	MULTISPECIES: DUF1775 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965921.1	MULTISPECIES: ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_004684455.1	MULTISPECIES: 2-oxoglutarate dehydrogenase complex dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002964865.1	MULTISPECIES: branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002969217.1	MULTISPECIES: molecular chaperone DnaK [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004686479.1	MULTISPECIES: Grx4 family monothiol glutaredoxin [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002967987.1	MULTISPECIES: cystathionine gamma-synthase family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964395.1	MULTISPECIES: LL-diaminopimelate aminotransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_005971161.1	MULTISPECIES: proline/glycine betaine ABC transporter ATP-binding protein ProV [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966502.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965314.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964356.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S3 [ <i>Brucellaceae</i> ]	Hücre membranı
WP_002964459.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964365.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S7 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004683014.1	MULTISPECIES: ATP synthase subunit b 2 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964775.1	MULTISPECIES: phosphoglycerate dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_031310973.1	MULTISPECIES: invasion associated locus B family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002971090.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964582.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964787.1	MULTISPECIES: protein TolR [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965122.1	MULTISPECIES: ParB/RepB/Spo0J family partition protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964949.1	MULTISPECIES: glutaredoxin 3 [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966035.1	MULTISPECIES: acyl-CoA dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004682238.1	MULTISPECIES: glycerol-3-phosphate dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002966855.1	MULTISPECIES: DNA-directed RNA polymerase subunit beta [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004686339.1	MULTISPECIES: cytochrome c1 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964360.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L23 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_054314117.1	sugar ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_004683917.1	MULTISPECIES: DNA-directed RNA polymerase subunit alpha [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964572.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004686962.1	MULTISPECIES: OmpA family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002971797.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964030.1	MULTISPECIES: Asp-tRNA(Asn)/Glu-tRNA(Gln) amidotransferase subunit GatB [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963818.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Extracell.
WP_002967083.1	MULTISPECIES: DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing) subunit B [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965735.1	MULTISPECIES: SIS domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965627.1	MULTISPECIES: membrane protein insertase YidC [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965589.1	MULTISPECIES: 2-polyprenylphenol 6-hydroxylase [ <i>Brucella</i> ]	Extracell.
WP_002965128.1	MULTISPECIES: transcription termination factor Rho [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966992.1	MULTISPECIES: succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964506.1	MULTISPECIES: FtsH protease activity modulator HflK [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964841.1	MULTISPECIES: thiamine ABC transporter substrate binding subunit [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002964549.1	MULTISPECIES: divalent metal cation transporter [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963982.1	MULTISPECIES: NADPH:quinone oxidoreductase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002969569.1	MULTISPECIES: STAS/SEC14 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı



<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002963701.1	MULTISPECIES: betaine-aldehyde dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964756.1	MULTISPECIES: DUF883 family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma Extracell.
WP_002965957.1	MULTISPECIES: amino acid ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964544.1	MULTISPECIES: UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965246.1	MULTISPECIES: enoyl-CoA hydratase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004683758.1	MULTISPECIES: 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase class II [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002972046.1	MULTISPECIES: cytochrome bd-I oxidase subunit CydX [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964543.1	MULTISPECIES: UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2,6-diaminopimelate--D-alanyl-D-alanine ligase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002970268.1	MULTISPECIES: ATP-binding cassette domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965036.1	MULTISPECIES: electron transfer flavoprotein subunit alpha/FixB family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004683131.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963998.1	MULTISPECIES: Lrp/AsnC family transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966704.1	MULTISPECIES: endolytic transglycosylase MltG [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002972093.1	MULTISPECIES: superoxide dismutase [Cu-Zn] [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002964280.1	MULTISPECIES: 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase FabZ [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966369.1	MULTISPECIES: DUF4170 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004681076.1	MULTISPECIES: ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002965341.1	MULTISPECIES: aconitate hydratase AcnA [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965452.1	MULTISPECIES: alcohol dehydrogenase AdhP [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963991.1	MULTISPECIES: HAD family hydrolase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_004684654.1	MULTISPECIES: DUF3131 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966265.1	MULTISPECIES: DUF3597 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Extracell.
WP_002963942.1	MULTISPECIES: NADH-quinone oxidoreductase subunit NuoF [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002969261.1	MULTISPECIES: (2,3-dihydroxybenzoyl)adenylate synthase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963716.1	MULTISPECIES: superoxide dismutase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_024767954.1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta' [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_002963713.1	MULTISPECIES: DUF853 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964923.1	MULTISPECIES: GTPase ObgE [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002967300.1	MULTISPECIES: ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002964945.1	MULTISPECIES: bifunctional 3-demethylubiquinone 3-O-methyltransferase/2-octaprenyl-6-hydroxy phenol methylase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964804.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L31 [ <i>Brucellaceae</i> ]	Hücre membranı
WP_002968836.1	MULTISPECIES: ATP-dependent protease [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964638.1	MULTISPECIES: ribose-phosphate pyrophosphokinase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966096.1	MULTISPECIES: ABC transporter permease subunit [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964342.1	MULTISPECIES: preprotein translocase subunit SecY [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965667.1	MULTISPECIES: LacI family transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002964785.1	MULTISPECIES: Tol-Pal system protein TolB [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_004686037.1	MULTISPECIES: 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002968608.1	MULTISPECIES: complex I NDUF9 subunit family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965457.1	MULTISPECIES: aldehyde dehydrogenase family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964288.1	MULTISPECIES: elongation factor Ts [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_046722101.1	heme biosynthesis protein HemY [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_002964538.1	MULTISPECIES: UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004686102.1	MULTISPECIES: phosphoglycerate dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004686354.1	MULTISPECIES: RNA polymerase sigma factor RpoD [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966761.1	MULTISPECIES: DNA topoisomerase IV subunit A [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964121.1	MULTISPECIES: type I glutamate--ammonia ligase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965205.1	MULTISPECIES: phosphate ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966792.1	MULTISPECIES: penicillin-binding protein 1A [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963908.1	MULTISPECIES: sodium-translocating pyrophosphatase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964915.1	MULTISPECIES: S41 family peptidase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004683912.1	MULTISPECIES: TRAP transporter permease [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965169.1	MULTISPECIES: thioredoxin [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965328.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Extracell.
WP_002966712.1	MULTISPECIES: ABC transporter permease [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964697.1	MULTISPECIES: DUF1134 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965150.1	MULTISPECIES: 1-(5-phosphoribosyl)-5-((5-phosphoribosylamino)methylideneamino)imidazole-4-carboxamide isomerase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963679.1	MULTISPECIES: DegT/DnrJ/EryC1/StrS aminotransferase family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002971551.1	MULTISPECIES: DsbA family protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002963914.1	MULTISPECIES: integration host factor subunit alpha [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_005969508.1	MULTISPECIES: endonuclease [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964323.1	MULTISPECIES: glutamate racemase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004686637.1	MULTISPECIES: aldehyde dehydrogenase family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002966005.1	MULTISPECIES: saccharopine dehydrogenase family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002967274.1	MULTISPECIES: carbohydrate ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002965774.1	MULTISPECIES: class 1 fructose-bisphosphatase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966094.1	MULTISPECIES: peptide ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_002964994.1	MULTISPECIES: ADP-forming succinate--CoA ligase subunit beta [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004683126.1	MULTISPECIES: cytochrome c oxidase subunit I [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_024767897.1	energy-dependent translational throttle protein EttA [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_002963881.1	MULTISPECIES: amino acid ABC transporter substrate-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Periplazma
WP_077281769.1	ActS/PrrB/RegB family redox-sensitive histidine kinase [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_002964041.1	MULTISPECIES: ribonuclease E/G [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966939.1	MULTISPECIES: RNA polymerase sigma factor [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964245.1	MULTISPECIES: nitrogen regulation protein NR(I) [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002967949.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L21 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964362.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L3 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966097.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963974.1	MULTISPECIES: phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964004.1	MULTISPECIES: tellurite resistance TerB family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963543.1	MULTISPECIES: F0F1 ATP synthase subunit A [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002967176.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_094285340.1	transporter [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_004681934.1	sn-glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein UgpB [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Periplazma
WP_002964772.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Extracell.
WP_004683735.1	site-specific integrase [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Sitoplazma
WP_002965160.1	MULTISPECIES: PTS sugar transporter subunit IIA [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004684580.1	MULTISPECIES: methionine adenosyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_024767941.1	phosphate signaling complex protein PhoU [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Sitoplazma
WP_002964095.1	MULTISPECIES: DUF1508 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004683739.1	MULTISPECIES: porin family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963845.1	MULTISPECIES: glutathione S-transferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963926.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L13 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004681766.1	MULTISPECIES: porin family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966387.1	MULTISPECIES: chaperonin GroEL [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966434.1	MULTISPECIES: hydroxypyruvate isomerase family protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004684004.1	MULTISPECIES: protease modulator HflC [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002971535.1	MULTISPECIES: peptidoglycan-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004683915.1	MULTISPECIES: replication-associated recombination protein A [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963645.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Fimbrium.
WP_002966950.1	MULTISPECIES: flagellar motor protein MotA [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964641.1	MULTISPECIES: aminoacyl-tRNA hydrolase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_086440181.1	MULTISPECIES: acyl-CoA dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965230.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S15 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964102.1	MULTISPECIES: glycosyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965785.1	MULTISPECIES: DUF2291 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_004686402.1	MULTISPECIES: 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002967400.1	MULTISPECIES: succinylglutamate desuccinylase/aspartoacylase family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004684303.1	MULTISPECIES: lytic murein transglycosylase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963639.1	MULTISPECIES: sensor domain-containing phosphodiesterase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964897.1	MULTISPECIES: TPM domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964014.1	MULTISPECIES: twin-arginine translocase subunit TatC [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965052.1	MULTISPECIES: class I SAM-dependent methyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966947.1	MULTISPECIES: peptidoglycan-associated lipoprotein Pal [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004684082.1	MULTISPECIES: DUF4159 domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_087913319.1	ribosome-associated translation inhibitor RaiA [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_002964263.1	MULTISPECIES: CTP synthase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966506.1	MULTISPECIES: KpsF/GutQ family sugar-phosphate isomerase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964944.1	MULTISPECIES: aspartate kinase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963940.1	MULTISPECIES: NADH-quinone oxidoreductase subunit D [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965063.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966460.1	MULTISPECIES: HTH-type quorum sensing-dependent transcriptional regulator VjbR [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002965251.1	MULTISPECIES: molybdopterin-synthase adenylyltransferase MoeB [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_005968692.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004684705.1	MULTISPECIES: copper-translocating P-type ATPase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004686419.1	MULTISPECIES: elongation factor G [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964257.1	MULTISPECIES: pyruvate dehydrogenase complex E1 component subunit beta [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964349.1	MULTISPECIES: 30S ribosomal protein S14 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002964621.1	MULTISPECIES: cold-shock protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002966034.1	MULTISPECIES: aspartate carbamoyltransferase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004682938.1	MULTISPECIES: TRAP transporter small permease subunit [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964341.1	MULTISPECIES: adenylate kinase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964955.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002967174.1	MULTISPECIES: O-antigen ligase family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002963831.1	MULTISPECIES: leucyl aminopeptidase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002963938.1	MULTISPECIES: NADH-quinone oxidoreductase subunit B [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_024767917.1	porin family protein [ <i>Brucella melitensis</i> ]	Hücre membranı
WP_002965252.1	MULTISPECIES: glyoxylate/hydroxypyruvate reductase A [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964631.1	MULTISPECIES: accessory factor UbiK family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965131.1	MULTISPECIES: kinase/pyrophosphorylase [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_011069136.1	MULTISPECIES: GbsR/MarR family transcriptional regulator [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004683781.1	MULTISPECIES: universal stress protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_004684484.1	MULTISPECIES: SDR family oxidoreductase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964788.1	MULTISPECIES: protein TolQ [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964839.1	MULTISPECIES: glycine zipper 2TM domain-containing protein [ <i>Brucella</i> ]	Fimbrium
WP_002965727.1	MULTISPECIES: alpha-hydroxy-acid oxidizing protein [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002967716.1	MULTISPECIES: RidA family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004685853.1	MULTISPECIES: acetate--CoA ligase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964591.1	MULTISPECIES: flagellar biosynthesis protein FlgM [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964371.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L7/L12 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002971236.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı

<b>Protein kodu</b>	<b>Protein İsmi</b>	<b>Proteinin Tahmin Edilen Lokasyonu</b>
WP_002967018.1	MULTISPECIES: HlyC/CorC family transporter [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964373.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L1 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964737.1	MULTISPECIES: disulfide bond formation protein B [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964255.1	MULTISPECIES: dihydrolipoyl dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma
WP_002964867.1	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_006074564.1	MULTISPECIES: YgcG family protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002964755.1	MULTISPECIES: hypothetical protein [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965770.1	MULTISPECIES: magnesium transporter [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965079.1	MULTISPECIES: 50S ribosomal protein L28 [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965233.1	MULTISPECIES: enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabI [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004683766.1	MULTISPECIES: kinesin [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965733.1	MULTISPECIES: efflux RND transporter permease subunit [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_004684679.1	MULTISPECIES: integration host factor subunit beta [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002966289.1	MULTISPECIES: respiratory nitrate reductase subunit gamma [ <i>Brucella</i> ]	Hücre membranı
WP_002965723.1	MULTISPECIES: D-amino acid dehydrogenase [ <i>Brucella</i> ]	Sitoplazma