

T.C
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STAFİLOKOKAL ENTEROTOKSİN A (SEA)
ANTİJENİNE KARŞI
MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİ**

Arzu PINARBAŞI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.
Haziran-2012

T.C
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STAFİLOKOKAL ENTEROTOKSİN A (SEA)
ANTİJENİNE KARŞI
MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİ**

Arzu PINARBAŞI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Fatma YÜCEL

Haziran-2012

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

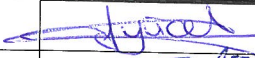

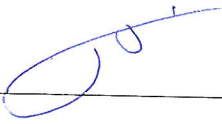
Tez Adı: STAFİLOKOKAL ENTEROTOKSİN A (SEA)
antijenine karşı monoklonal antikor üretimi.

Tez yazarı: Arzu PINARBAŞI

Tez savunma tarihi: 01.06.2012

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fatıma YÜCEL

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji
Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
ÜYE(DANIŞMAN):	Doç. Dr. Fatıma YÜCEL	
ÜYE:	Doç.Dr. Selma ÖZTÜRK	
ÜYE:	Yard. Doç. Dr. Naci ÇİNE	
ÜYE:		

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu
onaylarım.

.../.../2012

Prof.Dr. Ümit BİÇER

Enstitü Müdürü

Özet

Stafilokokal Enterotoksin A (SEA) Antijenine Karşı Monoklonal Antikor Üretimi

Stafilokokal enterotoksinler (SE) gıda zehirlenmelerinin yanı sıra, toksik şok benzeri sendroma, artrite, alerjik reaksiyonlara ve otoimmün hastalıklara neden olmaktadır. Stafilokokal gıda zehirlenmesi olgularında ölüm nadirdir ancak çocuklar ve yaşlılarda ölüm oranının %0.03'ten %4.4'e kadar değişebildiği bildirilmiştir. Stafilokokal gıda zehirlenmeleri, tüm dünyada üretim kaybı ve medikal masraflar nedeniyle yüklü bir maliyete mâl olmaktadır.

Stafilokokal enterotoksinlerin; en sık görüleni, en toksik olanı, en ısıya ve asite dayanıklı olanı stafilokok enterotoksin A'dır. Stafilokokal Enterotoksin A; tükettiğimiz besinlerde özellikle de bebeklerimizin beslenmesinde önemli bir yere sahip olan sütte, dünya çapında ciddi anlamda kontaminasyona neden olmaktadır.

Tez çalışmamda; Hibridoma tekniğini kullanarak, SEA antijenine karşı özgün monoklonal antikor geliştirmek ve etkenin tanısına yönelik sistemlerde monoklonal antikorun etkin olarak kullanılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, deneylerde ticari olarak temin edilen SEA antijeni ile 6-8 haftalık BALB/c türü fareler immünize edildi. Hibridoma teknolojisi kullanılarak güçlü antikor yanıtı alınan fareler ile 3 ayrı füzyon çalışmaları gerçekleştirildi. Füzyonlarda, B lenfosit kaynağı olarak dalak organı kullanıldı. Dalak hücreleri ile fare myeloma hücreleri, polietilen glikol varlığında birleştirildi. Füzyon çalışmaları sonucunda 8 adet hibrit klon elde edildi. Bu klonlar içerisinde 1 adet klonun ürettiği antikorun SEA antijeni ile özgün reaksiyon verdiği dolaylı ELISA yöntemi ile belirlendi.

Sonuç olarak; elde ettiğimiz bu monoklonal antikor ile sütte ki SEA'nın tespiti için (antijen-antikor ilişkisine dayalı tüm sistemlerde) hızlı, basit, güvenilir ve hassas tanı sistemlerinin geliştirilmesi mümkün olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Staphylococcus Aerus*, Enterotoksin, Süperantijen, Monoklonal Antikorlar, ELISA Test Sistemleri, Hibridoma Teknolojisi

Abstract

Production Of Monoclonal Antibody Against Staphylococcal Enterotoxin A (SEA) Antigen

Staphylococcal Enterotoxins cause syndromes like toxic shock, arthritis, allergic reactions and autoimmune diseases beside food poisoning. The mortality rate is low for staphylococcal food poisoning but for children and old people the mortality rate is in the range 0.03% to 4.4%. Staphylococcal poisonings may cause a loss of revenue due to the production and medical costs.

Among all the Staphylococcal Enterotoxins the most common, the most toxic, the most heat resistant and the most acid-resistant is the Staphylococcal Enterotoxin A. Staphylococcal Enterotoxin A, causes serious contamination around the world to the food which we consume daily and to the milk which is so important for our babies.

In my thesis study, the aim is to produce monoclonal antibodies against SEA antigen by using hybridoma technology so that a SEA detection kit may be produced in the future.

With this purpose, commercially obtained SEA antigen is used for immunisation of 6-8 weeks old BALB/c mice in the experiments. By using hybridoma technology, three fusion studies were carried out with the high immune response giving mice. The spleen was used as a lymphocyte source in the fusion studies. Spleen and myeloma cells were fused in the presence of polyethylenglycol. As a result of fusion, 8 positive hybrid clones were obtained. Among these clones it is observed that one clone (1D3) produces specific monoclonal antibody against SEA by indirect ELISA.

In conclusion, using this monoclonal antibody it will be possible to develop quick, easy and cheap serologic systems to detect the SEA amount in milk.

Key Words: *Staphylococcus Aerus*, Enterotoxin, Superantigen, Monoclonal Antibodies, ELISA Test Systems, Hybridoma Technology.

Teşekkür

Hibridoma teknolojisi alanında bana çalışma şansını tanıyan, benim ile bu konuda ki engin bilgilerini-tecrübelerini cömertçe paylaşan, bana bu zorlu yolda eşsiz sabır-güler yüz gösteren, bana en kötü anım da moral veren, bana en yoğun anında bile vakit ayıran, tez danışmanım, sayın hocam Doç. Dr. Fatıma YÜCEL'e yönetim ve ilgilerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarımda; yakın ilgilerini esirgemeyen, değerli fikirlerinden ve deneyimlerinden yararlandığım Doç. Dr. Selma ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince sevgi, anlayış ile tüm bilgi birikimi ve deneyimlerini benimle paylaşan Msc Özlem ERTEKİN'e teşekkür ederim.

Tüm sevecenlikleri, nezaketleri ile bana deneyimlerini sunan Baş Uzman Teknisyen Ali İhsan MANAV ve Uzman Teknisyen Harun KOCAAĞA'ya teşekkür ederim

Beni her gün yüreklendiren, moral veren, destekleyen sevgili arkadaşlarım Elif YOLAÇ, Msc Öznur Özlem İBRAHİMOĞLU, Emel AKGÜN, Msc Zeynep İLKAY, MSc Duygu YAVUZ, Ufuk Ramiz AKKOYUNLU ve MSc Betül BAYKAL'a sonsuz teşekkürler.

Tez çalışmam süresince annem NİHAL PINARBAŞI'ya, babam BEKİR PINARBAŞI'ya gösterdikleri limitsiz özveri, destek, sevgi ve ilgi için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam	1
1.2. Hipotez	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Stafilokokus Aerus ve Stafilokokal Enterotoksinler	5
2.1.1 Stafilokokal Enterotoksin A (SEA) ve Fiziksel – Kimyasal Özellikleri	6
2.1.2 Enterotoksinlerin Süperantijen Aktiviteleri	9
2.1.3 SE ve Gıda Zehirlenmesi	10
2.1.4 SE’ nin Türkiye ve Dünyada ki Genel Durumu	11
2.1.5. Stafilokokal Enterotoksin A’nın Tespiti	13
2.2. Bağışıklık Sistemi	14
2.2.1. Bağışıklık Sisteminde Görev Yapan Organlar	16
2.2.2. Bağışıklık Sistemi Hücreleri	16
2.3 Antijenler	18
2.4. Antikorlar	19
2.4.1. Antikorum Yapısı ve Çeşitleri	19
2.4.2. Monoklonal Antikorlar	21
2.4.3. Poliklonal Antikorlar	23
2.5. Bağışıklık Yanıtının Kontrolü ve ELISA Çeşitleri	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Gereçler ve Kimyasallar	27
3.2. Medyumların, Tamponların ve Kimyasalların Hazırlanması	33
3.2.1. Kimyasalların Hazırlanması	33
3.2.2. Tamponların Hazırlanması	33
3.2.3. Medyumların Hazırlanması	34
3.3. Yöntemler	34
3.3.1. Stafilokokal Enterotoksin A Antijenin Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Yürütülmesi	34
3.3.2. Farelerin İmmünizasyonu	35
3.3.3. Farelerde İmmün Yanıtın Test Edilmesi	36
3.3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	37
3.3.4.1. Dondurulmuş Hücrelerin Açılması	37
3.3.4.2. Hücrelerin Kültür Şişelerinde Pasajlanması	37
3.3.4.3. Hücrelerin Dondurulması	37
3.3.4.4. Hücrelerin Sayımı	38

3.3.4.5. Myeloma Hücrelerinin Füzyona Hazırlanması	38
3.3.4.6. Besleyici Hücrelerin (Makrofajların) Füzyona Hazırlanması	39
3.3.4.7. Bağışıklanmış Fare Dalak Hücrelerinin Elde Edilmesi	40
3.3.4.8. Myeloma ve Bağışıklanmış Dalak Hücrelerinin Birleştirilmesi (Füzyon)	40
3.3.5. Hücrelerin Takibi	43
3.3.5.1. Dolaylı ELISA	43
3.3.5.2. Tek Düşürme (Limitid Dilüsyon) Yöntemi	43
3.3.5.3. Hibridomaların Geniş Ölçekli Üretimi	43
3.3.6. Monoklonal Antikorların Saflaştırılması	44
3.3.6.1. Amonyum Sülfat ile Çöktürme	44
3.3.6.2. İmmünoafinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	45
4. BULGULAR	47
4.1. İmmünizasyonda Kullanılan SEA Antijen Profiline Belirlenmesi	47
4.2. Antijen ve Fare Serum Dilüsyonu Optimizasyon Testi	48
4.3. İmmünizasyonlar-Fare Sonuçları	49
4.4. Füzyon Sonuçları	51
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR DİZİNİ	66
ÖZGEÇMİŞ	70

SİMGELER VE KISALTMALAR :

APC: Antigen Presenting Cell
CFA: Complete Freund' s Adjuvant.
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO: Dimetil Sülfoksit
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELFA: Enzyme Linked Fluorescent Assay
FCS : Fetal Calf Serum
HAT: Hypoxanthine, Aminopterin, Thymidine
HGPRT: Hypoxanthine, Guanosyle, Phosphoribosyle, Transferase
HT: Hypoxanthine, Thymidine
IFA: Incomplete Freund's Adjuvant
IMM: Immünizasyon
kd: Kilodalton
MHC: Major Histocompatibility Complex
NK: Doğal öldürücü hücreler (Natural Killer)
PCR: Polimerase Chain Reaction
RPLA: Reverse Passive Latex Agglutinationassay
SE: Stafilokokal Enterotoksinler
SEA : Stafilokokal Enterotoksin A
SEB : Stafilokokal Enterotoksin B
TCR: T Cell Receptor
PBS: Phosphate Buffered Saline

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. SEA'nın Kristal Yapısı	8
Şekil 2.2. SEA'nın 3 Boyutlu Yapısı	8
Şekil 2.3. TCR ve MHC Class II Bağlanması	10
Şekil 2.4. Bağışıklık Sistemi Organları	16
Şekil 2.5. Kemik İliği Türevli Hücreler	17
Şekil 2.6. Lenfosit Çeşitleri	17
Şekil 2.7. Antijen-Antikor	19
Şekil 2.8. Antikorum Yapısı	20
Şekil 2.9. İmmünoglobulinler	21
Şekil 2.10. Monoklonal Antikorların Hazırlanmasının Şematik Gösterimi	22
Şekil 2.11. Doğrudan ELISA	24
Şekil 2.12. Yarışmalı ELISA	25
Şekil 2.13. Sandviç ELISA	25
Şekil 2.14. Dolaylı ELISA	26
Şekil 3.1. Hücre Kültürlerinin Saklandığı CO ₂ İnkübatör	27
Şekil 3.2. Hücre Kültürü İşlemlerinin Yapıldığı Lamin Air Flow	28
Şekil 3.3. Hibrit Tarama ve Hücre Sayımının Yapıldığı İnvirt Mikroskop	28
Şekil 3.4. Besiyeri DMEM Filtrasyon Sistemi	29
Şekil 3.5. Tek Kullanımlık Hücre Kültür Plakları	30
Şekil 3.6. Tek Kullanımlık Hücre Kültür Şişeleri	30
Şekil 3.7. Easyjet (Pipetör Tabanca)	31
Şekil 3.8. BALB/ C Fareleri	35
Şekil 3.9. Hücrelerin Sayımı	38
Şekil 3.10. Fo Myeloma Hücreleri	38
Şekil 3.11. Makrofaj Hücreler	39
Şekil 3.12. Fareden Dalak Hücrelerinin Eldesi	40
Şekil 3.13. 10. Gün Hibrit Hücreler	42
Şekil 3.14. Hücre Kültürü Şişesi	44
Şekil 3.15. İmmun Afinite Kolon Kromatografisi	46
Şekil 4.1. SEA ve SEB SDS Jel Görüntüsü (% 12 SDS PAGE GEL)	47
Şekil 4.2. Antijen ve Serum Dilusyonu Optimizasyonu	48
Şekil 4.3. 1Nolu Kafesde 3. İmmünizasyon Sonrası Fare Aktivite Testi	49
Şekil 4.4. 2. Nolu Kafesde 3. İmmünizasyon Sonrası Fare Aktivite Testi	50
Şekil 4.5. 3. Nolu Kafesde 3. İmmünizasyon Sonrası Fare Aktivite Testi	51
Şekil 4.6. SEA Antijenine Antikor Üreten Hibrit Hücrelerin Dolaylı ELISA	52
Şekil 4.7. SEA Antijenine Antikor Üreten Hibrit Hücrelerin Üst Sıvılarının Diğer Antijenler ile Karşılaştırmalı Reaksiyonları	53
Şekil 4.8. SEA Antijenine Antikor Üreten Hibrit Hücrelerin Dolaylı ELISA Sonuçları	55
Şekil 4.9. SEA Antijenine Antikor Üreten 1B5 ve 9C4 Hücre Üst Sıvılarının Diğer Antijenler ile Karşılaştırmalı Reaksiyonları	56
Şekil 4.10. 1B5 ve 9C4 Hücre Üst Sıvılarının, Dolaylı ELISA Testinde 2 Farklı Blokla Tamponu Kullanılarak Test Edilmesi	57
Şekil 4.11. 3. Füzzyonda Elde Edilen SEA Antijenine Antikor Üreten Hibrit Hücrelerin Dolaylı ELISA Testi	59
Şekil 4.12. 1D3, 4B5 ve 6D12 Hücre Üst Sıvılarının Diğer Antijenler ile Karşılaştırmalı Reaksiyonları	60
Şekil 4.13. 1D3 Kodlu Klonların İmmunglobulin Tiplendirmesi	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. SEA'nın a.a Dizilimi	7
Çizelge 2.2. Dünyada SE Dağılımı (Cretenet, 2011)	13
Çizelge 2.3. Staphylococcal Enterotoksinlerin Tespitine Yönelik Kitler	14
Çizelge 3.1. Füzyonda Kullanılan ve Elde Edilen Hücreler	33
Çizelge 3.2. Farelerin Aşılama Takvimleri	36
Çizelge 4.1. SEA+SEB Antijeni ile İmmünizeli Farelerle Gerçekleştirilen 1. Füzyona Ait Sayısal Veriler	52
Çizelge 4.2. SEA Antijeni ile İmmünizeli Farelerle Gerçekleştirilen 2. Füzyona Ait Sayısal	54
Çizelge 4.3. SEA Antijeni ile İmmünizeli (2µg SEA) Fare ile Gerçekleştirilen Üçüncü Füzyona Ait Sayısal Veriler	58

1.GİRİŞ:

Bir mikroorganizma veya toksini bulaşmış bir besinin tüketilmesinin ardından ishal, bulantı, kusma, karın ağrısı, karında kramp gibi sindirim sistemini ilgilendiren bulguların ortaya çıkması besin zehirlenmesi olarak adlandırılır. *Staphylococcus Aureus*, birçok ülkede yaygın gıda zehirlenmesine neden olan patojenlerden ikinci veya üçüncü patojen olarak dikkati çekmektedir (Atanassova, 2001). Stafilokokal Enterotoksinler (SE); gıda zehirlenmelerinin yanı sıra, toksik şok benzeri sendroma, artrite, allerjik reaksiyonlara ve otoimmün hastalıklara da neden olmaktadır (Balaban, 2000; Krakauer, 1999). Stafilokokal enterotoksinlerin; en sık görüleni, en toksik olanı, en ısıya ve asite en dayanıklı olanı Stafilokokal Enterotoksin A'dır. Stafilokokal Enterotoksin A (SEA), tükettiğimiz besinleri özellikle de bebeklerimizin beslenmesinde önemli bir yere sahip olan sütü dünya çapında ciddi anlamda kontamine etmektedir. Süt kontaminasyonunun önlenmesi adına SEA'nın hızlı, kolay ve güvenilir bir şekilde tespit edilmesi çok önemlidir. Günümüzde SEA'nın tespiti için piyasada TRANSIA, RIDASCREEN, Reverse Passive Latex Agglutinationassay (RPLA), TECRA, VIDAS adları altında çeşitli ticari test kitleri kullanılmaktadır. Fakat bu ticari test kitleri 0,5 ng/g'dan daha düşük konsantrasyonlardaki enterotoksinlerin değerlerinin belirlenmesi için yeterince hassas değildir. *Staphylococcus Aureus* enterotoksinlerinin tespitinde en kolay, hızlı ve güvenilir yöntemin Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) metodu olduğu kabul edilmektedir (Kısa,1996). Hibridoma teknolojisi kullanarak, farede geliştirilen monoklonal antikorlar, ELISA tanı sistemini kurmak için kullanılacaktır.

Deneyleerde SEA antijeni ile 6-8 haftalık BALB/c türü fareler immünize edildi. Hibridoma teknolojisi kullanılarak güçlü antikor yanıtı alınan fareler ile füzyon çalışmaları gerçekleştirildi. 3 ayrı füzyon deneyi yapıldı. Füzyonlarda, B lenfosit kaynağı olarak aktif yanıt veren (immünize edilmiş) farenin dalak hücreleri kullanıldı. Fare dalak hücreleri, fare myeloma hücreleri ile polietilen glikol varlığında birleştirildi. Üçüncü füzyon çalışması sonucunda, 3 adet hibrit klon elde edilmiş ve bu klonlar içerisinde 1 klonun ürettiği monoklonal antikorun SEA antijeni ile özgün reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Bu antikorlar kullanılarak ELISA test sisteminde SEA antijeni ile etkileşimi araştırılmıştır.

1.1 Amaç ve Kapsam:

Süt, yetişkin bireylerden çok çocukların hatta yeni doğanların beslenmelerinde çok daha büyük bir öneme sahiptir. SEA'nın bebeklerimize verdiğimiz hazır sütlerde ve daha

da vahim olanı annenin beslenme yolu ile almış olduğu SEA'nın süt yolu ile bebeğine geçmesi konuya daha fazla önem kazandırmaktadır.

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinin, 23.09.2002 tarihinde, 24885 sayılı resmi gazetede yayınlanan 2002/63 nolu, Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkındaki Tebliğ'inde, muhtemel risk oluşturmasına bağlı olarak, enterotoksinlerin sütte tespit edilmesi belirtilmiştir (Ref:<http://www.kkkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2002-63.html>). Yönetmelikte belirtilen ilgili madde gereğince enterotoksinler immünolojik test sistemleri (ELISA) ile tespit edilmektedir. ELISA test sistemlerinin geliştirilmesi, kitin en önemli unsuru olan monoklonal antikorların aktif bir şekilde elde edilmesine bağlıdır.

Bu kapsamda tez çalışmasında hücre kültür yöntemi ile SEA'ya karşı monoklonal antikorların elde edilmesi ve bu monoklonal antikorların kullanılması ile sütteki SEA miktarının hızlı, kolay ve ucuz bir şekilde tayin edilmesi amaçlanmaktadır.

Hücre kültür yöntemi ile monoklonal antikor üreten hibridomalar elde etmek için yararlı özelliklere sahip iki hücre polietilen glikol varlığında füzyon yöntemi ile birleştirildi. Hücre kültüründe hızla çoğalabilen, ölümsüzlük özelliği kazanmış myeloma (kanser) hücreleri ile aktif olarak istediğimiz antikoru üreten SEA ile immünize edilmiş farelerin dalak lenfositleri birleştirilerek SEA antijenine karşı monoklonal antikor üreten ölümsüz hibrit hücreler elde edildi.

Bu çalışma Avrupa Birliği 7. Çerçeve programı kapsamında önem arz eden çağrılar arasında yer alan "AB 7. ÇP, FP7- KBBE-2010-4 nolu" çağrı kapsamında 13 ayrı Avrupa Birliği ülkesi ile ortak hazırlanmış olan "Bridging mechanisms into risk assessment: an integrated European research network targeting contaminants in milk" başlıklı proje kapsamındaki bir iç paketini kapsamaktadır. Proje kapsamında SEA'nın tanısına yönelik spesifik monoklonal antikor geliştirilecektir.

1.2 Hipotez:

Hücre kültür yöntemi (Hibridoma teknolojisi) kullanarak SEA antijenini spesifik olarak tanıyacak monoklonal antikorları üreten hibridoma hücreleri geliştirmek.

2. GENEL BİLGİLER:

Dengeli ve yeterli beslenme, organizmamız için gerekli olan enerji ve besin öğelerinin düzenli olarak gerekli miktarlarda alınmasıdır. Yaşamımız için gerekli olan enerji ve besin öğeleri, besinler aracılığı ile vücudumuza alınmaktadır. Besinler, yeterli ve dengeli beslenme için dört gruba ayrılmıştır. Bu dört besin grubu et-et ürünleri, süt-süt ürünleri, ekmek-tahıllar ve sebzeler-meyvelerdir (Yılmaz, 2009).

Süt; insan, inek, koyun, keçi, manda ... gibi memeli canlıların meme bezlerinden salgılanan, kendisine has tadı, kokusu ve kıvamı olan, içine başka maddeler karıştırılmamış, içinden herhangi bir maddesi alınmamış, beyaz ya da krem renkli bir likit olarak tanımlanmaktadır. Her memeli canlının salgıladığı süt kendi yavrusu için en uygun besin olup yavrunun kendi kendisini besleyecek ya da ek besine başlaması gereken döneme kadar yavrunun alması gereken tüm besin öğelerini yeterli oranda bulduran bir besindir.

Süt ve süt ürünleri; özellikle kalsiyum ve fosfor başta olmak üzere bazı önemli mineraller, protein ve riboflavin gibi bazı B grubu vitaminlerin kaynağı olarak bakıldığında halk sağlığı açısından önemli bir besin grubudur. Süt proteinlerinin; vücutta büyümeye, gelişmeye katkısı, doku farklılaşmalarındaki etkisi, kalsiyum emilimi-immün fonksiyonlar üzerinde ki olumlu etkileri, kan basıncını düşürdüğü, kanser riskini azalttığı, vücut ağırlığının kontrolünde etkin olduğu, diş çürüklerine karşı koruyucu olduğu bilinmektedir (Yılmaz, 2009; Erol, 2004; Normanno, 2005).

Süt, beslenmede büyük öneme sahip olan temel besin maddelerinden biri olmasına karşın birçok mikroorganizmanın üremesi için de çok uygun bir ortam oluşturmaktadır. Süt memede bulunduğu sırada sterildir ancak sağım sırasında ve sağımdan sonra ki çeşitli evrelerde süte mikroorganizmalar bulaşabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda; süütün memede bulunduğu dönemde bile önemli olmayan miktarda, insanda hastalık etmeni olmayan mikroorganizmalar içerdiği belirlenmiştir. Süt sağıldığında mikrobiyolojik florası ne olursa olsun üç evrede mikroorganizmalar ile karşılaşabilmekte ve önlem alınmadığı sürece kontamine olabilmektedir. Bu evreler sırasıyla; hayvanın kendisinden gelen etmenler (meme kanalı, meme başları ve meme lobunun dış yüzeyi), sağım aletleri ve sütü tüketiciye ulaştırana kadar ki bekletme koşullarıdır. Bu evrelerin üzerinde titizlikle durulması gerektiği aksi halde tüketicinin çok ciddi problemlerle karşılaşacağı açıktır.

Yukarıda belirtilen evrelerin tümünü bir süreç olarak kabul ettiğimizde, hayvanın sağlığından başlayarak sağım esnasında kullanılan araç-gereçlerin ve sağım sonrası kullanılan saklama-taşıma kaplarının temizliğine azami ölçüde dikkat ederek sütte bulunması istenmeyen mikroorganizmaların üremesi kontrol altına alınabilir ya da en aza indirilebilir. Çiğ sütlerde bazı mikroorganizmaların bulunması çevresel kaynaklı kontaminasyonu ve(ya) hijyen koşullarının yetersizliğini gösterebilir. Ayrıca en iyi koşullar sağlanmış bile olsa, çeşitli evreler de süte mikroorganizmalar bulaşabilir. Sütün toplandığı ve işlendiği yerlerde, temizlemede kullanılan sular klorlanmış olsa bile mikroorganizma içerebilir. Sağım aletleri ve depolama tankları, işlenmemiş sütlerin mikroorganizma ile kontaminasyonu için önemli bir sebeptir. Sağım aletlerinin ve depolama tanklarının temizliğine dikkat ederek mikroorganizma üremesi kontrol altına alınabilir. Çiğ sütlerde bazı mikroorganizmaların bulunması yine çevresel kaynaklı kontaminasyonu ve hijyen koşullarının uygulanmadığını göstermektedir. Ayrıca bu mikroorganizmaların çiğ sütlerde üremeleri ve bulunma oranları mevsime bağlı olarak da değişiklik göstermektedir.

Sütün sağımından tüketiciye ulaşana kadar mikroorganizmalar için iyi bir üreme ortamı olduğu, sürekli göz önünde bulundurulmalıdır. Aksi takdirde sütün içinde bulunabilecek çok az sayıdaki mikroorganizma dahi hızlı bir şekilde (geometrik olarak) çoğalarak, sütün doğal özelliklerinin (görünüm, tat, besin değeri gibi) bozulmasına neden olur. Bu sütlerin tüketilmesi ise, insan sağlığını çok ciddi boyutlarda tehdit edebilmektedir. Ancak sütte bulunan her mikroorganizmanın hastalık etkeni olmadığı bilinmektedir. Sütte hastalığa neden olan ya da olmayan mikroorganizmaları genel hatlarıyla belirtmek gerekirse;

- Laktozu fermente eden bakteriler: Laktobasiller, streptokoklar, *Escherichia coli*.
- Proteolitik bakteriler: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus calidolaktis*, *Pseudomonas fluorescens*.
- Lipolitik bakteriler: *P. fluorescens*, *Pseudomonas lipolyticum*.
- Termofilik bakteriler: *Corynebacterium*, mikrokoklar, streptokoklar ve basillus cinsi.
- Psikrotrofilik bakteriler: *Pseudomonas* cinsi, *Serratia* cinsi, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *flavobacterium*.
- Anormal renge neden olan bakteriler: *Serratia marcescens*, *Pseudomonas syncyanea*, *Micrococcus ruseus*.

-Patojen bakteriler: *Brucella abortus*, *Streptococcus agalactica*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Staphylococcus aureus* olmak üzere sınıflandırmak olanaklıdır.

Süt yukarıda belirtildiği gibi hastalık etkeni olsun ya da olmasın birçok mikroorganizma üremesi için uygun bir ortamdır. İşlenmemiş süt içerisinde hastalık oluşturan mikroorganizmaların hiçbir koşulda bulunmaması gerekmektedir. *B. abortus*, enterokoklar, *M. Tuberculosis*. A grubu streptokoklar; *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* ve *Riketsiyalar* infekte sütle bulaşabilen mikroorganizmalardır (Yılmaz, 2009).

2.1 Stafilokokus Auerus ve Stafilokokal Enterotoksinler:

Staphylococcus terimi mikroskop altındaki karakteristik görünüşleri nedeniyle eski Yunancada üzüm salkımı anlamına gelen "staphyle" sözcüğünden türetilmiş ve ilk olarak İskoçyalı cerrah Alexander Ogston tarafından kullanılmıştır (Çayan, 2000; The British Medical Journal, 1929).

Stafilokoklar ilk kez Pasteur ve Koch tarafından gözlenmiş, ancak ayrıntılı çalışmalar ilk olarak 1881'de Ogston ve 1884'te Rosenbach tarafından yapılmıştır. Rosenbach, irinli yaralardan saf kültür olarak elde ettiği kolonilerin altın sarısı renginden dolayı *Staphylococcus aureus* adını kullanmış.

Stafilokoklar, sporsuz bakteriler içinde çevre şartlarına ve dezenfektanlara en çok dayanan, kültürlerde 4°C'de 2-3 ay, -20°C'de 3-6 ay dayanma süresine sahip mikroorganizmalardır. 60°C'de 30 dakikalık ısı işleme dayanabilirler. Antibiyotiklere karşı çok çabuk direnç oluştururlar. Sahip olduğu penisilinaz etkisiyle penisilin etkisini ortadan kaldırırlar (Yüce, 1992; Kloos ve Bannerman, 1995).

Sıvı besi yerlerinde çoğalmaları sonucunda bulanıklık ve çökelti oluştururlar. Katı besi yerlerinde, aerob ve anaerob ortamlarda kolayca üreyebilirler. Gram pozitif olan stafilokoklar, yaşlı kültürlerde gram negatif özellik verirler (Yüce, 1992).

S. aureus tarafından oluşturulan enterotoksinler; suda erir, termostabil yani 100°C'de 30 dakika dayanabilen özel süper antijen yapısında maddelerdir. Özellikle yüksek CO₂'li ortamda karbonhidrat ve proteince zengin besi yerlerinde üreyen stafilokoklar tarafından oluşturulurlar. Çok ciddi besin zehirlenmelerine ve toksik şok sendroma neden olan stafilokokal enterotoksinlerin (SE); SEA, SEB, SEC, SED, SEE enterotoksin grupları vardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN ve SEO enterotoksinleri de bildirilmiştir (Omoe K., 2002). SE'ler tek zincirli basit proteinlerden oluşan heterojen bir gruptur. Bunların çoğu nötral ya da bazik proteinlerdir. Hidroliz yoluyla 18 aminoasit üretirler ve yüksek oranda lizin, aspartik asit, glutamik asit

ve tirozin içerirler. Zincirde sadece iki adet yarım sistin rezidüsü ile bir veya iki adet triptofan molekülü bulunur (Jay, 1996; Jablonski, 1997; Bergdoll,1989). *Staphylococcus aureus* kökenlerinin %35-50'sinin bu toksinleri oluşturabildikleri saptanmıştır. Stafilocok kökenleri, bu toksinlerden yalnız birisini oluşturabildiği gibi bir kaçını birden de oluşturabilir. Bu toksinler insanlar dışında maymunlarda da etkili olup, diğer deney hayvanlarında bir etkileri olduğu saptanamamıştır (Koneman, 1997; Bilgehan, 2000). Daha çok et, süt ve ürünlerinde görülür. Stafilokokal enterotoksinlerin; en sık görüleni, en toksik olanı, en ısıya ve asite dayanıklı olanı stafilokokal enterotoksin A'dır.

Stafilokokal gıda zehirlenmeleri, enterotoksijenik özelliğe sahip stafilokokların gıdalarda 10⁶ (kloni oluşturan birim/gram) veya daha yüksek sayıya ulaşması sırasında sentezlenen bir ekzotoksin olan enterotoksinin, besin yolu ile alımı sonucu oluşmaktadır (Atanassova V., 2001). *Staphylococcus aureus* enterotoksijenik stafilokoklar içerisindeki en önemli türdür. *Staphylococcus aureus* süt-süt ürünlerinin yanı sıra et-et ürünlerinde de kontaminasyona neden olmaktadır. *S. aureus* dışında *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. epidermidis* türleri de enterotoksin oluşturma özelliğine sahiptir (Sutherland J., 2002).

2.1.1 Stafilokokal Enterotoksin A (SEA) ve Fiziksel–Kimyasal Özellikleri:

Stafilokokal Enterotoksin A; gram pozitif bir bakteri olan *Staphylococcus aureus* tarafından salgılanan, çok ciddi gıda zehirlenmelerinde sıklıkla rastlanılan toksin tipidir. *Staphylococcus aureus*'un salgıladığı diğer toksinler içerisinde SEA aside, ısıya ve antibiyotiklere en dirençli olanıdır.

SEA, 80 °C'de 3 dakika, 100 °C'de ise 1 dakika ısı uygulamasından sonra, serolojik olarak saptanamamıştır.

SEA, 27 kilodalton ağırlığında monomerik bir proteindir ve 2 asimetric üniteden oluşur, 3747 protein atomları ve 169 su molekülleri içerir. (Schad, 1995). Diğer stafilokokal enterotoksinlerin içerisinde en sık görüleni, aside ve ısıya en dayanıklı olanıdır. SEA'nın 80°C'de 3 dakika, 100°C'de ise 1 dakika ısı uygulamasından sonra, serolojik olarak saptanamamaktadır. Zenginleştirilmiş besi ortamında 37°C'de geliştirilen *S. aureus* suşlarının, 2 saat sonra tespit edilebilir düzeyde SEA oluşturabildiği saptanmıştır (Küçükçetin, 2007).

SEA'nın amino asit dizisi:

Stafilokokal Enterotoksin A'yı kodlayan *entA* geni, bir bakteriyofaj tarafından taşınmaktadır (Betley, 1985). Bu fajın, sirkularizasyonunu ve karşılıklı gen aktarımını bakteriyel kromozom içerisinde tamamladığı saptanmıştır. *entA* Geninin faj bağlanma bölgesine yakın bir yerde lokalize olduğu, 771 baz çiftinden oluştuğu ve 257 aminoasitlik

kısının *entA* prekürsörünü kodladığı bildirilmektedir. Bu yapıda 24 rezidülük bir N-terminal hidrofobik ön dizilimi işlenmekte ve 27,100 dalton moleküler ağırlığındaki SEA'nın son şeklini oluşturmaktadır (Çizelge 2.1.), (Betley,1988).

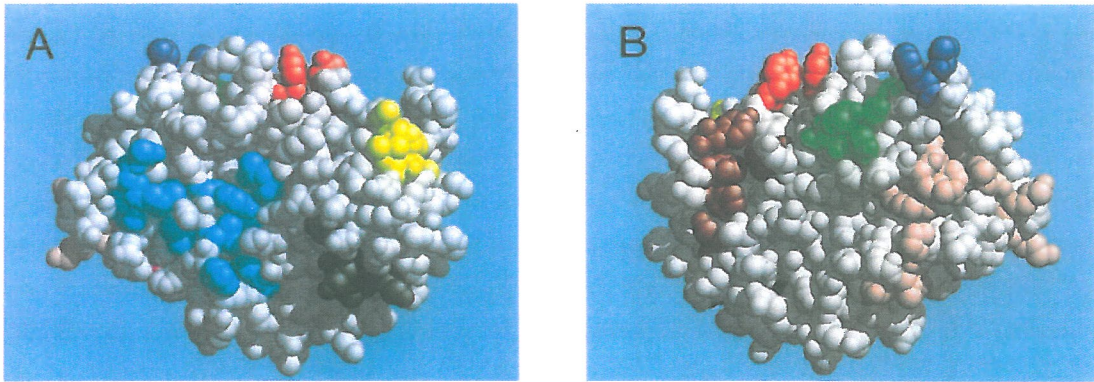
Çizelge 2.1. SEA'nın a.a Dizilimi (Sospedra, 2011).

Dizi Aralığı	Peptit Dizisi
1-10	SEKSEEINEK
4-13	SEEINEKDLR
14-27	KKSELQGTALGNLK
15-27	KSELQGTALGNLK
16-27	SELQGTALGNLK
28-35	QIYYINEK
28-37	QIYYINEKAK
42-55	ESHDQFLQHTILFK
56-74	GFFTD HSWYNDLLVDFDSK
75-83	DIVDKYKGGK
84-103	KVDLYGAYYGYQC*AGGTPNK
104-118	TACMYGGVTLHDNNR
104-118	TAC*MYGGVTLHDNNR
124-134	KVPINLWLDGK
135-144	QNTVPLETVK
135-147	QNTVPLETVKTNK
148-160	KNVTVQELDLQAR
149-160	NVTVQELDLQAR
161-166	RYLQEK
167-178	YNLYNSDVFDGK
215-233	DNKTINSENMHIDIYLYTS
218-233	TINSENMHIDIYLYTS



Şekil 2.1. SEA' nın Kristal Yapısı (Jones, 1991).

Basitleştirilmiş SEA molekülü. N-terminal ucu mavi, C-terminal ucu ise portakal rengi ile gösterilmiştir. İkincil yapı elementleri, ok ile gösterilenler beta sheetler ve spiraller ile gösterilenler alfa helixlerdir. Eflatun renkli küreler, kadmiyum iyonlarıdır, disülfid köprülerinin üzerinde bulunurlar (Şekil 2.1.) SEA 50X45X30 Å ebatlarında düz, sıkıca paketlenmiş 2 domainden oluşur (Jones, 1991). Şekil 2.2'de SEA' nın 3 boyutlu yapısı görülmektedir.



Şekil 2.2. SEA'nın 3 Boyutlu Yapısı

- A) SEA'nın 3 boyutlu yapısı. 1 den 8'e kadar olan kısımları sarı, mavi, kırmızı, koyu yeşil, pembe, açık mavi, yeşil ve kahverengi olarak gösterilmiş. Kadmiyum iyonu ise eflatun olarak gösterilmiştir. Rasmol ile çizilmiştir (Saqi,1994).
- B) SEA molekülünün 180 derece dikey ekseninde döndürülmüş şeklidir (Saqi,1994).

2.1.2 Enterotoksinlerin Süperantijen Aktiviteleri :

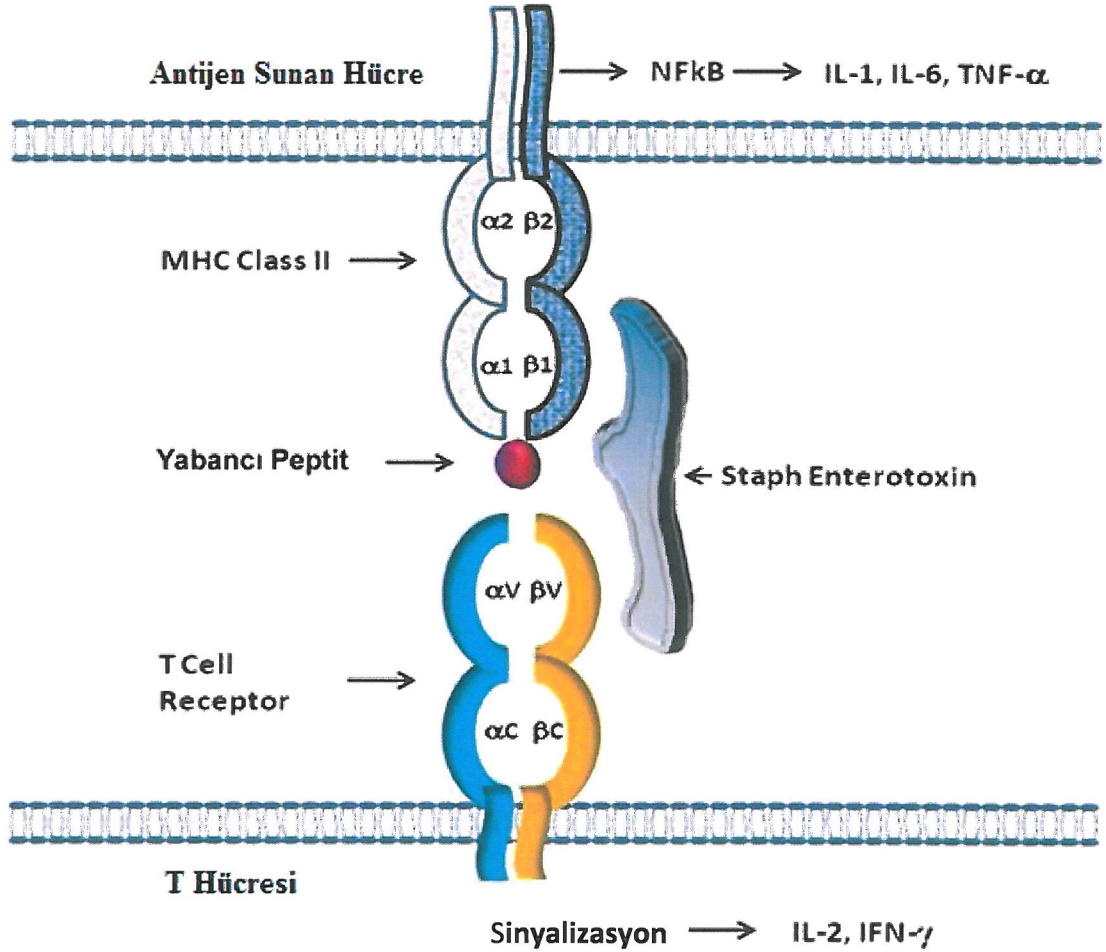
Deri, oral ve anal engelleri aşarak organizmaya girdiklerinde immün cevap oluşturabilen her türlü mikroorganizmaya antijen denir. Antijenler; protein, polisakkarid, lipid ya da peptid yapısında olabilirler. Antijenler ilgili antikoru ile tepkimeleri sonucunda, bağışıklık oluştururlar ve hastalıklara karşı direnç geliştirirler.

Süperantijen, enfeksiyona sebep olan patojenler tarafından meydana getirilen heterojen moleküllerdir. Süperantijenler, şimdiye kadar tanımlanan immunojenlerden çok daha az yoğunlukta bile T hücrelerini uyarabilme yeteneğine sahip olan bir grup bakteriyel ve viral proteindir. En iyi bilinen süperantijenler gram pozitif koklardan (*S. aureus*, *S. pyogenes*) salınan ekzotosinlerdir . T lenfositleri üzerine sıradışı mitojenik etkileri vardır.

Hücre içi immün cevapta, temel işlev membrana bağlı T hücre antijen reseptörleri (TCR-T cell reseptör) tarafından antijenin tanınmasıdır (Fields, 1996). TCR, alfa ve beta ya da gama ve sigma zincirlerinden oluşmaktadır. Antijen sunan hücrelerin (APC-Antigen Presenting Cell) üzerinde membrana bağlı proteinlerden MHC sınıf I ve sınıf II molekülleri yer alır (Fink, 1986). Süperantijenler MHC sınıf II molekülleri ve T hücre reseptörlerinin spesifik V β bölgelerine bağlanarak antijen sunan hücrelerin ve T lenfositlerin aktivasyonuna yol açmaktadırlar. Diğer bir ifadeyle süperantijenler, bilinen antijenlerden farklı olarak, antijen sunan hücreler tarafından küçük peptid parçalarına ayrılmadan MHC sınıf II moleküllerine bağlanır ve TCR ile bir trimoleküler form oluşturur (Munson, 1998).

SE'ler, APC üzerindeki MHC sınıf II'ye bağlanma ve T lenfositlerini aktive etme yetenekleri ile süperantijen prototipleri olarak karakterize edilirler. T lenfositlerini, T Cell Reseptor (TCR)'nin, TCR-V β genleri tarafından kodlanan değişken kısmı ile etkileşime girerek aktive ederler.

Süperantijenler, MHC class II ve TCR (T Cell Receptor)'nin hidrofobik kısımları ile etkileşime girerler (Şekil 2.3). Amino ucundaki metal koordinasyonu da T hücrelerinin proliferasyonu için önemlidir. SEA, SED, SEE, SEH, SEI, SEJ, SEK ve muhtemelen SEL ve SEM'nin MHC (Major Histocompatibility Complex) sınıf II molekülleriyle interaksiyonlarında proteaz aktiviteleri için çinko iyonuna (Zn^{+2}) gereksinimi bulunmaktadır (Pettersson, 2002). SEA süperantijeni, diğer süperantijenlere kıyasla MHC class II'ye en yüksek ilgi ile bağlanan süperantijendir. Çinko ile etkileşime giren Ser1, His187, His225 ve Asp227 olmak 4 amino asidi vardır. SEA'nın alanin yapısındaki mutageniz, SEA'nın MHC'ye 2 ayrı noktadan birlikte bağlandığını göstermektedir (Schad, 1995).



B hücre proliferasyonu sonucu antikor üretilir.

Şekil 2.3 TCR ve MHC Class II Bağlanması (Irina, 2010).

2.1.3. Stafilkokkal Enterotoksinler ve Gıda Zehirlenmesi:

Stafilkokkal gıda zehirlenmesi, enterotoksijenik stafilkokklar tarafından gıdada oluşturulan toksinlerin besin yolu ile alınması sonucu oluşur. Stafilkok enterotoksinin 1 mikrogram tüketilmesi besin zehirlenmesine neden olur. Stafilkokkal gıda zehirlenmesinde semptomlar 30 dakika ile 8 saatlik bir zaman arasında ortaya çıkmasına rağmen etkileri genellikle 2 ile 4 saat içinde görülür. Oral ya da intraduodenal olarak enterotoksin A bulaşması sonucunda jejunum ve duodenumda lenfosit, polymorphonuclear hücreler artar. Böylece hızlı emetik ve nerodavranışsal cevaplar oluşuyor (Taylor, 2010). Baş ağrısı, baş dönmesi, genel halsizlik, nabızda zayıflık, yüzeysel solunum, şok ve enteritis daha az görülen diğer semptomlardır (Halpin, 1989; Sutherland, 2002).

Kusma, stafilokokal gıda zehirlenmelerinde sıklıkla görülen bir semptomdur. Toksinlerin bağırsaktaki lokal sinir reseptörlerini uyarmasına bağlı olarak vagus ve sempatik sinirler üzerinden geçen impulsların beynin subkortikal kusma merkezine ulaşması sonucu emetik tepki oluşmaktadır (Sutherland, 2002). Stafilokokal gıda zehirlenmesinde ikinci en yaygın olarak görülen semptom diyaredir. Stafilokokal enterotoksinlerin intestinal hücreler üzerine direkt etkisi açık değildir ve bu yüzden kolera toksini veya *Escherichia coli* enterotoksinleri gibi klasik enterotoksinlerden farklıdır (Halpin, 1989; Sutherland, 2002).

Stafilokokal enterotoksinler (SE) gıda zehirlenmelerinin yanı sıra, toksik şok benzeri sendroma, artrit, alerjik reaksiyonlara ve otoimmün hastalıklara neden olmaktadır (Balaban, 2000; Krakauer, 1999).

Stafilokokal gıda zehirlenmesi olgularında ölüm nadirdir. Ancak çocuklar ve yaşlılarda ölüm oranının %0.03'ten, %4.4'e kadar değişebildiği bildirilmiştir. İntoksikasyon kendi kendini sınırlamakta ve 24-48 saat içerisinde hızlı bir şekilde iyileşme görülmektedir (Holmberg, 1984; Jay, 1996).

Toksin tipine bağlı olarak SE'nin dozu değişir. Genel olarak alınan gıdanın 1 gramında 1 nanogram SE bulunması belirtilerin ortaya çıkması için yeterli olmaktadır (Sutherland, 2002). Çoğu klasik kaynaklarda uzun yıllar minimum toksin dozunun 1 miligram veya daha az olarak bildirilmesine rağmen, 94-184 nanogram düzeyindeki SEA'nın okul çocuklarında intoksikasyona neden olduğu bildirilmiştir (Evenson, 2002).

Enterotoksijenik stafilokokların ve enterotoksinlerin gıdalar da varlığının hızlı ve erken belirlenmesi; toplum sağlığının korunması, toplumun üretilen gıdalara güvenmesi ayrıca epidemiyolojik çalışmalara yön göstermesi açısından son derece önemli olduğu kabul edilmektedir.

2.1.4 Stafilokokal Enterotoksinlerin Türkiye ve Dünyadaki Genel Durumu:

S. aureus, bir çok ülkede yaygın gıda zehirlenmesi olgularına neden olan ikinci veya üçüncü patojen olarak dikkati çekmektedir (Atanassova, 2001).

Kısa ve arkadaşları, Ankara'da yaptıkları bir çalışmada toplam 100 kremalı pasta numunesini incelemişlerdir. Sade kremalı örneklerin % 4'ünde, kakaolu kremalı örneklerin % 12'sinde ve meyveli kremalı örneklerin % 9'unda olmak üzere % 25 kremalı pastadan izole edilen koagulaz pozitif (+) stafilokokların enterotoksin oluşturma özelliğinde olduğunu tespit etmişlerdir. Krema imalatında çoğu zaman çiğ sütün hammadde olarak kullanılması nedeni ile, çiğ süttten imal edilen çeşitli ürünlerin de toplum sağlığı açısından önem arz ettiği göz ardı edilmemelidir (Kısa, 1996).

Sami Yılmaz'ı, Kayseri çevresindeki çeşitli mandıra ve işletmelerden gelen çiğ süt örnekleri ile ELISA yöntemi kullanarak yaptığı SE araştırmasında, çalışılan toplam 60 çiğ süt numunesinden; 19'un da SEA, 3'ün de SEB, 9'unda SEC, 6'sında SED tespit edilmiştir ancak hiç birinde SEE tespit edilmemiştir (Yılmaz, 2009).

ABD'de her yıl gıda kaynaklı hastalıklar nedeniyle 6-80 milyon insanın etkilendiği, bunların yaklaşık 9000'inin ölümlerine sonuçlandığı ve yıllık yaklaşık 5 milyar dolarlık ekonomik kayıp meydana geldiği bildirilmektedir (Buzby, 1997). Aynı ülkede stafilokokal gıda zehirlenmeleri sonucu üretim kaybı ve medikal masraflar nedeniyle yıllık yaklaşık 1.5 milyar dolar harcandığı bildirilmektedir (Todd, 1989).

Tkaaikova ve arkadaşları, Slovakya'nın güneyinde bulunan çeşitli tarımsal işletmelerden topladıkları 75 adet subklinik ve klinik olarak hasta olduğu belirlenen hayvanlardan aldıkları çiğ süt örneklerini incelemişlerdir. Bunlardan 32 adet *S. aureus* izolatu elde etmişler; 32 izolattan 15'nin SEC, 15'nin SED, ikisinin SEA ve SEB enterotoksin kodlayan genleri taşıdıklarını tespit etmişlerdir (Tkaaikova, 2003).

Normannoa ve arkadaşları, İtalya'da marketlerden aldıkları 11384 gıda örneklerini koagülaz pozitif *S. aureus* varlığı yönünden incelemişlerdir. Bu gıdalar içerisinde bulunan 437 adet çiğ süt örneğinden; 168 adedinin, 102 ısıtılmış süt örneğinden iki adedinin koagülaz pozitif *S. aureus* içerdiğini tespit etmişlerdir (Normannoa, 2005).

Jorgensen ve arkadaşları, Norveç'te gıda zehirlenmesinden sorumlu olduğundan şüphelenilen ve çiğ inek sütü kullanılarak yapılmış olan patates püresinde 8×10^8 (kloni oluşturan birim/gram) düzeyinde *S. aureus* tespit etmişleridir. Araştırmacılar çiğ sütün elde edildiği işletmenin süt tankından almış oldukları örneklerde de aynı etkeni izole etmişlerdir (Jorgensen, 2005).

Tüm bu çalışmalar; beslenmemizde önemli bir yere sahip olan sütün, tüm dünyada stafilokokal enterotoksinler tarafından ciddi anlamda kirletildiği çizelge 2.2.'de görülmektedir.

Çizelge 2.2. Dünyada SE Dağılımı (Cretenet, 2011).

Ülke	Yıl	Numune Sayısı	Besin Cinsi	SE Cinsi	Sütün Cinsi
Amerika	1884	Belirtilmemiş	Peynir	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş
Amerika	1958	200	Peynir	Belirtilmemiş	Çiğ
Amerika	1965	Belirtilmemiş	Peynir	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş
Kanada	1977	12	Peynir	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş
Kanada	1980	62	Lor	SEA ve SEC	Belirtilmemiş
Amerika	1981	16	Peynir	Belirtilmemiş	Pastörize Edilmiş
İngiltere	1983	2	Peynir	Belirtilmemiş	Pastörize Edilmiş
Fransa	1983	20	Peynir	SEA ve SED	Çiğ
İskoçya	1984	27	Peynir	SEA	Çiğ
İskoçya	1985	2	Keçi Sütü	Belirtilmemiş	Çiğ
Amerika	1985	860	Çikolatalı Süt	SEA	Pastörize Edilmemiş
İsrail	1987	3	Keçi sütü	SEB	Çiğ
İngiltere	1988	155	Peynir	Belirtilmemiş	Pastörize Edilmemiş
Brezilya	1994	7	Peynir	SEH	Belirtilmemiş
Fransa	1997	140	Peynir	Belirtilmemiş	Çiğ
Fransa	1997	140	Peynir	Belirtilmemiş	Çiğ
Fransa	1998	62	Peynir	Belirtilmemiş	Çiğ
Fransa	1998	37	Yarı Sert Peynir	Belirtilmemiş	Çiğ
Japonya	2000	13420	Süt Tozu	SEA ve SEH	Belirtilmemiş
Fransa	2001	4	Yumuşak Peynir	SEA	Belirtilmemiş
Fransa	2001	46	Yarı Sert Peynir	SED	Çiğ
Fransa	2002	104	Koyun Sütünden Peynir	SEA	Çiğ
Fransa	2009	23	Peynir	SEE	Pastörize Edilmemiş

2.1.5. Stafilocokal Enterotoksin A'nın Tespiti:

Staphylococcus aureus'un izolasyonu ve toksininin belirlenmesi için güvenilir, hızlı, basit, hassas ve analitik bir metot kullanmak gerekmektedir. Son dönemlerde, enterotoksijenik *Staphylococcus aureus* identifikasyonu için Polymerase Zincir Reaksiyonu (PCR) gibi gelişmiş ve hızlı tekniklerden yararlanılmaktaysa da SEA'nın rutin analiz tespitine yönelik piyasada TRANSIA, RIDASCREEN, Reverse Passive Latex Agglutinationassay (RPLA), TECRA, VIDAS gibi çeşitli ticari test kitleri bulunmaktadır. Kitlerin hepsi, özel antikorların immünolojik olarak tanınması temeline dayanıyor. Bir grup kitlerde; RPLA -üzeri antikor kaplı latex boncuklar- tekniği kullanılırken, ikinci grup kitlerde ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tekniği, en son üçüncü grup kitlerde ise ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) tekniği kullanılmaktadır. Ancak bu ticari test kitleri 0,5(nanogram/gram)'dan daha düşük konsantrasyonlardaki enterotoksinlerin değerlerinin belirlenmesi için yeterince hassas değiller. Bu nedenle enterotoksin konsantrasyonunu belirlemede örnek materyalin konsantrasyonu da önemlidir. *Staphylococcus aureus* enterotoksinlerinin saptamasında en kolay, hızlı ve güvenilir

yöntemin Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) metodu olduğu kabul edilmektedir (Kısa, 1996; Betley, 1988; Borst, 1994; Betley, 1985; Cretenet, 2011) (Çizelge 2.3.'de görülmektedir).

Çizelge 2.3. Stafilokokal Enterotoksinlerin Tespitine Yönelik Kitler (Cretenet, 2011).

Tespit Kiti	Teknik	Tespit Edilen SE	Analiz Zamanı (saat)	Hassaslık (ng.mL ⁻¹)
TECRA Unique SET	ELISA	SEA to SEE	4	0.5-1.25
RIDASCREEN	ELISA	SEA to SEE	2.5	0.1-0.75
TRANSIA plate SET	ELISA	SEA to SEE	1.5	0.2
Oxoid SET-RPLA	RPLA	SEA to SED	20-24	0.5-1.0
Biomerieux VIDAS SET2	ELFA	SEA to SEE	1.5	0.25-0.5

ELISA: Enzyme Linked Immonosorbent Assay, RPLA: Reverse Passive Latex Agglutination, ELFA: Enzyme Linked Fluorescent Assay.

2.2. Bağışıklık Sistemi:

Vücudumuz son derece kompleks bir immün sistem tarafından korunmaktadır. Antijen adını verdiğimiz her türlü hücre dışı ajan; (virüs, bakteri...) anal, oral ya da deri engelini aşarak vücudumuza girdiğinde, timus, kemik iliği, lenf bezleri ve dalak gibi immün sistem merkezlerinde bulunan makrofajlar, fagositler, B ve T lenfositleri adını verdiğimiz immün sistem hücreleri harekete geçerek bu antijene karşı özel antikor üretimini sağlarlar. Makrofajların ve fagositlerin yetersiz kaldığı durumlarda lenfositler harekete geçerler. T lenfosit hücreleri antijenleri yok etmeye çalışırken, B lenfosit hücreleri bu süreçte immüoglobulinleri sentezlemeye başlarlar. Vücudumuza giren her türlü antijen immün sistemimizin B hücreleri tarafından sentezlenen antikor yardımı ile bertaraf edilmeye çalışılır. Antijenlerin bir kısmı zararlı iken, bir kısmı da zararsızdır. Hastalığa yol açan zararlı antijenlere patojen denir. Her antijenin kendisine özel antikoru vardır (Anahtar kilit modeli ile birbirlerine uyarlar). Herhangi bir antijene özel antikor vücudumuzda üretildiği zaman hafızaya alınır. Aynı antijen organizma ile ikinci kez karşılaşıldığında, ilgili antijene karşı hızlı bir şekilde antikor üretilir. Vücudumuz antijenlere karşı 3 türlü cevap oluşturur.

1) Doğuştan Gelen Doğal (Innate) Bağışıklık: Bireyler doğduktan sonra, buldukları ortama göre hayatlarının ilk anlarından itibaren hastalık yapma güçleri ve türleri birbirlerinden çok farklı antijenlerle, bunların toksik ürünleri ya da antijenik materyalleri ile karşılaşılır.

İmmün sistem için yabancı olan bu antijenler, vücudumuza girdiğinde, doğuştan gelen doğal bağışıklık sistemini harekete geçirirler. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından üretilen antikorlar, bir patojene karşı uzun süreli bir bağışıklık sağlamaz diğer bir deyiş ile tekrar aynı antijen ile karşılaştığında bu antijeni tanıyıp, ona karşı antikor üretmez. Vücut savunmasında ki en baskın bağışıklık sistemidir (Litman, 2005).

Doğal bağışıklık sisteminde yer alan hücreler; fagositik etkiye sahip makrofajlar, nötrofiller ve doğal öldürücü hücrelerdir.

2) Pasif Bağışıklık: Başka bir canlı tarafından oluşturulmuş koruyucu antikorların, diğer bir canlıya aktarılmasıdır. Anne sütü ve antikor bakımından zengin kan serumu pasif bağışıklık için iki güzel örnektir. Yeni doğan bebekler, kendi antikorlarını sentezlemeye başlayana kadar anne sütünden gelen antikorlar ile bağırsak enfeksiyonlarına karşı korunurlar (Van de Perre, 2003; Margaret, 2000).

Pasif bağışıklık sistemi tarafından üretilen antikorlar, uzun ömürlü olmaz ve genellikle 2-3 ay sonra ölürler.

3) Sonradan Kazanılmış (Adaptive) Bağışıklık: Bir canlıda antijen verilerek oluşturulan antikorların, korunması istenilen canlıya aktarılması yolu ile kazanılan bağışıklıktır. Sonradan kazanılmış bağışıklık, hastalıkları tam olarak önlemese de semptomlarının hafifletilmesi yönünden oldukça önemlidir.

Kazanılmış bağışıklık sisteminde lenfositler hatırladığı her bir antijene özgül yanıt vererek immün hafıza oluştururlar (Pancer, 2006). Hafıza hücreleri sayesinde antijen ile tekrar karşılaşıldığında çok çabuk antikor üretilir. Aşı, sonradan kazanılmış bağışıklık için çok güzel bir örnektir.

Kazanılmış bağışıklık sisteminde 2 türlü yanıt oluşturulur.

1) Antikor yanıtları: İmmünoglobulinleri sentezlemek amacı ile B lenfosit hücreleri stimüle edilir. İmmünoglobulinler, kan ve vücut sıvılarında dolaşmak sureti ile antijene bağlanarak antijeni inaktif hale getirirler.

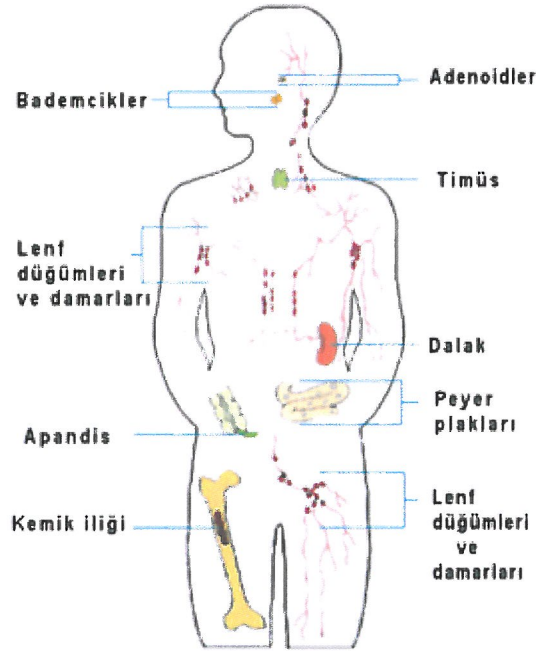
2) Hücre aracılı yanıtlar: Aktive edilmiş T lenfosit hücreleri, kendilerine sunulan antijenlere karşı doğrudan reaksiyon gösterirler. Daha sonra gönderdikleri sinyaller ile antijenleri, fagosite etmeleri amacı ile makrofajları aktif hale getirirler (Brum, 1994; Cummings, 1996).

Bu cevaplar sırası ile B ve T lenfositleri aracılığı ile oluşturulur. (Janeway, 2005)

2.2.1. Başışıklık Sisteminde Görev Yapan Organlar:

1) Primer Organlar: Primer organlar, antijen tarafından uyarılmaksızın immün sistem hücrelerinin üretebilen başışıklık sistemi organlarıdır. Primer başışıklık sistemi organlarına en güzel iki örnek kemik iliği ve timustur .

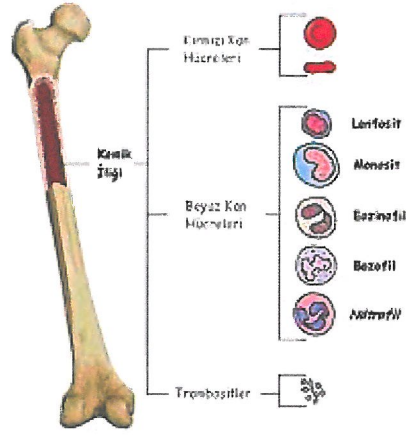
2) Sekonder Organlar: Primer organlarda üretilmiş olan immün sistemin hücrelerinin, antijenler ile karşılaştıkları ve antijenlere özgülü yanıtın gerçekleştiği immün sistemi organlarıdır. İnsanda sekonder başışıklık sistemi organları; tonsiller, dalak ve lenf düğümleridir (şekil 2.4.).



şekil 2.4. Başışıklık Sistemi Organları (<http://tr.wikipedia.org>).

2.2.2. Başışıklık Sistemi Hücreleri:

Başışıklık sistemi hücreleri; kemik iliğindeki kendi kendini rejenere eden, değişik sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin etkisi ile farklılaşma yeteneğine sahip bir kök hücreden meydana gelirler (Kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri, trombositler) (şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Kemik İliği Türevli Hücreler.

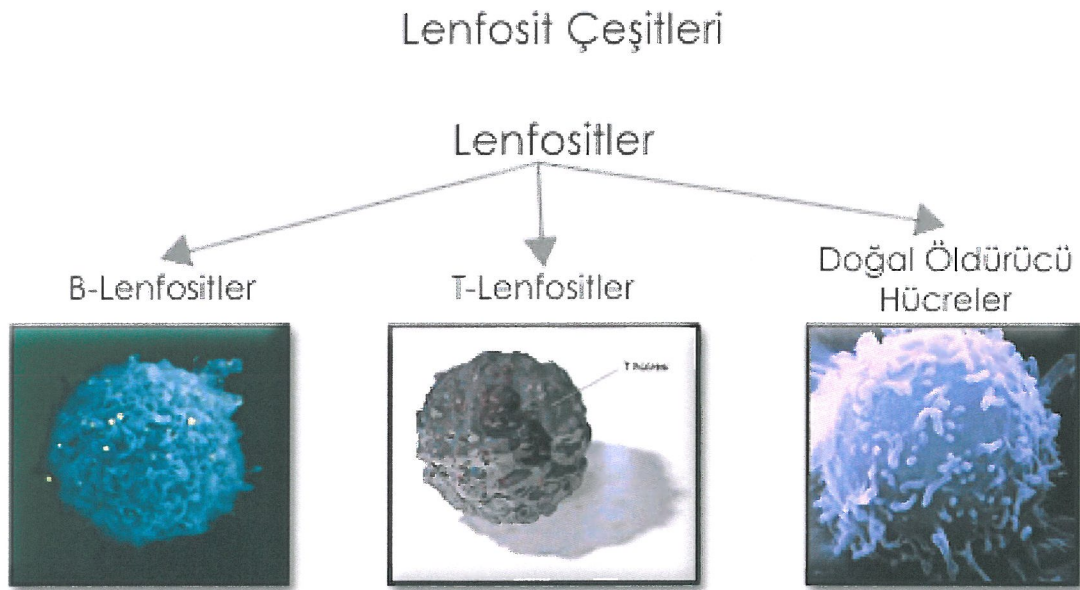
(<http://www.sporaleti.net>)

Lenfoid öncüsü hücreden kökenlenen lenfositler; doğal öldürücü hücreler, T ve B lenfositler olmak üzere 3 gruba ayrılırlar (Şekil 2.6.).

1) Doğal öldürücü hücreler (NK): Vücudumuzda bulunan toplam lenfositlerin % 10'unu oluştururlar. Enfekte olmuş hücrelere, virüslere ve tümör hücrelerine karşı savaşmada önemli rol oynarlar. Doğal bağışıklığın önemli bir kısmını oluştururlar.

2) T Lenfositler: Vücudumuzda bulunan toplam lenfositlerin % 80' nini oluştururlar. Hücresel bağışıklıkta, B lenfositlerini aktive etmede önemli rol oynarlar.

3) B Lenfositler: Vücudumuzda bulunan toplam lenfositlerin % 10'unu oluştururlar. Antikor üretiminde ve humoral bağışıklıkta etkin rol oynarlar.



Şekil 2.6. Lenfosit Çeşitleri

(<http://www.alvimedica.com.tr>)

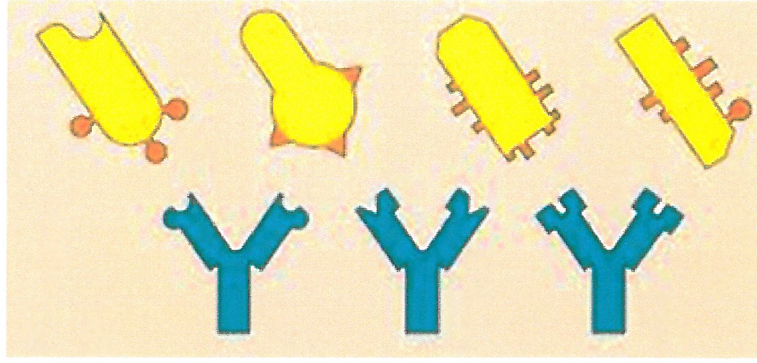
2.3 Antijenler:

Organizmanın kalıtsal yapısına yabancı olan ve organizmaya girdiğinde kendine özgü immün cevaba yol açan, immün cevap sonucu ortaya çıkan ürün ve hücrelerle özgül olarak birleşme özelliğindeki maddelere (bakteri, virüs, mantar, bakteri ...) antijen veya immünojen denir. Canlının vücudunda humoral veya hücresele bağışık yanıt oluşturan, etkili koruyucu bağışıklık oluşmasını sağlayan maddelere immünojen denir. Kendisine karşı oluşan antikörlerle özel şekilde birleşme yeteneğinde olan maddelere ise antijen denir. İmmünojenlerin tümü antijenik özelliğe sahiptirler ancak tüm antijenler immünojen özellik göstermezler. Örneğin; tek başlarına yeterli immünojenik güçte olmayan ancak taşıyıcı bir proteine bağlandığında immün cevap oluşturan ve immün cevap sonucu oluşan antikörlerle özgül olarak birleşen hapten antijenleri, proteine bağlı kompleks formunda iken iyi bir immünojen özelliği gösterirler. İyi bir immünojen;

- B hücreleri yüzeyindeki antikör molekülleri tarafından tanınabilecek bir epitopa sahip olmalıdır,
- T hücre reseptörlerince ve MHC sınıf II proteinlerince aynı zamanda tanınabilecek bir yapıya sahip olmalıdır,
- Parçalanabilir özellikte olmalıdır.

Güçlü bir antikör cevabı için gereken bu özelliklerin yanı sıra; antijenin kimyasal yapısının kompleksliliği-stabilitesi, organizmaya verilmiş şekli, organizmada absorblanma-vücuttan atılma süreleri, antijenin organizmadaki miktarı, antijenin enjekte edildiği organizmanın türü ve yaşı da iyi bir immünojenlik için göz önünde bulundurulması gereken faktörlerdir. Her çeşit biyolojik molekül (basit ara metabolitleri içeren) şeker, lipid, hormon, karbonhidrat, fosfolipit, nükleik asit ve protein gibi makromoleküller antijen rolü görmektedir.

Antijen molekülünde antikörlerle belli grupları ile birleşen, bu suretle antijenin özgüllüğünü belirleyen “*antijeni belirleme determinantları*” veya “*epitop*” adı verilen kimyasal gruplar bulunur. Antikör molekülünde bulunan, epitopa uygun özgül uçlara da “*idiyotip*” adı verilmektedir. Epitoplar, tüm antijen molekülünde belirli küçük bir bölgeyi kapsarlar ve üç boyutlu bir yapı oluştururlar. Bunlar, protein karakterinde olan antijenlerde 6-10 aminoasitten, polisakkarit yapıdaki antijenlerde 6-8 karbonhidrat molekülünden oluşurlar. Bir antijen molekülünde, aynı ya da değişik kimyasal yapıda birden çok epitop bulunabilir. Bu şekilde aynı molekül birden çok antijenlik özgüllüğü gösterebilir ve her bir epitop kendine özgü antikör ile birleşebilir (Abbas, 2000; Skaletsky, 1997). Şekil 2.7’de antijen-antikör bağlanma bölgeleri şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.7 Antijen-Antikor

(<http://www.web-books.com/eLibrary/Medicine/Physiology/Immune/Antigen.htm>)

Sarı: Antijen, Portakal Rengi: Epitop, Mavi: Antikor

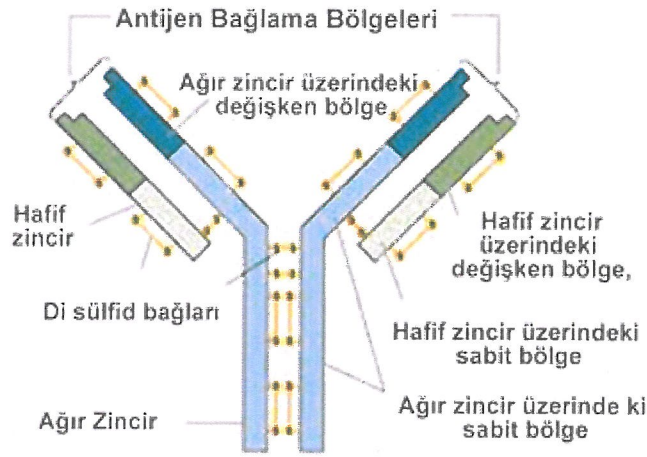
2.4. Antikorlar:

İmmünglobulin molekülleri (Antikorlar), organizmanın kalıtsal yapısına yabancı olan antijenlerin organizmaya dâhil olduğunda bağışık cevapta yer alan özgül B lenfosit hücrelerince salgılanan glikoprotein yapısındaki makro moleküllerdir. İmmünojenik uyarılar sonucunda vücutta meydana gelen plazma hücreleri tarafından sentezlenen, homolog antijeni ile spesifik reaksiyon verebilen, genelde vücuda giren yabancı antijenlere cevap olarak üretilen bu moleküllere “antikorlar” ya da daha genel anlamı ile “immünoglobülinler” adı verilir (Cummings, 1996).

Antikorlar, immünojen antijenin bütününe karşı üretilmez. İmmünojen antijenin, epitop bölgesinde ki birden fazla ve farklı şekillerde olan peptit dizilerine uygun olarak üretilirler.

2.4.1. Antikorum Yapısı ve Çeşitleri:

Antikorlar; 2 adet monomer yapıdaki ağır zincir (heavy chain) ve 2 adet monomer yapıdaki hafif zincir (light chain) olmak üzere toplam 4 polipeptit zincirinden oluşan, Y şekilli moleküllerdir. Ağır zincir, toplam 440 amino asitten oluşan 4 domain içerir. Hafif zincir ise, toplam 220 amino asitten oluşan 2 domain içerir. Hafif zincir; bir değişken, bir sabit; ağır zincir ise bir değişken, bir de iç kısımda sabit bölge içerir. Hafif ve ağır zincirlerin amino ucunda yer alan kısımlarına değişken bölge (variable domain), bu bölgenin dışındaki kısımlarına ise sabit bölge (constant domain) denir. Antikorum değişken bölgesi; antikordan antikora en fazla değişkenlik gösteren, antikorum antijen bağlamada görevli kısmıdır. İki ağır zincirin sabit kısımları disülfid köprüleri ile birbirlerine bağlanırlar (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. Antikoru Yapısı

Antikor molekülü, glikoprotein yapısında olup, lamda ve kapa olmak üzere 2 çeşit hafif zincir; IgA, IgD, IgE, IgG, IgM olmak üzere 5 çeşit ağır zincirden meydana gelir.

IgA: 400 Kilodalton ağırlığındadırlar ve 472 amino asitten meydana gelirler. Gözyaşı, salya, sindirim ve solunum sistemlerindeki mukus yapılarında bulunurlar. Dolayısı ile ağız, deri ve solunum yolu ile vücuda giren immünojenlere karşı ilk savunmada yer alırlar. IgA antikoru, midede sindirilmesini önleyen özel bir yapısı vardır ve bu yapısı ile diğer antikor türlerinden ayrılırlar. Bu özelliği ile ağız içerisinden idrar yollarına, gözyaşı kesesinden yeni doğum yapmış annenin ilk sütü olan kolostruma kadar pek çok hassas bölgede vücudu enfeksiyonlardan koruyacak şekilde yer alırlar.

IgD: 180 Kilo dalton ağırlığındadırlar. B lenfositlerinin yüzeyindeki antijeni tanıma ve sinyali aldıktan sonra hücre içerisine iletmede Ig M ile önemli bir rolleri vardır.

IgD, olgunluğa erişmemiş B lenfosit hücrelerinin plazma zarlarından sentezlenen monomerik antikoru izotipleridirler. Sentezlenen IgD, iki adet ağır ve iki adette hafif zincirden meydana gelir.

IgE: Parazit olarak yaşayan ve allerjik reaksiyonlara neden olan mikroorganizmalar, mast hücreleri ve bazofil hücrelerinin plazma zarlarına yapışarak bu hücrelerin başta histamin, heparin olmak üzere çeşitli kimyasal maddeler salgılamalarını uyaran antikorlara IgE adı verilir. 188 Kilodalton ağırlığındadırlar. Astım ve ürtiker gibi allerjik reaksiyonlarda miktarları 100 katına kadar artabilir.

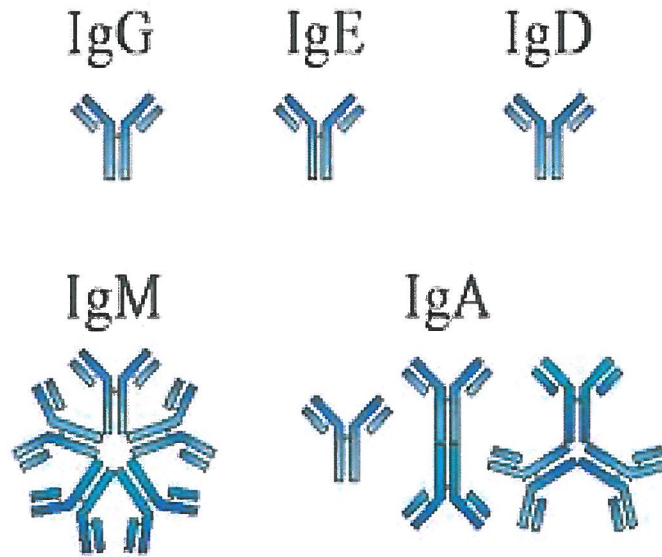
IgG: 150 Kilodalton ağırlığındadırlar. İki adet ağır, iki adette hafif olmak üzere toplam dört peptid zincirlerinden meydana gelirler. Her IgG, iki adet antijen bağlama bölgesine sahiptir. Diğer tüm immüoglobulinler polimer yapılı olmalarının karşın bir IgG'ler monomer yapıdadırlar.

İnsan serumunda bulunan tek immüoglobulin çeşididir. Dolayısı ile anneden fetuse geçerek fetusun doğuştan gelen (innate) bağışıklığını oluştururlar.

IgM: 10 adet ağır μ - zincirinden ve 10 adette kapa zincirinden meydana gelmektedirler. Moleküler ağırlıkları 900 Kilodaltondur. Diğer immüoglobulinlerle karşılaştırıldığında en büyük immüoglobulin molekülüdür. Disülfid bağları ile birbirine bağlanmış beş immunoglobulinden meydana gelirler. Salgılanabilinen ve B hücrelerinin yüzeyinde bulunan tek immüoglobulin çeşididir.

Organizmanın enfekte olmasından sonra, organizmaya giren immünojeni yok etmek üzere meydana gelen özel bir antikor tipidir. Enfeksiyonun, logaritmik fazdan sonra durağan faza geçmesi ile birlikte yerini IgG' ye bırakır.

İmmüoglobulin molekülleri Şekil 2.9.'da görülmektedir.



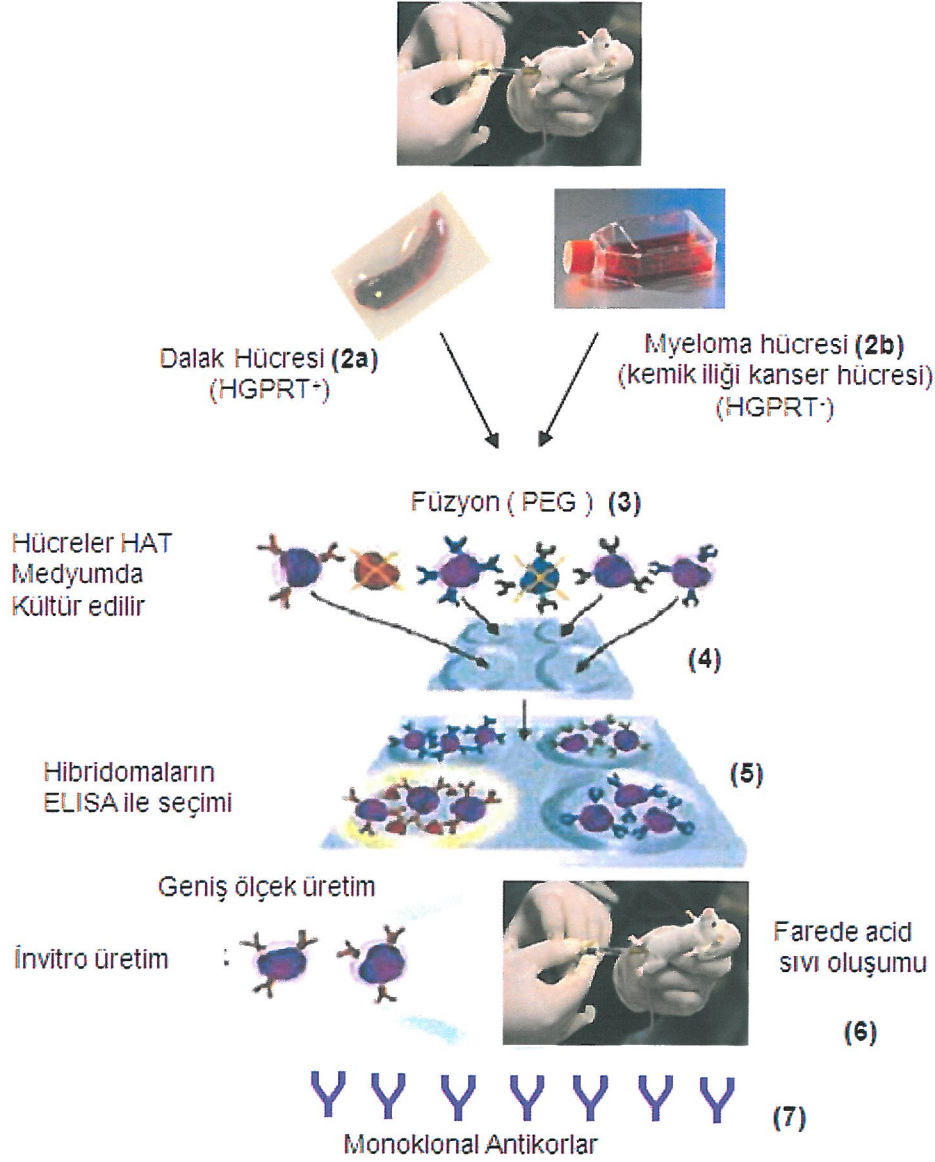
Şekil 2.9. Immunoglobulinler

2.4.2. Monoklonal Antikorlar:

Monoklonal antikor üretimi ilk kez 1975 yılında Georges Köhler, César Milstein ve Niels Kaj Jerne tarafından gerçekleştirildi. Bu bilim insanları, monoklonal antikor üretim tekniği ile 1985 yılında nobel ödülüne layık görüldüler.

Yalnızca tek bir epitopa karşı reaksiyon gösteren ve yalnızca bir B lenfositine dayanan hücre klonundan elde edilen antikorlara, monoklonal antikorlar denir. Farelerin immünizasyonu sonucu elde edilen monoklonal antikorların, myeloma hücreleri ile füzyon edilmesi sonucu hibrit hücreler oluşur (Şekil 2.10). Klonlanan hibridomalar birbirleri ile aynı genoma sahip antikorlar üretirler (Yücel, 2010).

Antijen ile farelerin bağışıklanması (1)



Şekil 2.10. Monoklonal Antikorların Hazırlanmasının Şematik Gösterimi; **1**-Fare, antijene karşı antikor üretimini ortaya çıkarmak için ilgili antijen ile immünize edilir, **2a**-Dalaktan, antikor üreten B lenfosit hücreleri izole edilir, **2b**-Fare kemik iliği kanser hücresi olan myeloma hücreleri toplanır, **3**-Hibridoma oluşturmak için PEG aracılığı ile hücreler birleştirilir. Birleşmeyen hücreler ölür, **4**-Hibridomalar kültür plaklarında bölünmek üzere bırakılırlar, **5**-Antikor sentezleyen klonlar ELISA yöntemi ile belirlenir, **6**-Hibridomalar *invitro* (hücre kültürü) veya *invivo* (farede acid fluid oluşumu) koşullarda geniş ölçekte üretilir, **7**-Fare acit sıvıdan veya kültür üst sıvılarından antikorların saflaştırılması (Yücel F., 2010).

Monoklonal antikorlar; pasif aşı üretimi, spesifik antijenlerin sebep olduğu hastalıkların teşhisinde ve kanser tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Kanser hücrelerinin, yüzeyindeki antijenleri tanıyarak onları bloke eder ve kanser hücrelerinin büyümesi ve yayılması durdurulmuş olur. Monoklonal antikorlar, antijenlere spesifik antikorlar olduğu için antijenleri tanıyarak hastalıkların teşhisinde önemli rol oynarlar.

Monoklonal antikorların poliklonal olanlara olan üstünlükleri, sadece tek bir epitopa özgü olmaları ve bir kaynağa bağlı olmadan sonsuz üretim kapasitesine sahip olmalarıdır. Poliklonal antikor üretiminde, antikor kaynağı olan hayvanın ölmesi antikor üretiminin durması anlamına gelir. Monoklonal antikorlar, hibridoma hücrelerinin hücre kültür ortamında sürekli üretilmesi ile elde edilirler.

Monoklonal antikorlar, antijenin yerini ve türünü belirleyebildiklerine göre toksinin olup- olmadığı hatta miktarı konusunda da bizlere yardımcı olurlar.

2.4.3. Poliklonal Antikorlar:

Birçok farklı B lenfosit klonu ile üretilen, hepsi aynı antijenin farklı epitopuna bağlanabilen antikorlara poliklonal antikorlar denir. Yani farklı B hücrelerinden meydana gelen, tek bir antijene karşı üretilen, her biri farklı bir epitopa özgü çeşitli immunoglobülin karışımlarıdır. Fare, sıçan, tavşan gibi hayvanların immunizasyon tekrarları ile kan serumunda miktarları artar. Kan serumundan elde edilirler.

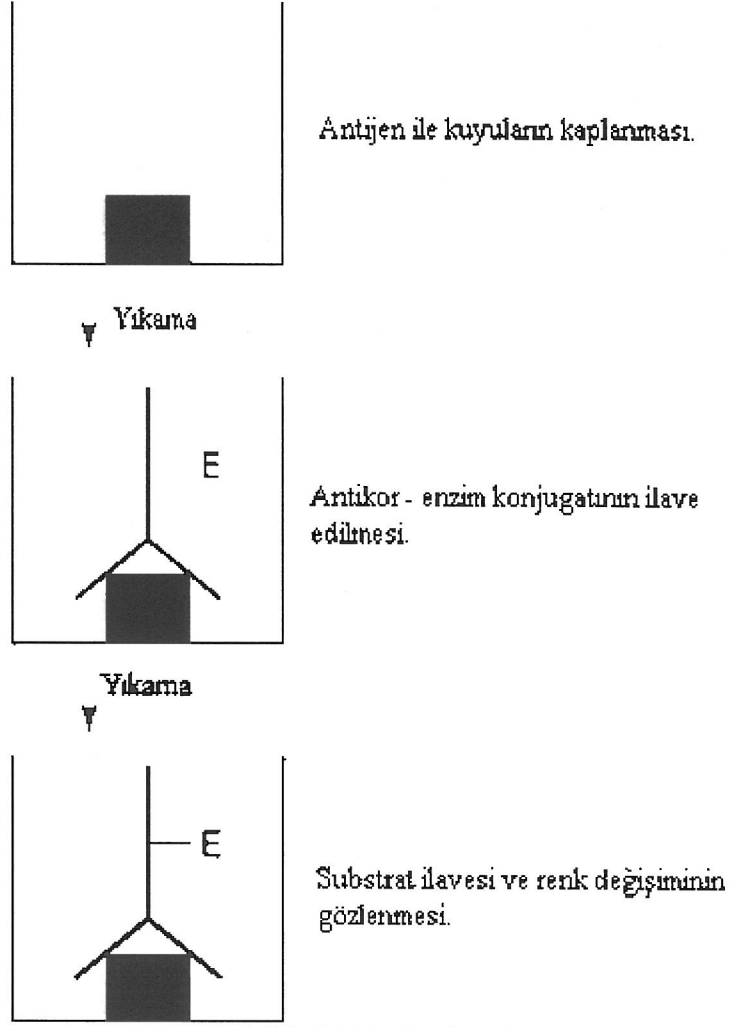
Bir antijen, bir organizmaya dâhil olduğunda, farklı antikor taşıyan farklı B hücreleri bu antijenin farklı epitopları ile etkileşime girerek aktif hale gelirler. Aktif hale geçen B hücreleri, bu antijenin tüm epitoplarına bağlanabilecek farklı antikorlardan çok sayıda üretirler.

Fare yada tavşanın bir- iki hafta ara ile birkaç defa aynı antijen ile immunize edilmesi, immunize edilmiş hayvandan kan alınması, alınan kanın santrifüj edilmesi yolu ile poliklonal antikorlar elde edilir.

2.5 Bağışıklık Yanıtının Kontrolü ve ELISA Çeşitleri:

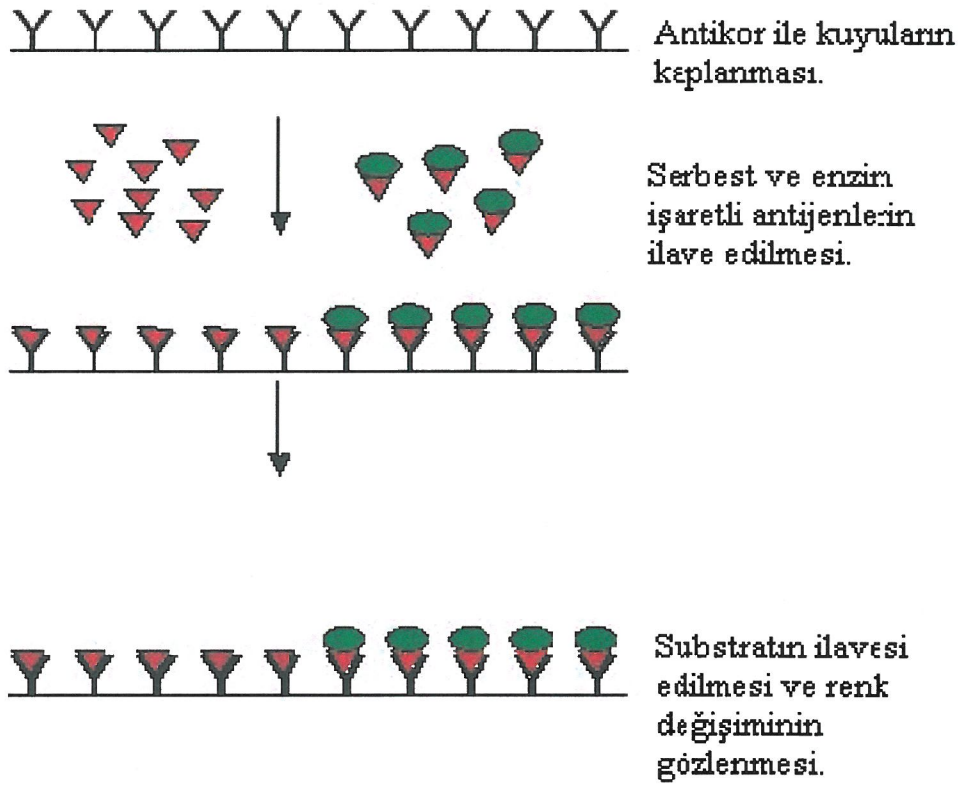
Monoklonal antikorların belirlenmesinde dört farklı ELISA çeşidi kullanılmaktadır.

1. Doğrudan (Direkt) ELISA: Saflaştırılmış monoklonal antikorlar alkalen fosfataz enzimi ile birleştirildikten sonra ikinci antikora gerek kalmadan direkt ELISA'da uygulanır (Şekil 2.11.).



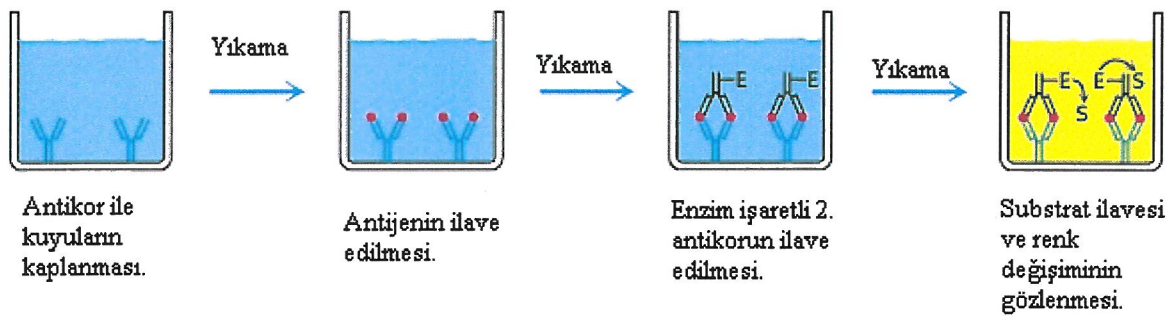
Şekil 2.11. Doğrudan ELISA

2. Yarışmalı (Competitive) ELISA: ELISA plağına yani katı faza bağlanan antikora bağlanmak için; serbest antijen ve enzimle konjuge edilmiş antijenin birbirleriyle yarışması esasına dayanan ELISA yöntemidir. Serbest antijen miktarı arttıkça zemindeki antikora bağlanacak olan antijen miktarı azalacaktır. Buna göre serbest olarak eklenen antijen miktarı arttıkça, zemine bağlı antikorun antijene bağlanma oranı düşeceğinden ELISA testi negatif sonuç vermektedir (Şekil 2.12.).



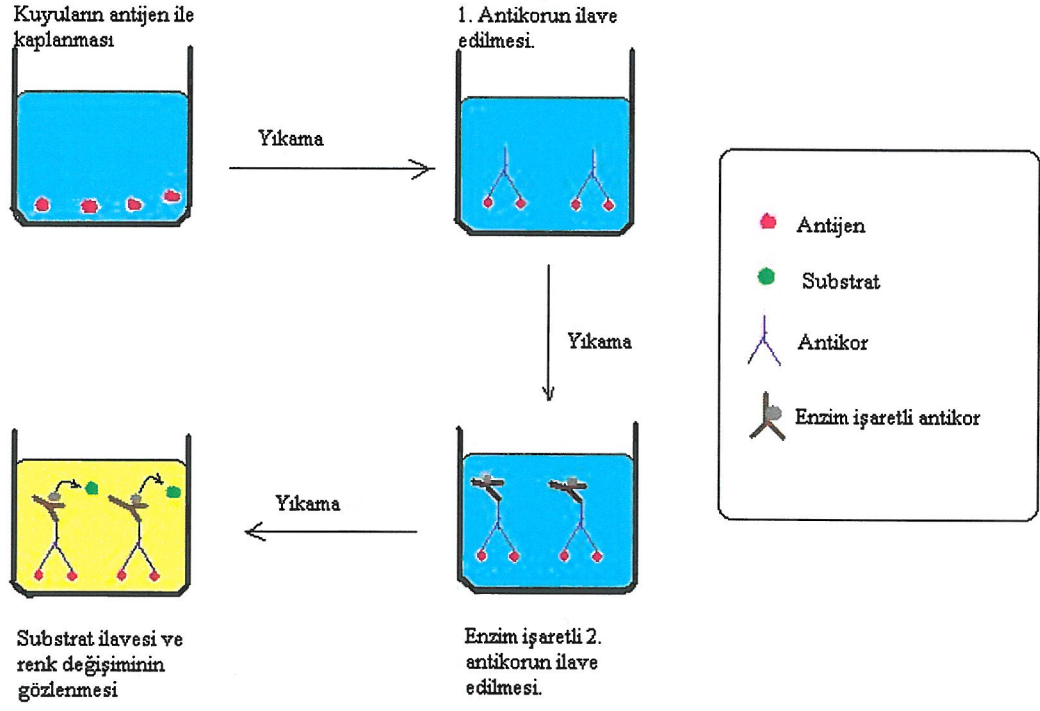
Şekil 2.12. Yarışmalı ELISA

3. Sandviç ELISA: Katı faz spesifik antikör ile kaplanması, daha sonra antijen aranan örnek ve en son da enzim ile işaretli antikörün ilave edilmesi esasına dayanan ELISA'dır. İlk kaplanan antikör, önce antijeni daha sonra da enzim işaretli ikinci antikörü bağlar (Şekil 2.13.).



Şekil 2.13 Sandviç ELISA

4. Dolaylı ELISA (İndirekt) : Antijen ile kaplanan katı faza, antikor aranan örneğin ve son olarak ta enzim işaretli antikorun ilave edilmesi ile yapılan ELISA'dır (Şekil 2.14.).



Şekil 2.14. Dolaylı ELISA

3. GEREÇLER-YÖNTEMLER:

3.1. Gereçler ve Kimyasallar:

Hibridoma teknolojisinde hücre yetiştirmek için kullanılan gereçler:

1) Temiz Alan: Hücre kültür çalışmalarının gerçekleştirildiği hücre kültürü odaları; dışarı açılır penceresi olmayan, genel havalandırma ile değil özel havalandırma sistemi ile havalandırılan, mikrobiyal çalışma alanlarından uzak olan ve kapıları doğrudan koridora açılmayan özelliklerde olmalıdır. Çalışmalarımızda bu özelliklere sahip hücre kültür odası kullanıldı.

2) İnkübatörler: Hibridoma hücreleri için gerekli olan %95 nem, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ oranında gerekli ortamı sağlarlar. Çalışmalarda, Thermo marka CO₂ inkübatör kullanıldı (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. : Hücre Kültürlerinin Saklandığı CO₂ İnkübatör

3) Laminar Hava Akım Kabinleri: Hücreler ile ilgili bütün işlemler, kontaminasyonu önlemek amacı ile havada ki 0.2 µm'den büyük organizmaları yüksek performanslı partikül filtresi (HEPA) ile filtreleyen kabin içerisinde yapıldı. Heraeus marka biyogüvenlik kabini (laminair flow) kullanıldı (Şekil3.2.).



Şekil 3.2 : Hücre Kültürü İşlemlerinin Yapıldığı Lamin Air Flow.

4) Mikroskop: Hücreleri gözlemlemek, hibrit klon taramak ve hücre saymak için laboratuvarımızda inverted phase contrast (Olympus CKX41A) mikroskobu kullanıldı (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3 Hibrit tarama ve Hücre Sayımının Yapıldığı İvert Mikroskop

5) Filtrasyon Gereçleri: Canlı hücrelerin yaşamları için gerekli olan her türlü besi yer, medyum vb. solüsyonlar 0.2 μm çapında delikleri olan tek kullanımlık filtreler ile steril edildi. Bu amaçla Şekil 3.4.'de görülen Milipore marka filtrasyon sistemi kullanıldı.



Şekil 3.4. Besi yeri DMEM Filtrasyon Sistemi

6) Buzdolapları ve Derin Dondurucular: Standart derin donduruculu buzdolaplarının buzdolabı kısmı (+4°C), medyumlar ve diğer solüsyonların muhafaza edilmesinde kullanıldı. Fetal calf serum, yeni dondurulan myeloma ve hibritlerin kısa süreli bekletilmesi için dondurucu (-20°C) kısmı kullanıldı. Kısa süreli dondurulan myeloma, hibrit hücreleri için (-70°C) derin dondurucu ve uzun süreli dondurulan myeloma ve hibrit hücreleri içinde sıvı azot (-196°C) (Union Carbide Nitrogen) tankı kullanıldı.

7) Santrifüj: Hücreleri yıkamak, konsantre etmek, pellet haline getirmek için yaklaşık 1500 rpm gücünde masa üstü santrifüj ve immünize fareden alınan kandan serumun ayrılması için Eppendorf marka masa üstü santrifüjü kullanıldı.

8) Su Banyosu: Stok halde alınan yeni doğmuş sığır serumu (fetal calf serumu) inaktif hale getirmek için Scientific marka su banyosu kullanıldı. Zengin protein kaynağı olan sığır serumu 56°C'de, 30 dakika süre ile olası virüslere karşı inaktif hale getirildi.

9) ELISA okuyucusu olarak Biotech marka kullanıldı.

10) Spektrofotometre olarak Bio-Rad marka kullanıldı.

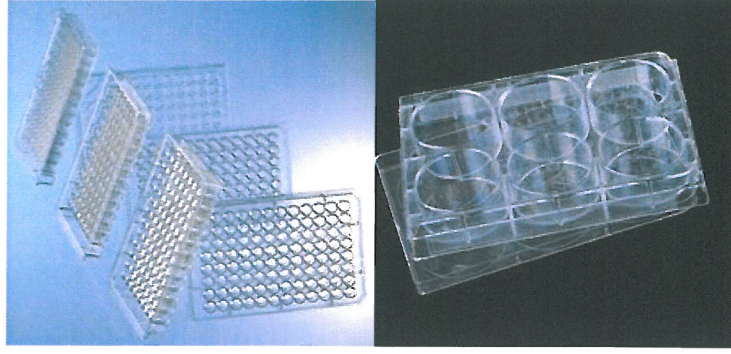
11) Manyetik Karıştırıcı: 500 milimolar PBS ve yıkama tamponlarını hazırlamak için Cole Parmer marka manyetik karıştırıcı kullanıldı.

12) Vortex olarak Scientific Industries marka kullanıldı.

13) Pipetleme Araçları: 10µm, 100 µl, 1000µl, 5000µl ve multi 100µl Eppendorf marka pipetler kullanıldı.

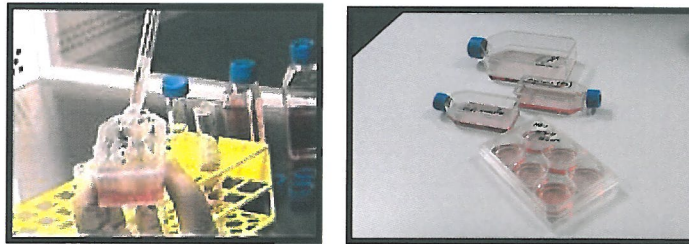
14) Steril, tek kullanımlık, polistren kuyucuklu NUNC ve TPP marka hücre kültür kapları kullanıldı (Şekil 3.5.).

- 96 Kuyuluk ELISA plakları,
- 96 Kuyuluk füzyon plakları,
- 10 ml ve 50 ml'lik santrifüj tüpleri
- 24 Kuyuluk kostarlar kullanıldı.



Şekil 3.5. Tek Kullanımlık Hücre Kültür Plakları

- 15) TPP marka dondurma tüpleri kullanıldı.
- 16) Hücre sayımı için Bright Line marka hemositometre kullanıldı.
- 17) Schott marka otoklavlanabilir 50cc ve 1000cc'lik cam şişeler kullanıldı.
- 18) Besleyici hücre almak (5cc) ve fareleri aşılama için (1 cc)'lik enjektörler kullanıldı.
- 19) Tek kullanımlık steril petripler kullanıldı.
- 20) SEA antijeninin profilini belirlemek için Bio-Rad marka Polyakrilamid jel (PAGE) Elektroforez cihazı kullanıldı.
- 21) Malzemelerin sterilizasyon için Sisteck marka otoklav kullanıldı.
- 22) Fare operasyonları için Sigma marka makas, pens, süzgeç ve baget kullanıldı.
- 23) Hücre kültürü çalışmalarında tek kullanımlık, steril 25 cm² ve 75 cm²'lik TPP marka hücre kültür şişeleri kullanıldı (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Tek Kullanımlık Hücre Kültür Şişeleri

- 24) 1 ml, 2 ml ve 25 ml'lik tek kullanımlık pipetler ve bunları kullanabilmek için Eppendorf marka easyjet marka pipetör tabanca (otomatik pipet) kullanıldı (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Easyjet (Pipetör Tabanca)

- 25) Hücreleri pasajlamak için kazıyıcı kullanıldı.
- 26) Tamponların pH'ını ayarlayabilmek için Inolab marka pH metre kullanıldı.
- 27) p-nitrophenyl fosfat, Sigma N- 3254.
- 28) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Sigma D- 6780.
- 29) Freund's Adjuvant Complete, Sigma F- 5881.
- 30) Freund's Adjuvant Incomplete, Sigma F- 5506.
- 31) Fetal Calf Serum (FCS), Gibco- 26140079.
- 32) Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma-Aldrich, D- 2650.
- 33) Gentamisin, Gibco- 15750060.
- 34) Bovine Serum Albumin (BSA), Sigma A- 3059.
- 35) Hipoksantin Aminopterin Timidin (HAT), Gibco 21060.
- 36) Paranitrofenilfosfat (PNPP), Merck 20- 179.
- 37) Hipoksantin Timidin (HT), Gibco- 41065.
- 38) 8- Azoguanin, Sigma A- 8526.
- 39) Tween20, Sigma P 2287- 1GA.
- 40) Skim milk powder, Fluka- 70166.
- 41) Kazein, Sigma C- 5679
- 42) Amonyum sülfat, Merck- 101217.
- 43) Sodyum bikarbonat, Sigma S- 5761.
- 44) N, N, N', N' – tetrametiletildiamin (TEMED), Bio-Rad 161- 0801.
- 45) Subisotyping Kit, Roche- 1493027.
- 46) HEPES, Sigma H- 3375
- 47) % 30 Acrylamide, Bio-rad 161- 0107
- 48) Sodyum karbonat, Merck- 1.06393.1000
- 49) Polyethylenglikol 4000, Merck- 8.07490.1000

- 50) Asetik asit, Merck- 100063
- 51) Trizma base, Sigma T- 6066
- 52) Etil alkol, Merck- 1,00986
- 53) Methanol, Riedeldeflan- 24229
- 54) K_2HPO_4 , Ridel Rh- 04248
- 55) KH_2PO_4 , Merck- 104873
- 56) $ZnCl_2$, Sigma Z- 0173
- 57) $MgCl_2$, Sigma- 8266
- 58) Glisin, Sigma G- 8898
- 59) NaCl, Merck- 106400
- 60) KOH, Merck- 1,05021
- 61) Formaldehit, Merck- 1,04003
- 62) EtOH, Sigma E- 7023
- 63) $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, Merck- 109147
- 64) $AgNO_3$, Sigma S- 7276
- 65) Glikoz, Sigma G- 7528
- 66) HCl, Carlo Erba- 403272
- 67) Bromphenol blue sodium Sigma B- 6131
- 68) Anti-mouse Polyvalent AP Conjugate, Sigma A- 0162.
- 69) Anti-mouse IgG AP Conjugate, SigmaA- 3438
- 70) Anti-mouse IgM AP Conjugate, Sigma A- 7784
- 71) SEA, Sigma S- 9399
- 72) SEB, Sigma S- 4881
- 73) Toplu iğne
- 74) Strafor
- 75) Alüminyon folyo
- 76) Strech film
- 77) Parafilm
- 78) Fareler: 6-8 Haftalık BALB/c türü dişi fareler ile immünizasyona başlandı.
- 79) Hibridoma teknolojisinde kullanılan hücreler:

Çizelge 3.1. Füzyonda Kullanılan ve Elde Edilen Hücreler

HÜCRE		KAYNAK
Myeloma	F0	ATCC CRL 1646
Besleyici Hücre	Periton sıvısında ki hücreler	BALB/c fare
Dalak Hücresi	Bütün dalak	BALB/c fare dalağı
Hibridoma Kültür Hücreleri		

80) Antijenler

Stafilokokal Enterotoksin A antijeni, Sigma'dan S-9399 katalog numarası ile ticari olarak satın alındı ve -20°C 'de saklandı.

Stafilokokal Enterotoksin B antijeni, Sigma'dan S- 4881 katalog numarası ile ticari olarak satın alındı. Sodyum dodesil sülfat poli akrilamid gel elektroforezi (SDS PAGE) ile antijen profilleri belirlendi.

SEA ve SEB 5 mikrogram/50 mikrolitre stoklar halinde -20°C 'de saklandı . Füzyonda kullanılan ve elde edilen hücreler Çizelge 3.1. de görülmektedir.

3.2. Medyumların, Tamponların ve Kimyasalların Hazırlanması:

3.2.1. Kimyasalların Hazırlanması:

- 1) Sodyum Sitrat: 2.3 gram sodyum sitrat, 0.8 gram sitrik asit ve 2.2 gram glikozun 100 ml distile suda çözerek hazırlandı ve -20°C 'de saklandı.
- 2) PEG Solüsyonu: 1 gr PEG'e 0.5 ml distile su ve 0.5 ml PBS ilave edildi. Daha sonra otoklavda steril edilip 37°C 'de saklandı.

3.2.2. Tamponların Hazırlanması:

- 1) PBS Tamponu: 10 mM K_2HPO_4 , 10 mM KH_2PO_4 ile pH 7.2 olacak şekilde hazırlandı (0.15 M NaCl ilave edilerek).
- 2) PBS-Tween 20 Yıkama Tamponu: % 0.05 Tween 20 PBS tamponuna ilave edildi ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.
- 3) Substrat Tamponu: 1 mM ZnCl_2 'e, 1 mM MgCl_2 ve 0.1 molar glisin ilave edildi. Daha sonra KOH ekleyerek pH 10.4'e ayarlandı.
- 4) Gümüş Boyama Tamponları:
Sabitleyici Tampon: % 50 Methanol, % 12 asetik asit, 0.5 ml % 37 formaldehit.
Yıkama Tamponu: %50 EtOH.
Ön Muamale Tamponu: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.2gr/l)

Bant Fix Tamponu: AgNO_3 (2gr/l) , 0.75 ml %37 formaldehit.

Geliştirme Tamponu: Na_2CO_3 (60gr/L), 0.5 ml % 37 formaldehit, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4mg/l).

Durdurma Tamponu: % 50 Methanol ve % 12 asetik asit.

3.2.3. Medyumların Hazırlanması:

- 1) Büyüme Medyumu: F0 Myeloma ve hibrit hücrelerinin gelişimi için kullanıldı. %80 Dulbelcco's Modified Eagle Medium, % 20 Fetal Calf Serum, Gentamisin (50 mikrogram/ml) şeklinde hazırlandı ve +4°C'de saklandı.
- 2) Seçici Medyumlar: a) Seçici Medyum 1: Normal büyüme medyumuma litrede 20 ml olacak şekilde HAT ekleyerek hazırlandı ve -20°C'de saklandı.
b) Seçici Medyum 2: Normal büyüme medyumuma litrede 20 ml olacak şekilde HT ekleyerek hazırlandı ve +4°C'de saklandı.
- 3) Dulbeco's Modified Eagle's (DMEM): 13.4 gr DMEM, 2 gr NaHCO_3 , 5.96 gr Heps'e %1'lik sodyum piruvat eklenmek sureti ile pH 7.2'ye ayarlandı Daha sonra 0.2 mikro metrelik filtre ile süzüldü.
- 4) Dondurma Medyumu: % 20 FCS, %80 DMEM ve en son karışımın %10'u kadar Dimetil Sülfoksit (DMSO) eklenerek hazırlandı.

3.3. Yöntemler:

3.3.1. Stafilokokal Enterotoksin A Antijenin Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Yürütülmesi:

Antijenin profilini belirlemek amacı ile örnek poliakrilamid jel elektrofrezinde yürütüldü.

Jel Hazırlanması: 4 ml H_2O , 3.3 ml %30 akrilamid, 0.1 ml % 10 amonyum persulfat (APS), 2.5 ml 1.5 Tris-HCl (pH= 8.8), 0.004 ml tetrametil etilen diamil (TEMED), 0.1 ml %10 sodyum dodesil sülfat'ın karıştırılması ile çözücü jel bir tüp içerisinde hazırlandı. Pipet yardımı ile iki cam arasında (kaset) jel döküldü. Tüpte artan karışım jelin donmasını takip etmek amacı ile bırakıldı. Tüpte kalan karışımın donmasının ardından jelin döküldüğü kaset üzerine yavaş yavaş butanol ekleyerek düz satıh oluşması sağlandı. Kurutma kağıdı ile bütanolün fazlası emdirildi. 0.83 ml % 30 akrilamid, 3.4 ml dH_2O , 0.05 ml % 10 SDS, 0.05 ml APS, 0.63 ml 1 M Tris (pH= 6.8) ve 0.005 ml TEMED ile stacking jel hazırlandı ve yine pipet yardımı ile resolving jelin üzerine döküldü. Örneklerin yükleneceği taraklar jelin üzerine dikkatlice yerleştirildi. Jelin donmasının ardından PAGE elektrofrez sistemine yerleştirildi ve üzerini kaplayıncaya kadar 10X running buffer ilave edildi.

Örneğin Hazırlanması: Antijen, loading buffer 2X ile karıştırılıp, 95°C’de 3 dakika ısıtılmak sureti ile marker protein ise doğrudan jele yüklendi.

Antijenin Coomassie Blue ile Boyanması: Jel gece boyu staining bufferda bekletildi ve ertesi gün destaining buffera alınarak görünür hale getirildi .

3.3.2. Farelerin İmmünizasyonu:

TÜBİTAK-MAM-GMBE Hayvan Genetiği ve Üreme Biyoteknoloji Lab.’ından alınan 6/8 haftalık BALB/c türü farelerin (Şekil 3.8.) immünizasyonunda 3 yöntem kullanıldı.

- 1) SEA-SEB karışık formda farelerin bağışıklanması (2 μ g+2 μ g).
- 2) SEA ile farelerin bağışıklanması (2 μ g).
- 3) SEA ile farelerin bağışıklanması (4 μ g).



Şekil 3.8. BALB/c Fareleri.

Farelerin Aşılama Takvimi:

Çizelge 3.2. Farelerin Aşılama Takvimleri

1)

İmmünizasyon Sayısı:	İmmünizasyon Antijeni:	İmmünizasyon Zamanı:
1. İmmünizasyon	SEA+CFA	0
2. İmmünizasyon	SEA+IFA	2 Hafta sonra
3. İmmünizasyon	SEA+IFA	3 Hafta sonra
4. İmmünizasyon	SEA	3 Hafta sonra

2)

İmmünizasyon Sayısı:	İmmünizasyon Antijeni:	İmmünizasyon Zamanı:
1. İmmünizasyon	SEA+SEB+CFA	0
2. İmmünizasyon	SEA+SEB+IFA	2 Hafta sonra
3. İmmünizasyon	SEA+SEB+IFA	3 Hafta sonra
4. İmmünizasyon	SEA+SEB	3 Hafta sonra

Farelerin bağışıklanması; birinci, ikinci ve üçüncü immünizasyonlar intraperitoneal, dördüncü immünizasyon ise hatırlatma amaçlı olarak sistemik uygulama (intravenöz, pati içleri ve intraperitoneal) şeklinde yapıldı (Çizelge 3.2.).

3. İmmünizasyon sonunda yanıt veren fareye 3 hafta sonra hatırlatma amaçlı olarak adjuvantsız olarak sadece PBS ile hatırlatma yapıldı ve 4 gün sonra fare füzyona alındı. Negatif kontrol amaçlı immünize olmamış fareden de kan alındı.

3.3.3. Farelerde İmmün Yanıtın Test Edilmesi:

Bu amaçla dolaylı ELISA yöntemi kullanıldı.

Farenin kuyruk ucu çok az kesilmek sureti ile kan alındı ve 15 mikrolitre sodyum-sitrat (daha önce hazırlanmış) çözeltisine ilave edildi. Yaklaşık yirmi saniye santrifüj edildikten sonra elde edilen serum dolaylı ELISA ile test edildi.

- 96 Kuyu; 100 µl, 50 nanogram antijen çözeltisi ile (PBS ile dilüe edilmiş) kaplanıp gece boyu +4°C'de bekletildi.

- Kuyular 3 defa yıkama tampon ile yıkandı.
- Kuyular 200 µl; %1'lik kazein, BSA, süt ya da süt tozu (PBS ile dilüe edilmiş) çözeltisi ile bloklandı ve 1 saat +37 °C'de bekletildi.
- Kuyular 3 defa yıkama tamponu ile yıkandı.
- 100 µl, 1/250 dilue serumlar (PBS ile) yüklendi ve 1 saat +37°C'de bekletildi.
- Kuyular 3 defa yıkama tamponu ile yıkandı.
- 100 µl, 1/1000 oranında (PBS ile dilüe edilmiş) Alkalen fosfataz enzimi ile işaretli anti Mouse IgG, IgM, IgA (polyvalent) yüklendi 1 saat +37°C'de bekletildi.
- Kuyular 5 defa yıkama tamponu ile yıkandı.
- Substrat tamponuna, 1/1 oranında substrat (p-nitrophenyl fosfat) eklenip 100 µl kuyulara yüklendi ve 45 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletilip 405 nm'de ELISA okuyucusunda okutuldu.

3.3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları:

3.3.4.1. Dondurulmuş Hücrelerin Açılması:

-196°C'de sıvı azot tanklarındaki dondurulmuş hücreler; 37°C'de çözülerek santrifüj tüplerine alındı, 2 kez PBS tamponu ile yıkama işlemi yapıldı ve çöken hücreler hücre besi yeri ile birlikte hücre kültürü ortamına alındı.

3.3.4.2. Hücrelerin Kültür Şişelerinde Pasajlanması:

Hücre kültür plaklarında yoğun olarak üremiş olan hücrelerin yeni bir kültür şişesine aktarılması için, hücre kültür üst sıvısı steril bir kaba alındı. Kültür şişesine, altını kaplayacak oranda PBS tamponu ilave edildi. Steril kazıyıcı (scraper) yardımı ile hücreler nazikçe kazınarak PBS tamponu ile birlikte santrifüj tüpüne alındı, 900 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, santrifüj sonrası üst sıvı döküldü ve pellete tekrar PBS ilave edildi. Yıkama işlemi aynı şekilde tekrarlandı. Aktarılacak hücre kültür kabına uygun miktarda besi yeri eklendi ve 2 kere yıkamış hücreler yeni hücre kültür kabına alındı.

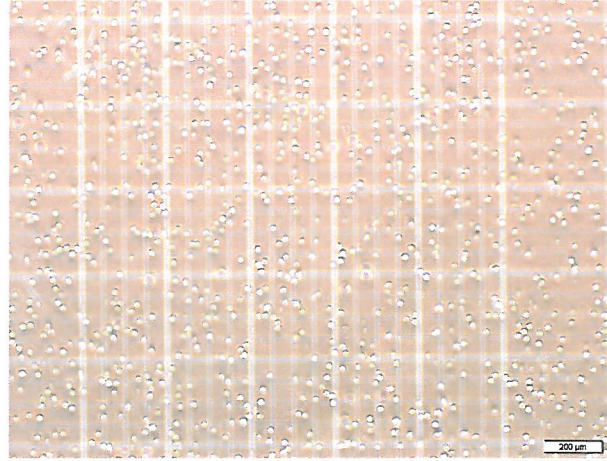
3.3.4.3. Hücrelerin Dondurulması:

Hücreler pasajlama işleminde olduğu gibi iki kere yıkama işlemine alındıktan sonra, hücre pelleti dondurma medyumuna alınarak her bir dondurma tüpünde 1.5 ml olacak şekilde pipet yardımıyla dağıtıldı. Her bir dondurma tüpünde 5x10⁶-10x10⁶ hücre/ml (dondurma medyumuna) olacak şekilde dağıtıldı. Dondurma tüpleri ilk etapta 2 saat kadar -20°C bekletildi. Daha sonra -70°C'ye alınan hücreler, bir gece -70°C'de bekletildikten sonra uzun süre saklanabilmeleri için -196°C sıcaklığında ki sıvı azot tanklarına alındı.

3.3.4.4. Hücrelerin Sayımı:

PBS yardımı ile yıkanan ve belli bir volümde yer alan hücrelerden mikro pipet yardımı ile bir damla alındı, hemositometreye konularak 25 kareye düşen hücre miktarı sayıldı (Şekil 3.9.).

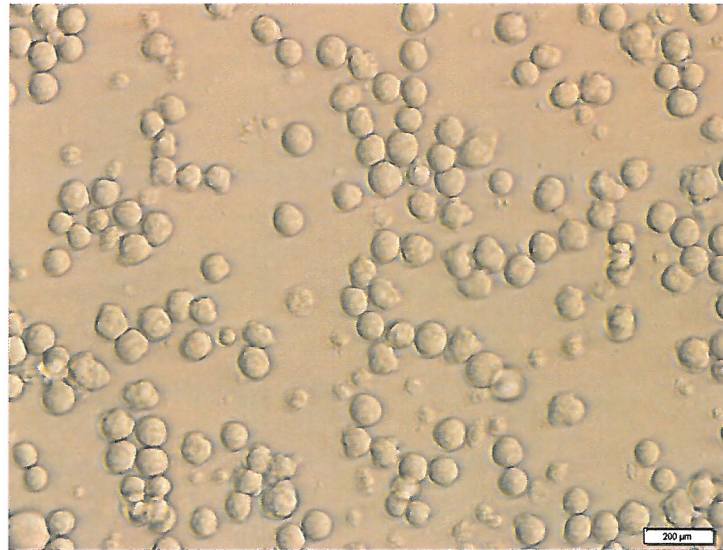
Formül= $10^4 \times$ hücre volümü (ml) \times sayılan hücre miktarı (Hücre sayısı çok fazla ise 4 köşe ve ortada ki kareler sayılıp ortalaması alınarak 5 ile çarpılır).



Şekil 3.9. Hücrelerin Sayımı

3.3.4.5. Myeloma Hücrelerinin Füzyona Hazırlanması:

Füzyondan 10 gün önce, F0 myeloma hücrelerinin besi yerine Azoguanin (20 µg/ml) ilave edilerek HGPRT mutanları olan hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Füzyon günü, üstü sıvısı dökülen hücreler PBS ile pasajlanarak 2 defa 10 dakika 900 rpm'de santrüfuj edilerek yıkanıp, füzyon sırasında myeloma/dalak hücresi oranı belirleyebilmek için sayıldı (Şekil 3.10.).

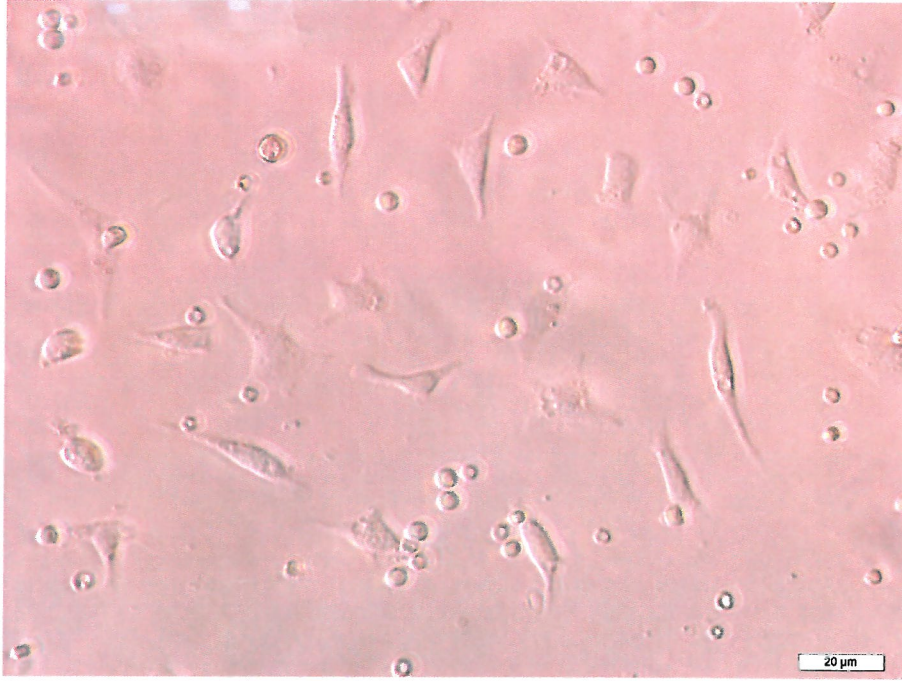


Şekil 3.10. Fo Myeloma Hücreleri

3.3.4.6. Besleyici Hücrelerin (Makrofajların) Füzyona Hazırlanması :

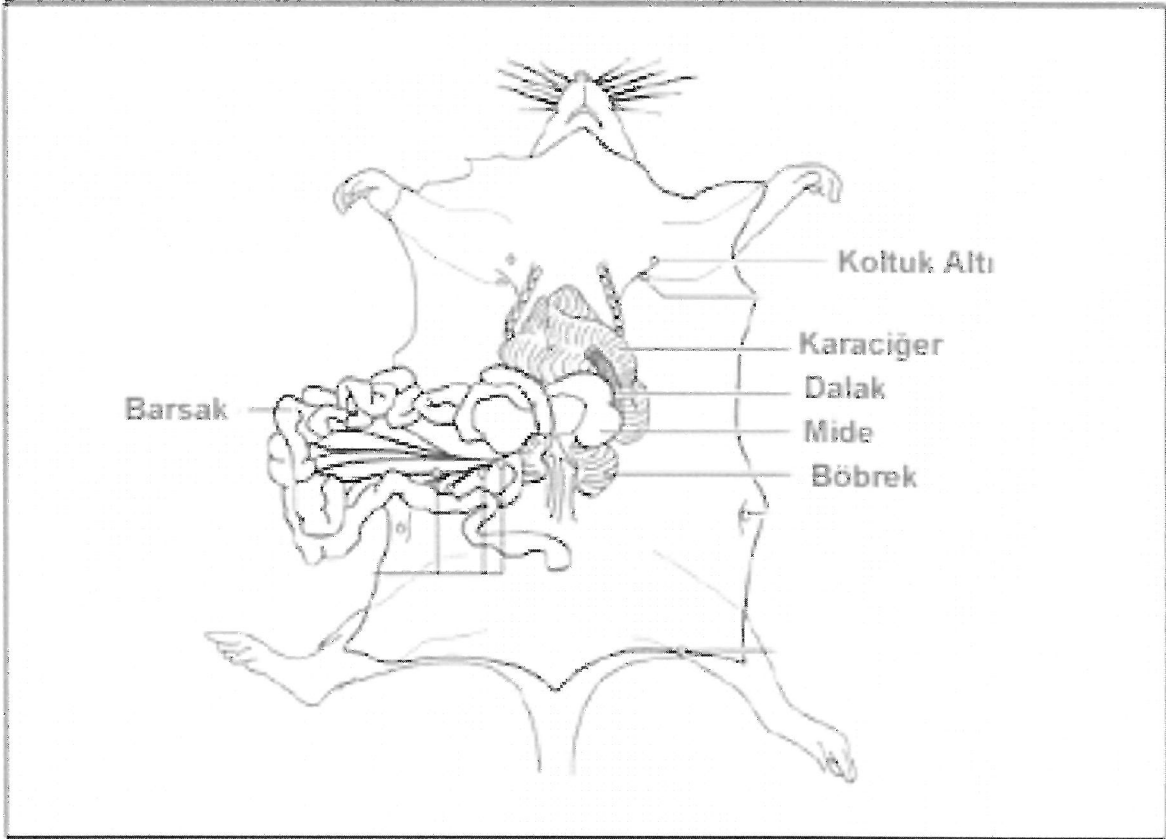
Füzyondan bir gün önce hibrit hücrelerimizin gelişimi için yatak vazifesi görecektir ve her türlü bakteri, hücre kalıntılarını fagosite edecek makrofaj hücrelerimiz hazırlandı. Hiç immünize edilmemiş fare servikal dislokasyon ile öldürülüp, içinde % 70 etil alkol bulunan behere alındı. Laminar akımlı kabinde strafor üzerinde fare sırt üstü toplu iğne ile sabitlendi. Tam karnının üzerinden pens ile tutarak yukarı ve yanlara doğru kesiler yapıldı. Bacaklarından ve kuyruğundan tutarak farenin derisi yukarı doğru yüzüldü ve peritonu dikkatlice hiç zarar görmeden açığa çıkarıldı. Yeşil uçlu 5 cc'lik enjektör ile 5 ml sadece DMEM besi yeri peritondan içeriye zerk edildi. İlk etapta girdiğimiz yerden çekebildiğimiz kadar DMEM besi yeri geri çekildi.

%80 DMEM, %20 FCS ve 50 µg/ml gentamisin içeren besi yerine elde ettiğimiz hücre karışımı DMEM ilave edilerek her bir kuyuda 100 µl olacak şekilde, hücreler multi pipet yardımı ile 96 kuyuluk hücre kültür plaklarına dağıtıldı (Şekil 3.11.).



Şekil 3.11. Makrofaj Hücreler

3.3.4.7. Başışıklanmış Fare Dalak Hücresinin Elde Edilmesi:



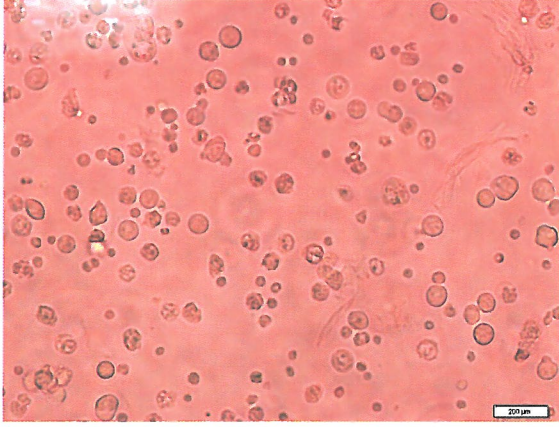
şekil 3.12. Fareden Dalak Hücresinin Eldesi

İmmünizasyonlar sonucunda yüksek yanıt aldığımız fare servikal dislokasyon ile öldürölüp, içinde %70 etil alkol bulunan behere alındı. Laminar akımlı kabinde straför üzerinde fare sırt üstü toplu iğne ile sabitlendi. Tam karnının üzerinden pens ile tutarak yukarı ve yanlara doğru kesiler yapıldı. Peritonu keserek sol tarafından dalağı açığa çıkarılarak alındı (şekil3.12.). Yağlarından güzelce ayrılan dalak, içerisinde PBS tamponu bulunan petride süzgeç ve baget yardımı ile ezildi. Elde edilen hücreler süspanse edilerek santrifüj tüpüne alında, 2 defa yıkandı ve sayıldı. Aynı fareden ELISA'larda (+) kontrol amaçlı kullanmak üzere kalbinden kan alınarak serumu santrifüjle ayrıldıktan sonra -20°C'de saklandı.

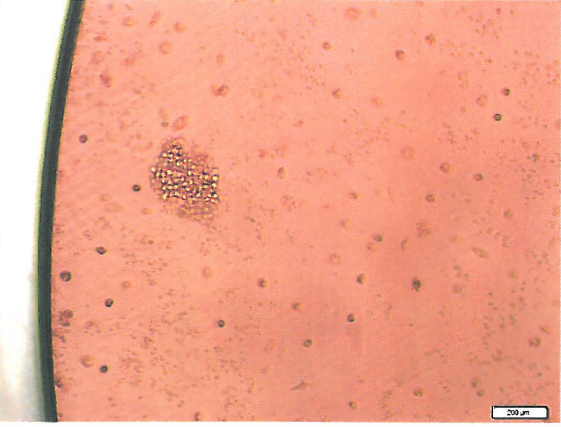
3.3.4.8. Myeloma ve Başışıklanmış Dalak Hücresinin Birleştirilmesi (Füzyon):

İki kez yıkanan ve sayımları yapılan F0 ve dalak hücreleri 1/10–1/3 oranında olacak şekilde santrifüj tüpünde birleştirildi. 900 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve kalan pellete, 1dakika içerisinde 1ml PEG yavaş yavaş ilave edildi. Daha

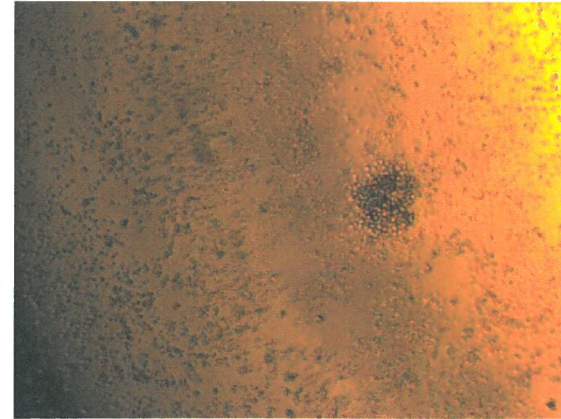
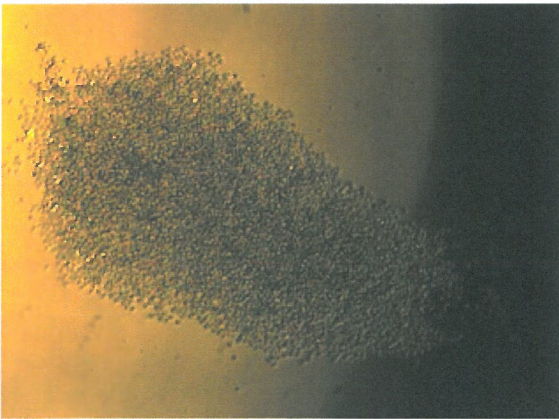
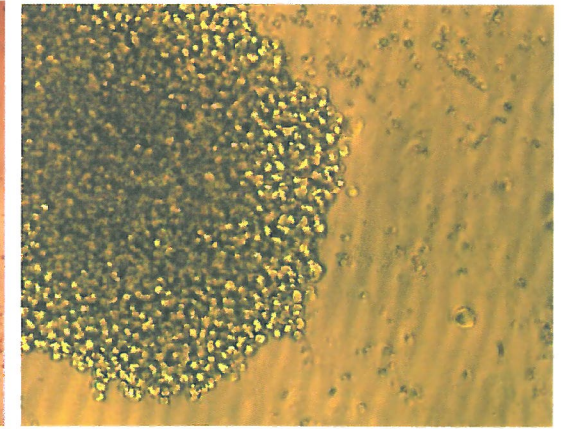
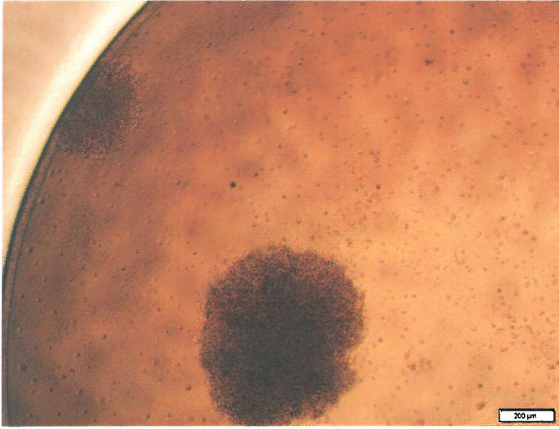
sonra 1 dakika 37°C’de bekletildi ardından 2 dakika içerisinde 4 ml sadece DMEM, iki dakika içerisinde 20 ml sadece DMEM ve son olarak 2 dakika içerisinde 20 ml %15 FCS içeren DMEM ilave edildi. Karışım 1 saat 37°C ısısında ki CO₂ inkübatör de bekletildi. Bir saat sonunda hücrelerin içerisinde yer aldığı tüp santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı, HAT seçici besi yeri ilave edilerek her kuyuya 150 µl/kuyu olacak şekilde multi pipet yardımı ile 96 kuyuluk hücre kültür plaklarına dağıtıldı. İlk 10 gün füzyon plakları CO₂ inkübatör de dinlenmeye bırakıldı. Füzyondan sonraki 10. gün, kuyulardan 100 µl alındı ve 100 µl/kuyu HAT seçici besi yeri ilave edildi. 12. Gün aynı şekilde HAT seçici besi yeri çekildi ve HT seçici besi yeri ilave edildi. 10 Gün sonra HAT besi yerinde hibrit hücrelerinin oluşturduğu klonlar mikroskopta belirgin hale gelmeye başladı ve hücrelerin olduğu kuyulara işaret konuldu. Hücrelerin gelişimine bağlı olarak daha sonra normal besi yerine geçildi. Füzyon gününden 10. güne kadar değişik günlerde çekilmiş hibrit hücre resimleri Şekil 3.13. de yer almaktadır.



Füzyon 1. Gün



Füzyon 7. Gün



Füzyon 10. Gün

Şekil 3.13. Füzyon Sonrası Farklı Günlerde Görüntülenmiş Hibrit Hücre Resimleri

3.3.5. Hücrelerin Takibi

3.3.5.1. Dolaylı ELISA:

Füzyon plaklarının kuyuları, füzyondan 10 gün sonra invert mikroskop ile hibrit hücre olan kuyuları belirlemek amacı ile tarandı. Hibrit tespit edilen kuyulardaki hücre kültür üst sıvıları, antikor yönünden taranmak üzere dolaylı ELISA yöntemi ile test edildi.

Bu amaçla;

- 96 Kuyuluk ELISA plakları, 50 ng SEA antijeni ile kaplanıp gece boyu +4°C'de bekletildi.

- ELISA plağı 3 defa yıkama tamponu ile yıkandı.

- ELISA plağı 200 µl %1'lik kazein, BSA, süt ya da süt tozu (PBS ile dilüe edilmiş) çözeltisi ile bloklandı ve 1 saat +37°C'de bekletildi.

- ELISA plağı 3 defa yıkama tamponu ile yıkandı.

- 100 µl hücre kültür üst sıvıları yüklendi ve 1 saat +37 °C'de bekletildi.

- ELISA plağı 3 defa yıkama tamponu ile yıkandı.

- 100 µl, 1/1000 oranında (PBS ile dilüe edilmiş) alkalen fosfataz enzimi ile işaretli anti-mouse polivalen Ig yüklendi 1 saat +37°C'de bekletildi.

- ELISA plağı 5 defa yıkama tamponu ile yıkandı.

- Substrat tamponuna, 1/1 oranında substrat (p-nitrophenyl fosfat) eklenip 100 µl kuyulara yüklendi ve 45 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletilip 405 nm'de ELISA okuyucusunda okutuldu (Donovan, 1995).

3.3.5.2 Tek Düşürme (Limited Dilüsyon) Yöntemi:

Füzyon sonucu ELISA yöntemiyle SEA antijenine karşı özel antikor ürettiği tespit edilen hibrit hücrelere -tek klondan oluşan hücreler elde etmek amacıyla- tek düşürme işlemi yapıldı. Bu hücreler daha sonra her bir kuyuya bir hücre düşücek şekilde 100'er µl 96 kuyuluk hücre kültür plaklarına dağıtıldı

3.3.5.3. Hibridomaların Geniş Ölçekli Üretimi:

Hibrit hücrelerden yüksek miktarda antikor elde etmek için 75 ve 150 cm²'lik hücre kültür kaplarından ve 500 ml'lik manyetik karıştırıcılı hücre kültür şişelerinden Şekil (3.14.) yararlanıldı.

500 ml'lik manyetik karıştırıcılı kültür şişe içerisine; antikor kaynağı olan hibrit hücreler, 350 ml DMEM besi yeri ve hibrit hücrelerin hızlı bir şekilde üremelerine yardımcı olması için polistren yapılı küçük kürecikler (biyosilyon) ilave edildi. Kültür

şişesi 24 saatte bir, birer saat ara ile 37°C CO₂ inkübatörde bekletilmek sureti ile hücrelerin yeterli oranda CO₂ almaları sağlandı. Daha sonra kültür şişesinin ağzının sıkıca kapatılarak, 37°C'deki odaya alınarak dakikada 60 devire ayarlanan manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi. Bu işlem rutin olarak besi yeri sararana kadar devam ettirildi. Besi yerinin rengi sarardıktan sonra, kültür üst sıvısı dakikada 900 devire ayarlanan santrifüj yardımı 10 dakika santrifüj edilmek sureti ile hücrelerden ayrıldı. Bu metot ile, hücre kültür üst sıvısının 1ml'sinden yaklaşık olarak 10-50 µg monoklonal antikor elde edildi (Yücel Fatıma, 2010).



Şekil 3.14. Manyetik karıştırıcılı Hücre Kültürü Şişesi

3.3.6. Monoklonal Antikorların Saflaştırılması:

Monoklonal antikorlarının yer aldığı hücre kültür besi yerleri zengin protein kaynağı içerdiğinden, monoklonal antikorları diğer proteinlerden ayırmak için saflaştırılma çalışmaları gerçekleştirilir.

Monoklonal antikorların saflaştırılmasında iki temel yöntem vardır.

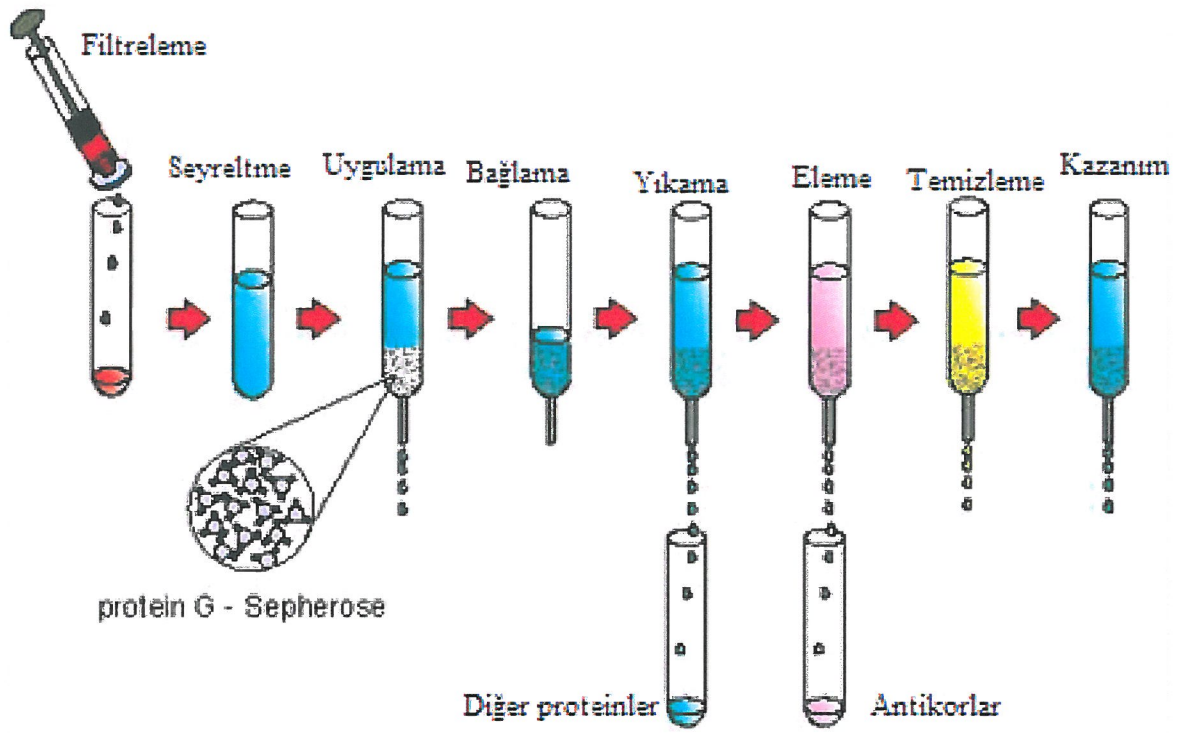
3.3.6.1. A) Amonyum sülfat ile çöktürme: Amonyum sülfat çöktürme, yüksek yoğunlukta ki amonyum sülfat iyonlarının, su moleküllerine bağlanmak için protein molekülleri ile yarışması temeline dayanır. Proteinlerin çökmesi, su eklenmesi sonucu ya da amonyum ve sülfat iyonlarının yoğunluğu düşürülerek tersine de çevrilebilir.

Hibrit üst sıvıları üzerine, +4°C'de manyetik karıştırıcı yardımı ile 30 dakika içerisinde %45 yoğunluğunda ki amonyum sülfat çözeltisi ilave edilir. Gece boyu +4°C'de

manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmak suretiyle bekletilir. Daha sonra dakikada 13000 rpm de, 1 saat boyunca santrifüj edilir. Pellet PBS yardımı ile çözüldükten sonra PBS'e karşı gece boyu +4°C'de diyaliz edilir (Akkor, 2003).

Monoklonal antikorlar, yüksek molekül ağırlıklı proteinler ile kontamine edildiği için tek başına amonyum sülfat çöktürme ile saf monoklonal antikor elde edilemez. Bu sebep ile, monoklonal antikorların saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesi tek başına yeterli değildir.

3.3.6.2. B) İmmünoafinite Kromatografisi ile Saflaştırılması: Antikorların, saf bir şekilde elde edilmesi için etkili olan bir saflaştırma yöntemidir. Monoklonal antikorların, IgG ve serumda bulunan diğer proteinlerden ayrılabilmesi için Protein G bağlı katı faz üzerinde immünoafinite kromatografisi uygulanır (Şekil 3.15.). Uygun immünoafinite kromatografisinin seçilmesinde; monoklonal antikorun immünglobulin sınıf veya alt sınıfının, antikor orijininin (fare, sıçan, insan...) önemi bulunmaktadır. Kolon, kendi hacminin 5 katı haciminde ki bağlama tamponu ile yıkanır. Amonyum sülfat çöktürme işlemi uygulanmış IgG tipi antikor üreten hibrit üst sıvısı, 0,45µm çapındaki filtreden geçirildikten sonra protein-G immün afinite kolonuna yüklenir. Daha sonra bağlama tamponu eklemek sureti ile 1'er ml hacimde tüpler biriktirilir. Tüplerin 280nm absorbans değerleri spektrofotometre yardımı ile ölçülür. Spektrofotometrede ölçülen absorbans değeri sıfırı gösterene kadar kolona bağlama tamponu yüklenir. Spektrofotometrede sıfır değeri gözlemlendikten sonra kolona elüsyon tamponu yüklenir. Antikorlar, 75 µl denge tamponu içeren tüplerde 1'er ml'lik hacimlerde toplanır. 280nm'de ki absorbans değeri tekrar sıfır değeri verene kadar devam edilir. Daha sonra kolon, kendi hacminin iki katı haciminde ki %20 yoğunluğa sahip etanol ile yıkandıktan sonra +4°C'de saklanır. Tüplere toplanan örnekler, dolaylı ELISA yöntemi ile test edilerek antikor kesimleri tespit edilir (Akkor, 2003). Şekil 3.15.'de immün afinite kolon kromatografisinin şematik gösterimi yer almaktadır.



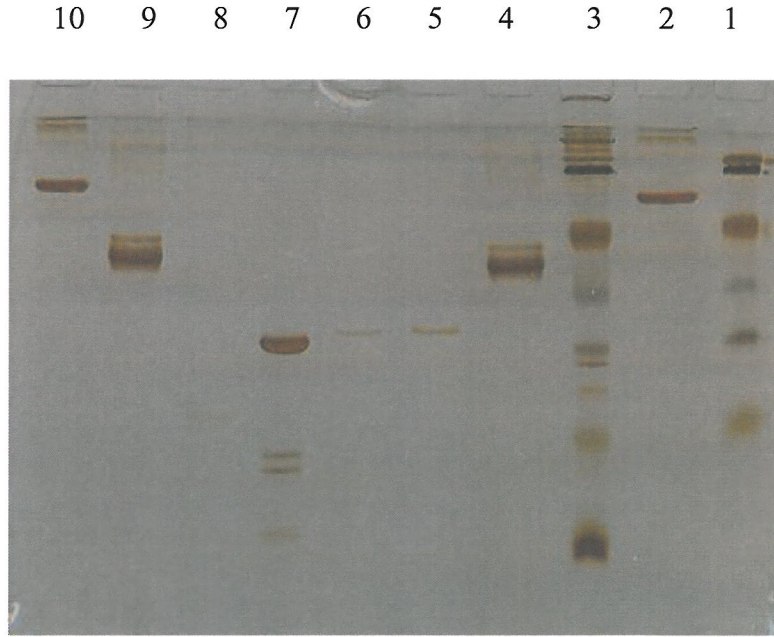
Şekil 3.15. İmmun Afinite Kolon Kromatografisi

4. BULGULAR:

4.1. İmmünizasyonda Kullanılan SEA Antijen Profilinin Belirlenmesi:

İmmünizasyona başlamadan önce Sigma'dan S-9399 katalog numarası ile ticari olarak temin edilen SEA'nın ve yine aynı firmadan S-4881 katalog numarası ile ticari olarak satın alınan SEB'in, varlığını belirlemek üzere Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Gel Elektroforezi (SDS PAGE) yöntemi uygulandı. SEA ve SEB 5 mikrogram/50 mikrolitre stoklar halinde -20°C'de saklandı.

Şekil 4.1'de %12'lik SDS PAGE'de yürütülmüş olan SEA ve SEB SDS jel görüntüsü görülmektedir.



Şekil 4.1. SEA ve SEB SDS Jel Görüntüsü (% 12 SDS PAGE GEL)

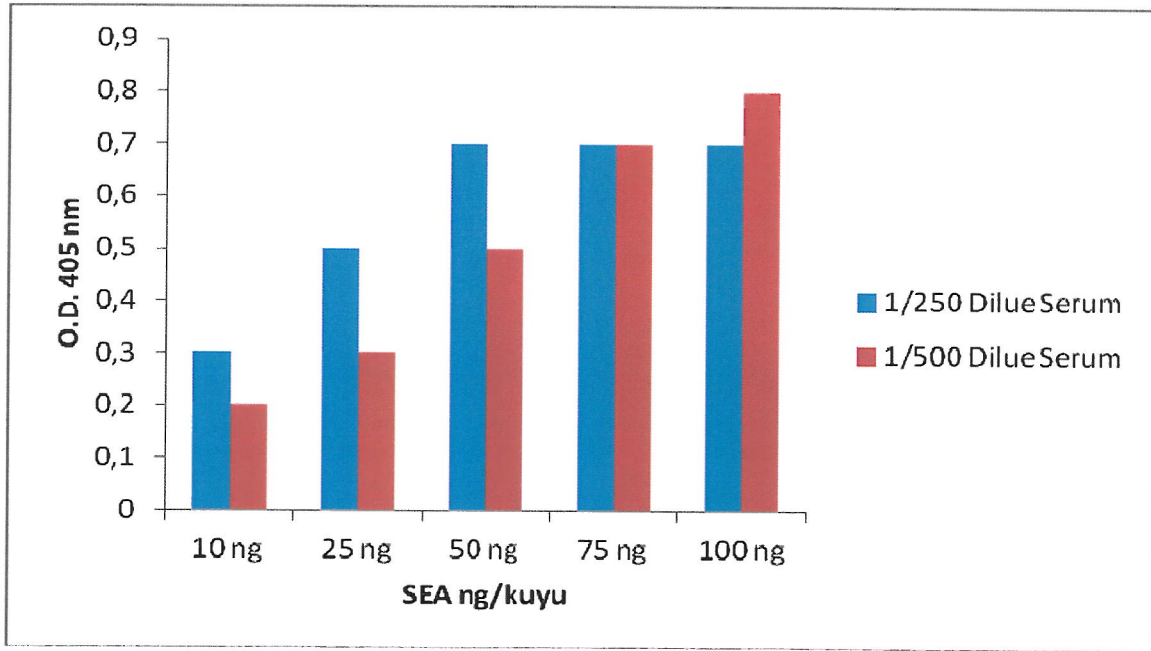
1) Marker 310 (20-29-37-50-97-104 kd), 2) BSA (67 kd), 3) Marker 318 (6-15-20-27-41-59-107-195kd), 4) Ovalbumin (45kd), 5) SEA (27,1 kd), 6) SEB (28 kd), 7) Kimotripsinojen A (25 kd), 8) Tripsin (23,3 kd), 9) Ovalbumin (45 kd , 10) BSA (67 kd)
SEA: 5µg/50µl stok.2 veya 3 µg kuyu (%10 saflıkta)
SEB: 100µg/100µl stok .1-2 µg veya 5µg/50µl Stok. 3µg kuyu (%25 saflıkta)

Jelde görüldüğü üzere 26 kilodalton'da bant veren SEA, immünizasyonda ve 28 kilodalton'da bant veren SEB, çapraz reaksiyon ELISA testlerinde kullanıldı.

4.2. Antijen ve Fare Serum Dilüsyonu Optimizasyon Testi:

Çalışmalarda kullanılan antijenin temininde ki güçlük ve pahalı olması gibi sebepler dikkate alındığında. Mevcut antijenin en ekonomik olarak kullanılması ve serumdaki antikör ile en optimal birleşme konsantrasyonunun belirlenmesi için optimizasyon yani sulandırma (dilüsyon) çalışmaları gerçekleştirildi.

Bu kapsamda farklı konsantrasyonlarda antijen miktarları, farklı konsantrasyonlarda bağışık fare serum dilüsyonları ile denenerek bir optimizasyon çalışması yapıldı (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Antijen ve Serum Dilüsyonu Optimizasyonu

Yapılan optimizasyon çalışmasında, SEA antijeni farklı konsantrasyonlarda (10ng, 25ng, 50ng, 75ng, 100ng) ELISA plağına kaplandı. Üzerine bağışık fare serumu 1/250 ve 1/500 dilue oranlarında ilave edildi.

ELISA sonucunda, plak kaplamada ki yeterli antijen miktarının 50 nanogram ve en uygun serum dilüsyon oranının ise 1/250 olduğu tespit edildi. Tüm hibrit tarama çalışmalarında bu konsantrasyon (50ng/kuyu) kullanıldı.

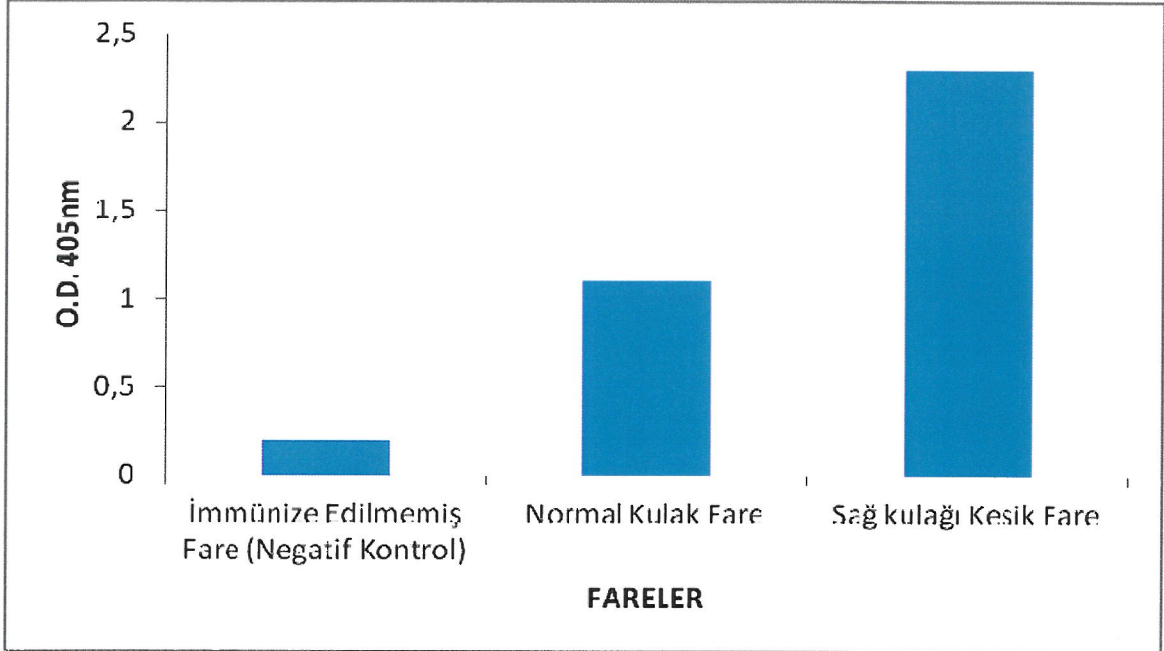
4.3 İmmünizasyonlar-Fare Sonuçları:

SEA antijenine karşı antikor geliştiren fareler elde edebilmek için yöntemlerde anlatıldığı şekilde toplam 3 kafeste, 3 ayrı immünizasyon çalışması yapıldı. Her grup farenin bağışıklık yanıtı, dolaylı ELISA yöntemi ile test edildi.

- 1 nolu kafes: 2 µg SEA + 2 µg SEB antijenleri ile karışık immünizasyon yapıldı.
- 2 nolu kafes: SEA antijeni 2 µg dozda uygulandı.
- 3 nolu kafes: SEA antijeni 4 µg dozda uygulandı.

1 Nolu Kafes; Fare Aktivite ELISA Sonuçları:

Bu kafesteki 2 adet fare; gereçler ve yöntemlerde anlatıldığı şekilde, 2 µg SEA + 2 µg SEB antijenleri ile karışık olarak immünize edildi. Bu kafesteki fare sonuçları Şekil 4.3.'de görülmektedir.



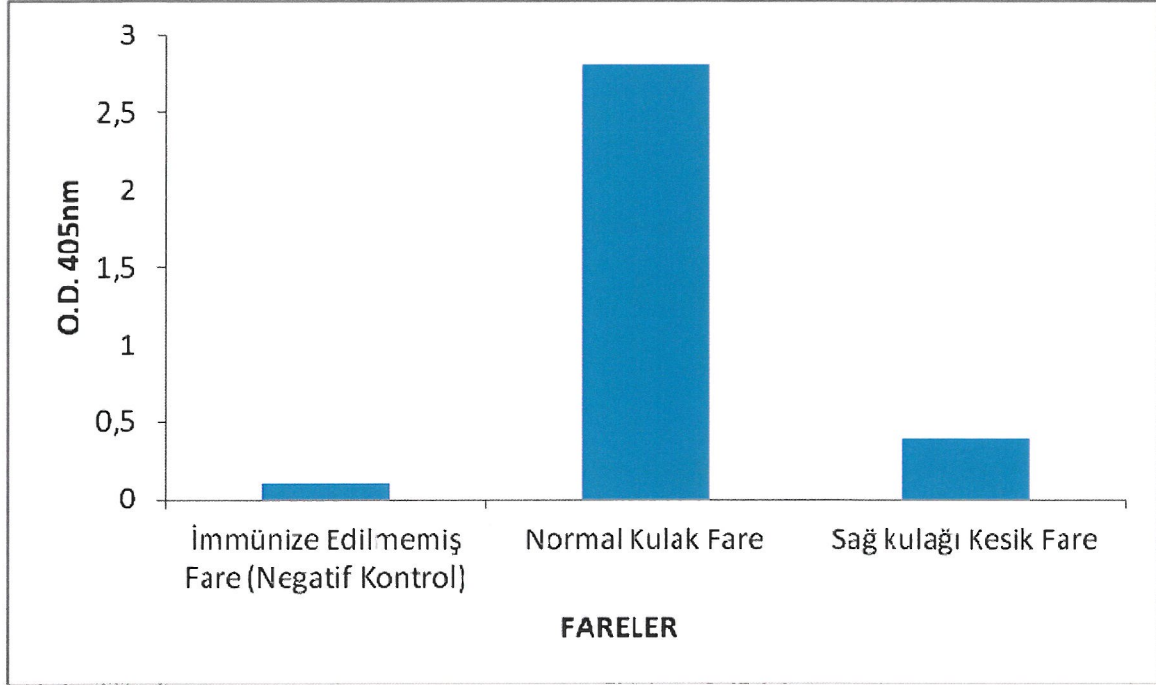
Şekil 4.3. 1Nolu Kafeste 3. İmmünizasyon Sonrası Fare Aktivite Testi

Dolaylı ELISA yöntemi ile test edilen 1 nolu kafes farelerinin yüksek düzeyde SEA antijenine aktivite verdiği gözlemlendi.

Yüksek düzeyde aktivite veren fareler sırasıyla füzyon çalışmalarında kullanıldı.

2 Nolu Kafes; Fare Aktivite ELISA Sonuçları:

2 nolu kafesteki 2 adet BALB/c türü farelere; gereçler ve yöntemlerde anlatıldığı şekilde, SEA antijeni 2 µg dozda uygulandı. Bu kafesteki farelerin SEA antijenine karşı geliştirdikleri antikor yanıtları Şekil 4.4.'de görülmektedir.



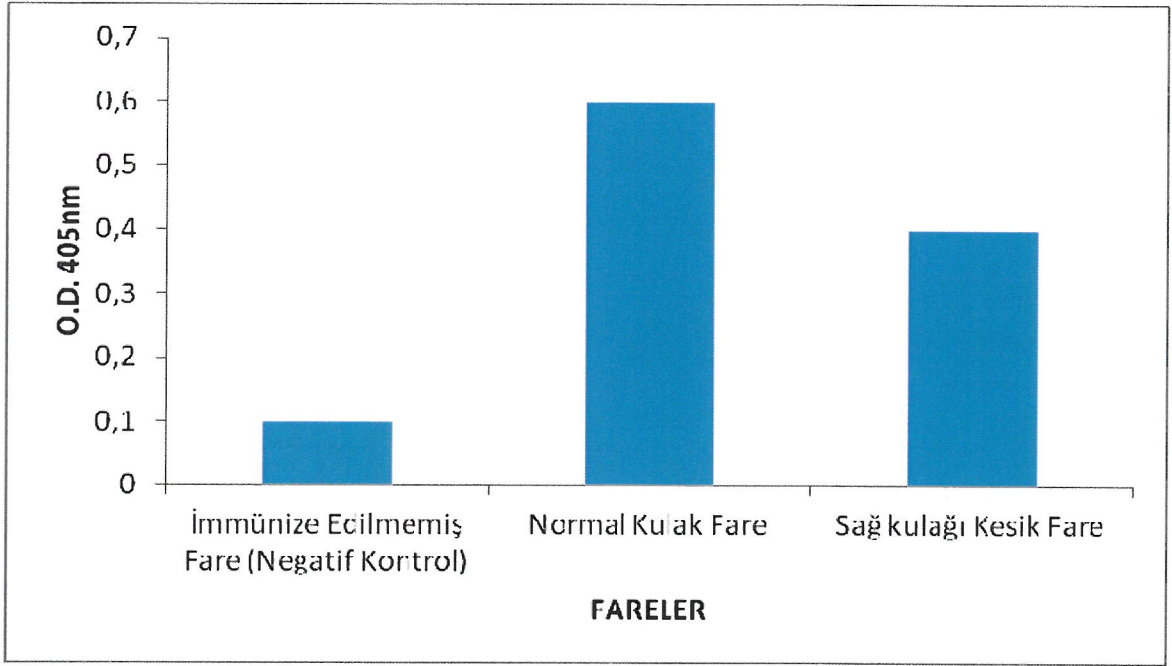
Şekil 4.4. 2. Nolu Kafesde 3. İmmünizasyon Sonrası Fare Aktivite Testi

Dolaylı ELISA yöntemi ile test edilen 2 nolu kafes fareleri arasında bir tanesinden SEA antijenine karşı antikor yanıtı alınmazken, diğerinden yüksek antikor yanıtı alındı. İmmünizasyon için birden fazla farenin bağışıklanmasının bir sebebi de her fareden istenilen düzeyde immünolojik yanıt alınamamasıdır. Bu kafesteki farelerde bu belirgin olarak gözlenmiştir.

Yüksek düzeyde aktivite veren fare füzyon çalışmalarında kullanıldı.

3 Nolu Kafes; Fare Aktivite ELISA Sonuçları:

3 nolu kafesteki 2 adet BALB/c türü fareye 4 µg SEA antijeni gereçler ve yöntemlerde anlatıldığı şekilde immünize edildi. Bu kafesteki fare sonuçları şekil 4.5.'de görülmektedir.



Şekil 4.5. 3. Nolu Kafeste 3. İmmünizasyon Sonrası Fare Aktivite Testi

Dolaylı ELISA yöntemi ile test edilen 3 nolu Kafes fareleri arasında en yüksek aktivite normal kulak olan farede gözlemlendi fakat farenin gösterdiği aktivite yeterli bulunmadığı için füzyon çalışmalarında kullanılmadı.

Bu sonuçlarda, SEA antijeni farelere yüksek doz (4 µg) olarak uygulandığında antikor yanıtının düştüğü gözlemlendi.

4.4 Füzyon Sonuçları:

SEA ile bağışıklanan fareler arasında, SEA antijenine yüksek yanıt veren farelerle gerçekleştirilen füzyon çalışmaları aşağıda yer almaktadır.

1. FÜZYON ÇALIŞMASI:

1 nolu kafesteki kulağı işaretsiz olan, normal kulak fare füzyona alındı.

1.füzyona ait sayısal veriler çizelge 4.1.'de gösterilmektedir.

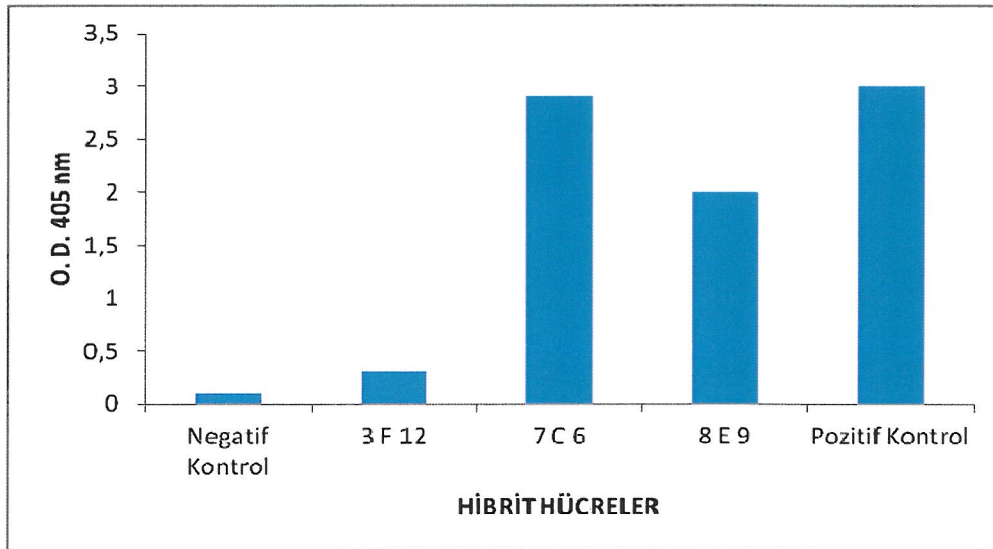
Çizelge 4.1. SEA+SEB Antijeni ile İmmünizeli Farelerle Gerçekleştirilen 1. Füzyona Ait Sayısal Veriler

HÜCRE	SAYI
F0 Myeloma	100.000.000
Dalak	225.000.000
Toplam Hibrit	89
SEA Antijenine Antikor Üreten Aktif Hibrit	(7C6), (8E9), (3F12)
SEA Antijenine Özel Antikor Üreten Hibrit	0

1. Füzyondan elde edilen hibrit hücreler dolaylı ELISA testi ile taranmıştır.

Bu füzyonda, inverted mikroskop taramalarında toplam 89 klon belirlenmiştir. Taramalarda hibrit klonlar büyüme periyoduna bağlı olarak farklı günlerde test edilmiştir. İlk etapta büyük klonlar test edilmiştir. Küçük klonlar takip edilerek, büyümesi beklenmiş ve belli büyüme oranına erişince antikor aktivitesi yönünden ELISA sisteminde test edilmişlerdir.

Tüm klonlar en az iki kere test edilerek aktiviteleri onaylanmıştır. Dolaylı ELISA sonucunda; 3F12 (zayıf), 7C6 (yüksek) ve 8E9 (yüksek) isimli hibritlerde aktivite tespit edilmiştir. (Şekil 4.6.)



Şekil 4.6. SEA Antijenine Antikor Üreten Hibrit Hücrelerin Dolaylı ELISA Sonuçları. (Diğer hibritlere ait sonuçlar; O.D. 405 değerleri <0,1- 0,2 arasında olduğu için grafikte gösterilmemiştir)

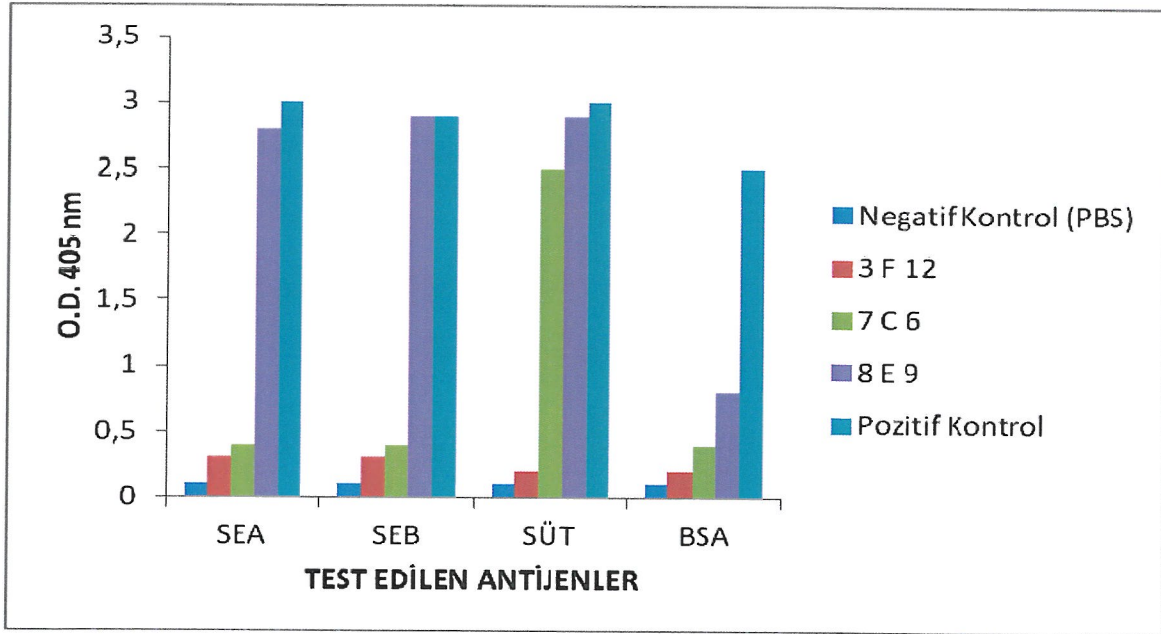
Aktif klonlar, daha büyük hücre kültür plaklarına (24 gözlü kostar, 75 cm² şişe, 150 cm²) aktarılarak çoğaltılmış ve herhangi bir kontaminasyon riskine karşı, hızlı bir şekilde dondurularak öncelikle -70°C’de bir gece bekletildikten sonra -196°C’de sıvı azot tanklarına kaldırılmışlardır.

Bir yandan da aktif hücrelerin ürettiği antikorların SEA antijenine özgün olup olmadığını belirlemek amacıyla, SEB antijeni ve bu testin yapılacağı materyal olan süt ve süt içindeki proteinlerle çapraz etkileşimini görmek için bir dizi ELISA çalışmaları gerçekleştirildi. Bu kapsamda, aktivite belirlenen 3F12, 7C6 ve 8E9 isimli hibritlerle çapraz (cross) reaksiyon ELISA testi yapıldı.

Füzyon-1 Çapraz (Cross) Reaksiyon ELISA Testi:

SEA antijenine antikor üreten hibrit hücre üst sıvılarının özgünlüğünü belirlemek için diğer SE ve proteinlerle gerçekleştirilen çapraz reaksiyon ELISA testi Şekil 4.7.’de görülmektedir.

Çapraz reaksiyon ELISA testi için 96 kuyuluk plaklara ayrı ayrı SEA (10ng/kuyu), SEB (10ng/kuyu), süt (direkt) ve BSA (100ng) molekülü kaplanmış. 3F12, 7C6, ve 8E9 isimli hücre üst sıvıları her bir kaplı antijen ile (SEA, SEB, süt, BSA) test edildi.



Şekil 4.7. SEA Antijenine Antikor Üreten Hibrit Hücrelerin Üst Sıvılarının Diğer Antijenler ile Karşılaştırmalı Reaksiyonları

ELISA sonucunda, 3F12 ve 7C6 isimli kuyulardaki hibritlerin aktivitelerini kaybettiği gözlemlendi. 8E9 isimli klona ait antikorların süt içerisinde bulunan diğer proteinlerle çapraz

etkileşim gösterdiği belirlendi. 8E9 isimli hibrite ait antikorların; SEA, SEB, süt ve BSA ile çapraz reaksiyon verdiği belirlendi.

Bu füzyon çalışmasında elde edilen hibrit hücrelere ait antikorların SEA'ya özgün olmadıkları için füzyon çalışmaları diğer farelerle sürdürüldü.

2. FÜZYON ÇALIŞMASI:

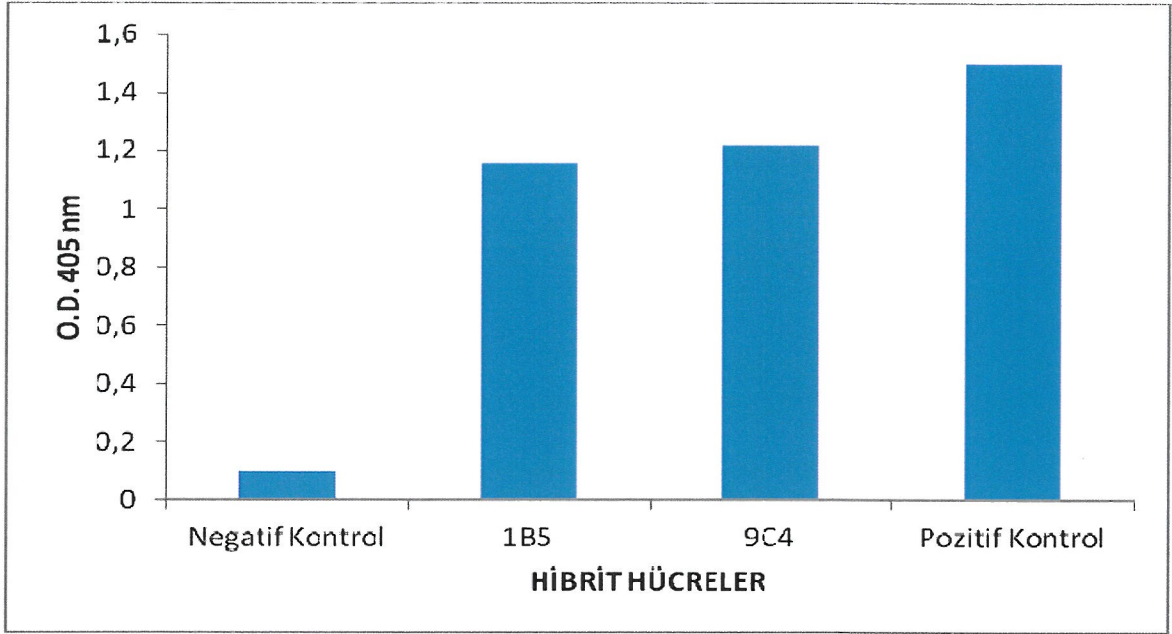
Bir nolu kafeste yer alan sağ kulağı kesik fare füzyona alındı (2 µg SEA+2 µg SEB ile immünize edilmiş fare).

Bu füzyona (2. Füzyon) ait sayısal veriler Çizelge 4.2'de görülmektedir.

Çizelge 4.2. SEA Antijeni ile İmmünizeli Farelerle Gerçekleştirilen 2. Füzyona Ait Sayısal Veriler

HÜCRE	SAYI
F0 Myeloma	188.000.000
Dalak	578.000.000
Toplam Hibrit	732
SEA Antijenine Antikor Üreten Aktif Hibrit	2 (9C4, 1B5)
SEA Antijene Özel Antikor Üreten Hibrit	0

Bu füzyonda toplam 732 adet hibrit hücre elde edilmiştir. Hücre takip çalışmaları 1. füzyonda olduğu gibi gerçekleştirildi. Dolaylı ELISA taramalarında, 1B5 ve 9C4 isimli hibrit hücre üst sıvılarından SEA antijenine karşı antikor yanıtı alındı (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. SEA Antijenine Antikor Üreten Hibrit Hücrelerin Dolaylı ELISA Sonuçları: (Diğer hibritlere ait sonuçlarının O.D. 405 nm değerleri < 0,1-0,2 arasında olduğu için grafikte gösterilmemiştir)

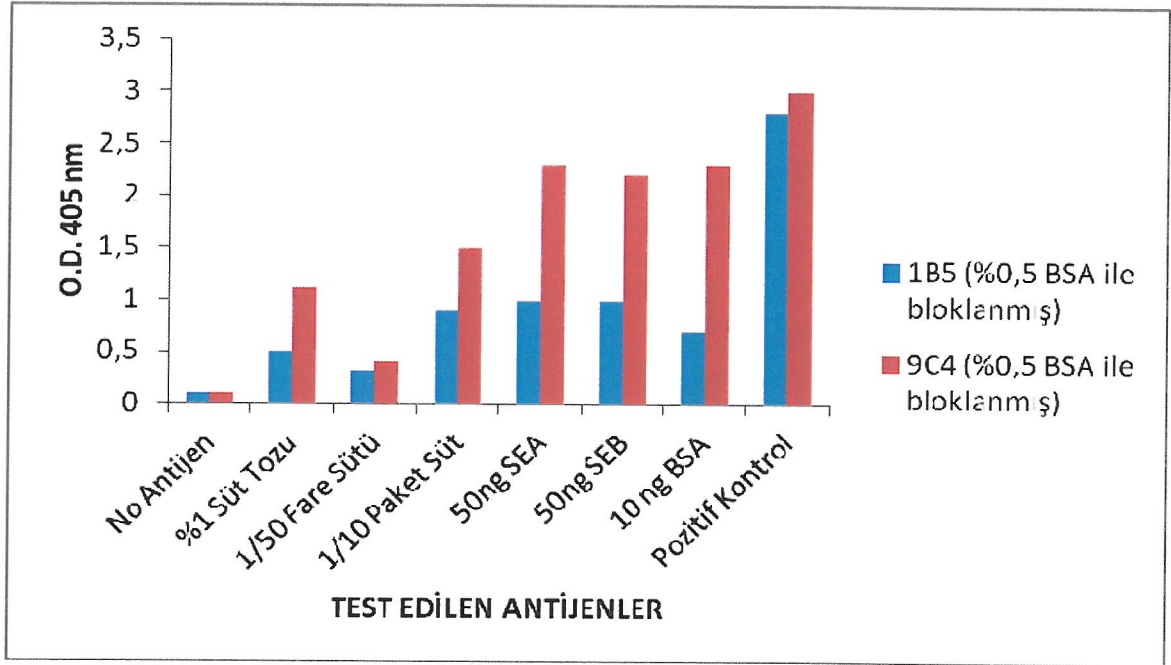
Antikor aktivitesi belirlenen 9C4 ve 1B5 isimli hibrit hücreler, çapraz reaksiyon testlerinin gerçekleştirebilmesi için daha büyük hücre kaplarına alındı.

Çapraz reaksiyon testi 1. füzyonda gerçekleştirilen teste benzer uygulandı. Bu kapsamda 9C4 ve 1B5 isimli hibrit hücrelere ait antikor içeren üst sıvılar; SEA, SEB, süt çeşitleri, BSA ve süt tozu ile kaplı ELISA plaklarda antikorun SEA antijenine özgünlüğünü belirlemek için test edildi.

Füzyon– 2 Çapraz Reaksiyon ELISA Testleri:

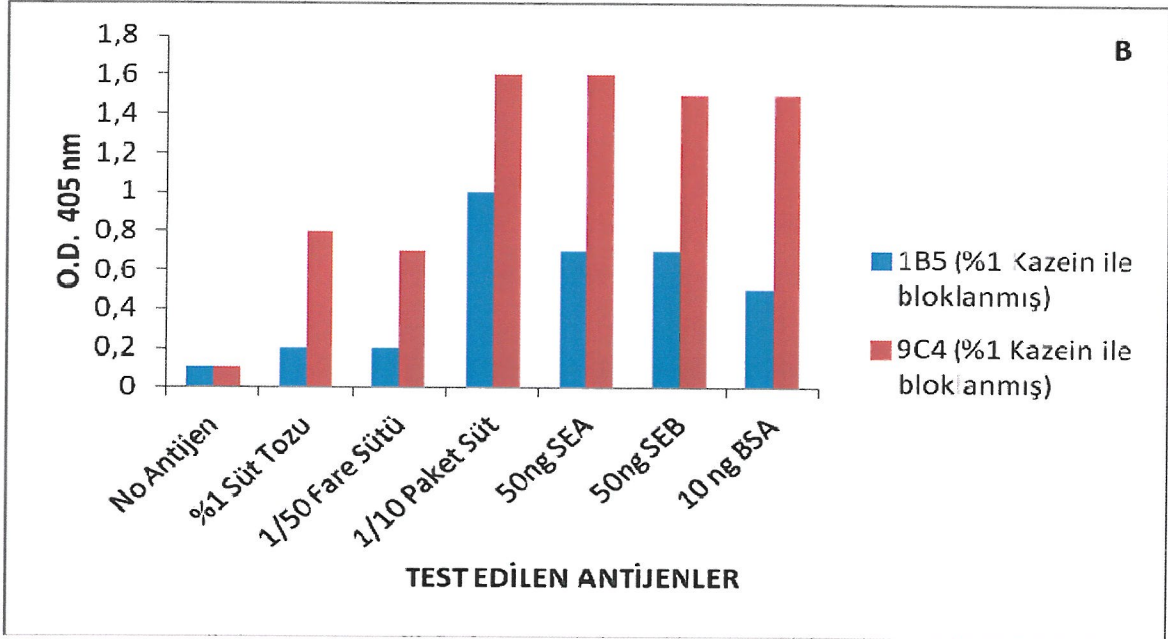
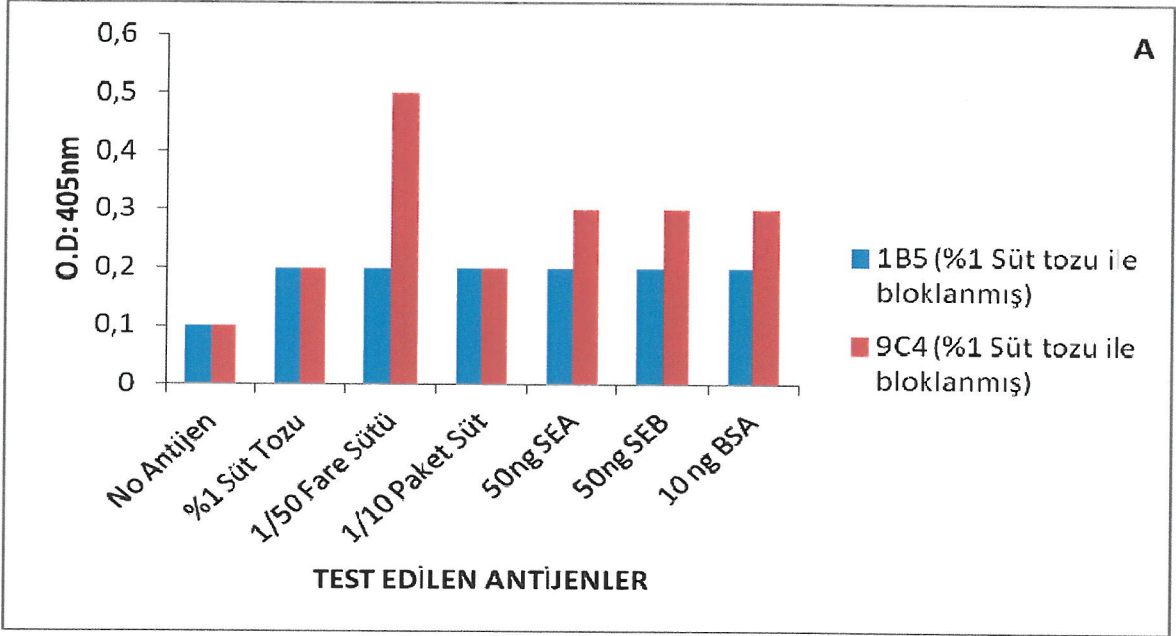
2. Füzyonda elde edilen 1B5 ve 9C4 isimli hücrelerin ürettiği antikorların diğer SE ve proteinlerle çapraz etkileşimi incelenmiştir.

Füzyon 2'ye ait çapraz reaksiyon sonuçları Şekil 4.9.'de görülmektedir.



Şekil 4.9. SEA Antijenine Antikor Üreten 1B5 ve 9C4 Hücre Üst Sıvılarının Diğer Antijenler ile Karşılaştırılmalı Reaksiyonları

Yapılan ELISA uygulaması sonucunda; hem 1B5 hem de 9C4 isimli kuyularda bulunan klonların, sütte bulunan diğer tüm proteinlerle de etkileşime girerek non spesifik bağlanmalar yaptığı gözlenmiştir. Bu spesifik olmayan bağlanmada; bloklama tamponunun etkinliğini araştırmak üzere, bloklama molekülü olarak kullanılan BSA'nın yerine iki farklı bloklama molekülü denenmiştir. Bu kapsamda 1B5 ve 9C4 hücre üst sıvıları ile yeni çapraz ELISA çalışması yapılmıştır. Bu testte 2 ayrı ELISA plağı kullanılarak, bloklama aşamasında plaklardan bir tanesi süt tozu diğeri ise kazein molekülleri ile doyurularak hücre üst sıvıları test edilmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. 1B5 ve 9C4 Hücre Üst Sıvılarının, Dolaylı ELISA Testinde 2 Farklı Bloklama Tamponu Kullanılarak Test Edilmesi. A: Süt Tozu ile Bloklama, B: Kazein ile Bloklama

Dolaylı ELISA çalışmasında; SEA antijeninin ELISA plaklara kaplanması sonrası boşlukları doyumak için süt tozu kullanıldığında hücrelere ait antikorların, plaktaki antijenler ile etkileşime girmediği gözlemlendi. Bloklama çalışmalarında süt tozunun uygun olmadığına karar verildi. Kazein ile bloklanmış plaklarda ise BSA ile doyurulmuş plaklarda olduğu gibi 1B5 ve 9C4 isimli hücre üst sıvılarında yer alan antikorların karşılaştırma yapılan diğer antijenler ile reaksiyona girerek non spesifik bağlanmalar yaptığı gözlemlendi. Bu hücrelerin ürettiği antikorların SEA antijenine özgün olmadığı,

proteinlerdeki ortak bir epitopa karşı gelişen bir antikor özelliğinde olduğu düşünülerek bu hibrit hücreler kullanılmayarak göz ardı edildi. SEA antijeni ile bağışıklanmış diğer farelerle çalışmalar sürdürüldü.

3. FÜZYON ÇALIŞMASI:

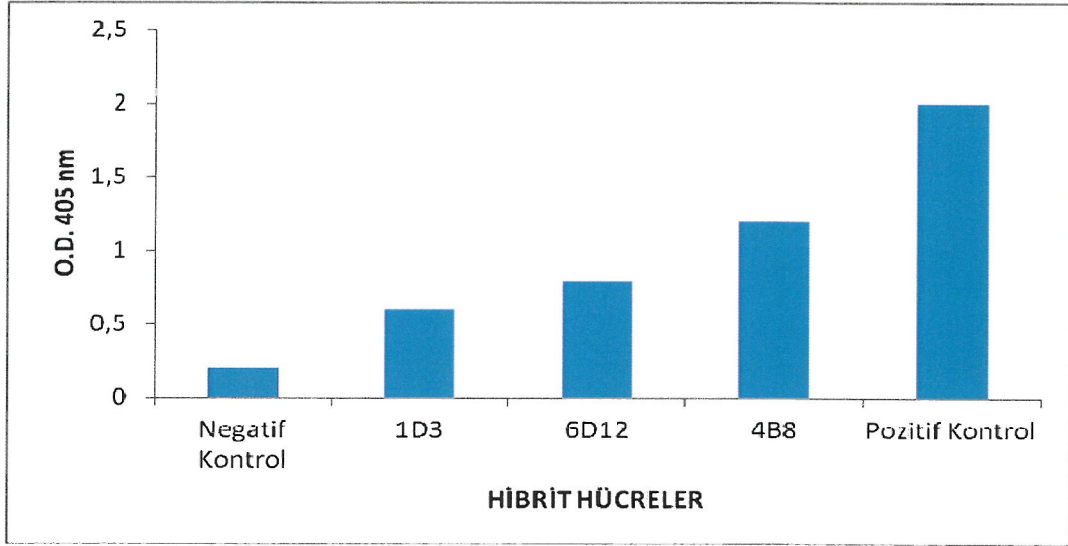
2 Nolu kafesteki (2µg SEA ile immünize edilen), normal kulak (kulağı işaretli) olan fare füzyona alındı.

Üçüncü füzyona ait sayısal veriler çizelge 4.3.'de görülmektedir.

Çizelge 4.3. SEA Antijeni ile İmmünizeli (2µg SEA) Fare ile Gerçekleştirilen Üçüncü Füzyona Ait Sayısal Veriler

HÜCRE	SAYI
F0 Myeloma	71.500.000
Dalak Hücre	405.000.000
Toplam Hibrit	54
SEA Antijenine Antikor Üreten Aktif Hibrit	3; (1D3), (4B8), (6D12)
SEA Antijene Özel Antikor Üreten Hibrit	1D3

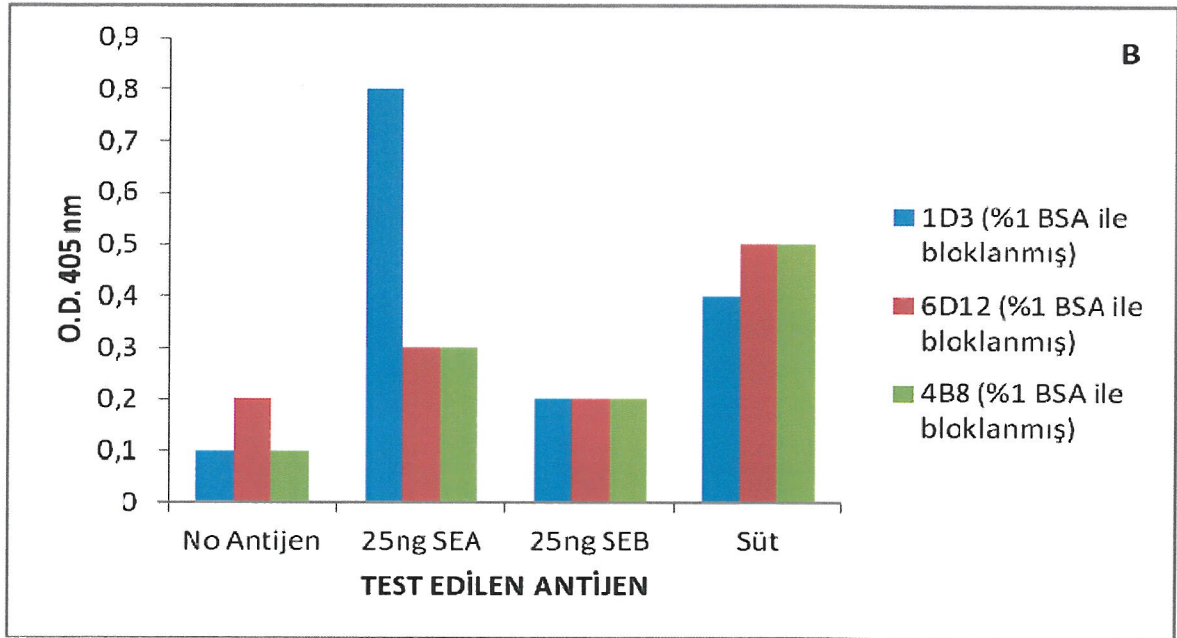
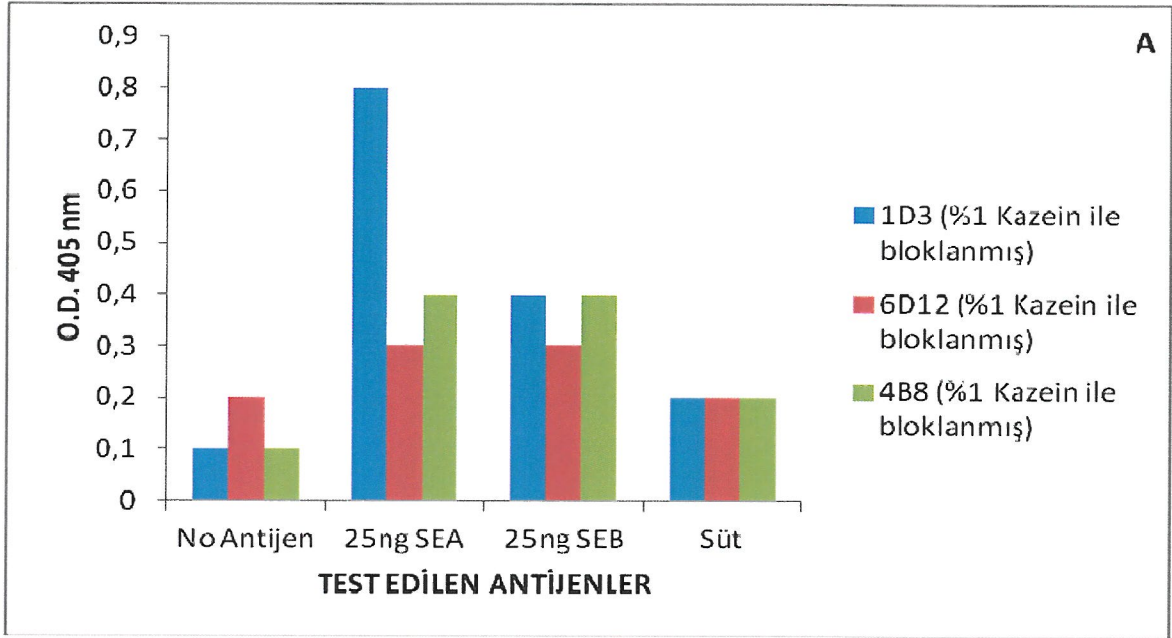
Bu füzyonda toplam 54 adet hibrit hücre elde edildi. Hücreler diğer füzyonlarda olduğu gibi takip edildi. Dolaylı ELISA taramalarında 1D3, 4B8, 6D12 isimli hücre üst sıvılarında SEA antijenine karşı antikor yanıtı elde edildi (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11 3. Füzyonda Elde Edilen SEA Antijenine Antikor Üreten Hibrit Hücrelerin Dolaylı ELISA Testi

(Diğer hibritlere ait sonuçların O.D. 405 nm değerleri < 0,1-0,2 arasında olduğu için grafikte gösterilmemiştir.)

Bu hücelere ait antikorların, diğer antijenlerle etkileşimini görmek için çapraz reaksiyon ELISA testi yapıldı. Diğer çapraz ELISA testlerinde olduğu gibi 1D3, 6D12 ve 4B8 hücre üst sıvıları SEA, SEB ve süt protein antijenleri ile test edildi. Çapraz ELISA çalışmasında kazein ve BSA molekülü ayrı ayrı bloklama tamponu olarak denendi. (Şekil 4.12.) .



Şekil 4.12. 1D3, 4B5 ve 6D12 Hücre Üst Sıvılarının Diğer Antijenler ile Karşılaştırılmalı Reaksiyonları A: Kazein ile Bloklama, B: BSA ile Bloklama

Dolaylı ELISA sonucunda; her iki bloklama (kazein ve BSA) ile test edilen 6D12 ve 4B8 isimli hibritlerin antikor kaybettiği, 1D3 isimli hibritin ise hem aktivite gösterdiği hem de sadece SEA antijenini tanıdığı gözlemlendi.

1D3 İsimli klona 2 kez sınırlı seyreltme çalışması yapıldı. Bu amaçla hücreler sayılarak, her bir kuyuya tek hücre düşecek şekilde 96 kuyuluk ELISA plaklara dağıtıldı. Tek hücre düşen tüm kuyular tekrar dolaylı ELISA testi ile test edilerek antikorların SEA

antijeni ile etkileşimleri takip edildi. Tek klonu düşürülen ve ELISA testlerinde aktiviteleri belirlenen 1D3 klonu uzun süreli muhafaza edilmek üzere $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıvı azot tanklarında saklanmıştır.

Monoklonal antikor saflaştırması için amonyum sülfat çöktürme ve daha ileri aşama olan protein-G İmmünoafinite kolonu çalışmaları SEA antijeni tükendiği için devam edilemedi.

Monoklonal antikorun karakterizasyonu çalışmalarında; SEA antijenine özgün 1D3 monoklonal antikorun, immüoglobulin tipini belirlendi. Roche firmasından temin edilmiş olan antikor alt tipleri belirleme (subisotyping) kiti ile yapılan çalışmada; 1D3 isimli monoklonal antikorunun immüoglobulin tipinin IgG1, hafif zincirinin ise κ (kappa) tipinde olduğu belirlendi (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. 1D3 Kodlu Klonların İmmüoglobulin Tiplendirilmesi

5. TARTIŞMA:

Georges Kohler, Secar Milstein ve Niels Kaj Jerne 1984 yılında geliştirdikleri monoklonal antikor teknolojisi ile Nobel ödülü aldılar. İmmünize edilmiş farenin dalağında elde ettikleri B lenfosit hücreleri ile fare myeloma hücrelerini birleştirerek, antijen üzerinde ki tek bir antijenik epitopa karşı sonsuz sayıda antikor üreten hibrit hücreler elde ettiler. 1984 yılında ki Nobel ödülünden sonra monoklonal antikorlar hastalıkların teşhis ve tedavisinde çok önemli bir rol oynamaya başladı.

Monoklonal antikorlar; birçok hastalığın önlenmesinde önemli bir yere sahip olan aşuların yapımında kullanıldığı gibi hastalık etmeni patojenlerin, toksinlerin ve hormonların tespitinde de kullanılan önemli moleküllerdir.

Monoklonal antikor üretimi; hedef moleküle (antijene) özel B lenfosit hücrelerinin hazırlanması, bu hücrelerin myeloma hücreleri ile birleştirilerek hibrit hücrelerin oluşturulması, monoklonal antikor üreten hibrit hücrelerin limited dilüsyon ile eldesi ve elde edilen bu hücrelerin geniş ölçekte üretilmesi süreçlerini içerir.

Tüm bu süreçlerin içerisinde; antijenin seçimi, antijenin gerekli ise çeşitli işlemlere tabii tutulması (enzimatik kesim, taşıyıcı bir molekül ile konjuge edilmesi v.b.), immünojeniteyi arttırmak için adjuvan seçimi, adjuvan-antijen miktarlarının belirlenmesi, immünizasyon sürelerinin-şekillerinin ayarlanması, dolaylı ELISA plak kaplamada ki antijen miktarının belirlenmesi, bloklama materyalinin-yüzdesinin belirlenmesi, enzim işaretli uygun konjugatın-yüzdesinin belirlenmesi ve ilgili substratın kullanılması oldukça önemlidir.

Tez çalışmasında, SEA antijeni ticari olarak temin edildi. Farelere ilk üç immünizasyon intraperitoneal, dördüncü immünizasyon ise intravenöz ve sistemik olarak gerçekleştirildi. Birinci immünizasyon, bağışıklık sistemini çok hızlı bir şekilde harekete geçirmek için Complete Freund's Adjuvant (CFA) ile yapıldı. İkinci ve üçüncü immünizasyonlar aynı şekilde bağışıklık sistemini harekete geçirmek için Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) ile yapıldı. Füzyondan 4 gün önce antijen, adjuvansız bir uygulama ile farelere son kez hatırlatma yapılarak füzyon işlemi gerçekleştirildi

Aktif olarak istenilen antikoru üreten immünize bir farenin dalak lenfositleri ile hücre kültüründe hızla çoğalabilen ve ölümsüzlük özelliği kazanmış myeloma (kanser) hücreleri PEG varlığında birleştirildi. Sonuçta; bir den fazla epitop içeren bir antijenin tek bir epitopuna karşı monoklonal antikor üreten, ölümsüz hibrit hücreler elde edildi. Bu hücreler hücre kültür sistemine alındıklarında bir fabrika gibi sürekli monoklonal antikor üretmektedir.

Tez çalışmasında; SEA ve SEB ile mix olarak immünize edilen kafeste. SEA antijenine karşı yanıt alınır iken SEB'e karşı yanıt alınamamasının sebebi olarak; SEB antijeninde Glu 67 ile MHC II'deki Lys 39 aminoasitlerinin etkileşimi sonucu oluşan, SEB ile MHC II kompozisyonuna yüksek kararlılık sağlayan tuz köprüsü olması ve SEB'deki; Glu 67, Asp 209, Glu 67, Try 89, Ser 96 aminoasitlerinin sırası ile MHC Class II'deki; Lys 39, Gln 57, Lys 39, Lys 39, Ala 64 aminoasitleri ile etkileşime girerek SEB ve MHC II arasında bağlantı bölgesi oluşturması olduğu düşünülmektedir (Stuart, 1979).

Çalışmamızda, ATCC CRL 1646, F0 myeloma hücreleri ticari olarak temin edildi. Üç ayrı füzyon çalışması gerçekleştirildi. Üçüncü füzyonda, SEA antijenine karşı özgün antikor üreten hibrit hücre elde edildi. 1D3 isimli hibrit hücrelerinin ürettiği antikorların diğer proteinler ile çapraz reaksiyon vermediği gözlemlendi. Shrayer ve arkadaşları-Meyer ve arkadaşları yüksek sayıda monoklonal antikor üreten hibrit hücreler elde ettikleri füzyon çalışmalarında; farklı olarak F0 myeloma hücreleri yerine B16 F10 ve P3-X63-Ag8.653 türü myeloma hücreleri ile füzyon yaptıkları gözlemlenmiştir (Shrayer, 1998; Meyer,1984).

1D3 hibrit hücrelerinin oluşturduğu antikor cevabından yola çıkılarak bu hücrelerden SEA'ya karşı daha fazla sayıda özgün antikor elde edilebilmesi amacıyla hibrit hücrelerin geniş ölçekte üretimi yoluna gidildi. İlk etapta 1D3 hibrit hücreleri; küçük hacimli kültür kaplarında üretildi, yeterince çoğalan hibrit hücreler öncelikle küçük hacimli hücre kültür kaplarına ve sonrasında büyük hacimli hücre kültürü şişlerine çoğaltılmak üzere aktarıldı. Bu arada monoklonal antikor üreten hücre elde edebilmek amacı ile sınırlı seyreltme işlemi yapıldı.

Bağışıklanacak model hayvan olarak BALB/C türü fareler kullanıldı (Bin, 2010). Bağışıklama işlemleri sonrasındaki ilk 2 füzyonda durağan bir aktivite kaydedilmez iken, üçüncü füzyonda 1D3 isimli hibrit hücrelerinin aktivitesini koruduğu görüldü. Buna karşın; Shrayer, Stiles ve Huan'ın C57/BL6 fare türlerini ve tavşanları bağışıklama modeli olarak kullandıkları çalışmada ise füzyon sonrasında hibrit hücrelerin durağan bir yüksek aktivitede oldukları görüldü (Stiles,1993; Shrayer,1998; Huang,1997).

Çalışmalarımızda, monoklonal antikor üretmeleri için fareler dört kez immünize edildi. Bir numaralı kafeste ki fareler 2 µg SEA ve 2 µg SEB ile mix olarak immünize edildi. İki numaralı kafesteki fareler, 2 µg SEA ve üç numaralı kafesteki fareler 4 µg SEA antijeni ile immünize edildi. Bu immünizasyonların sonucunda SEA'ya karşı farelerden antikor aktivitesi elde edilirken, SEB'e karşı antikor aktivitesi elde edilemedi. Bin ve arkadaşların yapmış oldukları çalışmada ise SEA'ya karşı yüksek antikor aktivitesi tespit edilmiştir. Çalışmamızda, Bin ve arkadaşlarının elde ettiği yüksek antikor aktivitesinin

görülememesinin nedeni olarak, Bin ve arkadaşlarının immünizasyonda kullandıkları yüksek antijen miktarının olmadığını ön görmekteyiz. Çünkü 3. Kafesteki fareye uygulanan immünizasyon periyodunda artırılarak kullanılan antijen miktarının aktivitede etkili olmadığı görülmektedir. Bin ve arkadaşlarının çalışmalarında, tez çalışmasından farklı olarak immünizasyon sayısı 5 ve farelerin son hatırlatma işlemi intrasplenik olarak uygulanmıştır (Bin, 2010).

SEA'nın bulunduğu ortamda CFA, B hücrelerinin stimülasyonunu sağlayarak T hücrelerini aktive etmektedir. Her bir immünizasyondan sonra, immün cevap dolaylı ELISA yöntemi ile kontrol edildi.

Füzyondan yaklaşık 10 gün sonra sararmakta olan hibrit hücreler mikroskop ile belirlenerek, uygun olan hücreler için aktivite testi gerçekleştirildi. Füzyon çalışmalarında birinci füzyonda üç adet; ikinci ve üçüncü füzyon sonuçlarında ise sırası ile iki ve üç adet aktif hibrit elde edildi. Ancak sadece 1D3 isimli klonun SEA antijenine özgün monoklonal antikor üreten hibrit hücre olduğu belirlendi.

Sınırlılıklar:

Tezimizin konusu olan toksin SEA'nın Ülkemize girişi, bu toksinlerin olası biyolojik savaşlarda kullanılması ve oluşturdukları sağlık riskleri sebebi ile kısıtlanmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER:

Çalışmamızda, her birinde ikişer adet BALB/c türü farelerin bulunduğu üç kafesteki toplam altı adet fare immünizasyona tabii tutuldu ve aktivitenin tespit edildiği üç adet fare füzyona alındı. Birinci kafesteki normal kulaklı fare ile yaptığımız birinci füzyonda sonucunda 7C6, 8E9, 3F12 isimli üç adet aktif hibrit elde edildi. Bu hibritlerden; 3F12 ve 7C6 isimli klonların antikor aktivitelerini kaybettiği, 8E9 ise SEA, SEB, süt ve BSA ile çapraz reaksiyon verdiği görüldü. Birinci kafesteki sağ kulağı kesik fare ile yaptığımız ikinci füzyon sonucunda 9C4 ve 1B5 isimli iki adet aktif hibrit elde edildi. Bu hibritlerden hem 1B5 hem de 9C4'ün non spesifik bağlanmalar yaptığı gözlemlendi. İkinci kafesteki normal kulak fare ile yapılan üçüncü füzyon sonucunda ise; 1D3, 6D12 ve 4B8 isimli üç adet aktif hibrit elde edildi. Bu hibritlerden; 6D12 ve 4B8 isimli hibrit hücrelerin antikor aktivitelerini kaybettiği, 1D3 isimli hibrit hücrenin hem antikor aktivitesini koruduğu hem de sadece SEA antijenini tanıdığı görüldü. Füzyon sonucunda en yüksek aktiviteyi 2. Kafeste bulunan, 2 µgr SEA ile immünize edilen, kulakları normal olan farenin verdiği tespit edildi.

Çalışmamızda elde edilen SEA'ya karşı geliştirilen bu antikorlar ile sütteki SEA'nın tespiti için antijen-antikor ilişkisine dayalı, hızlı, basit, güvenilir ve hassas tanı sistemlerinin geliştirilmesi mümkün olacaktır. Elde ettiğimiz antikorlar sonucunda geliştirilecek olan antijen-antikor ilişkisine dayalı test sistemleri, sütteki SEA'ların yanı sıra et ve et ürünlerindeki SEA'nın tespitinde kullanılabilir olacaktır.

İleriki çalışmalarda, hayvanlardan daha yüksek aktivite alabilmek için BALB/c türü fareler yerine C57/BL6 türü farelerin kullanılmasının yararlı olabileceği düşünülmektedir (Stiles, 1993; Shroyer, 1998; Huang, 1997). Ayrıca immünizasyon sayısının artırılması ve son hatırlatma intrasplenik olarak yapılmasının olumlu sonuç verebileceği düşünülmektedir (Bin, 2010).

Çalışmamızda beklenenden daha az sayıda aktif klon elde edildiği için; sorunun çözümüne yönelik, füzyonda F0 myeloma hücreleri yerine B16 F10 ve P3-X63-Ag8.653 türü myeloma hücreleri ile çalışma yapılması öngörülmektedir (Shroyer,1998; Meyer, 1984).

Bundan sonraki çalışmalarda; SEA toksinini alamadığımız için, *staphylococcus aerus* bakterisinin A87 0502 suşunun temin edilmesiyle, SEA'nın izole edilmesine yönelik çalışmaların olumlu olacağı düşünülmektedir (Nelianne, 2010).

KAYNAKLAR

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (2000) Cellular and Molecular Immunology. WB Saunders Co, Philadelphia.
- Akkor M. (2003) Hepatit B yüzey antijenini taklit eden anti idiyotipik monoklonal antikorların hibridoma teknolojisi ile üretilmesi. Yüksek lisans tezi. Marmara Üniversitesi. İstanbul
- Altun B., Besler T., Ünal S. (2002) Ankara' da satılan sütlerin değerlendirilmesi. Sted, 11(2): (51-52)
- Antonnette A., Gilbert R. J. , Gilbert W (1989) The use of a sandwich ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxin A in foods from outbreaks of food poisoning. Food Hygiene Laboratory, Central Public Health Laboratory, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT.
- Atanassova V., Meindl A., Ring C (2001) Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. J Food Prot, 63, 1144-1153.
- Balaban N., Rasooly A (2000) Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol, 61, 1-10
- Bergdoll M. S. (1989) *Staphylococcus aureus*. 463-523. In: MP Doyle (Ed), Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York
- Betley M.J., Mekalanos J. J. (1985) Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. Science, 229, 185-187.
- Betley M. J. , Mekalanos J. J. (1988) Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. J Bacteriol, 170, 34-41.
- Bilgehan, H. (2000) Klinik Mikrobiyolojik Tedavi. Baris Yayınları 3.Baskı, Bornova, İzmir.
- Bin L., Yongxia Z., Aiping L., Youxiang Z., Fusheng C., Xiaohong W. (2011) Production of a Monoclonal Antibody by Simultaneous Immunization of Staphylococcal Enterotoxin A and B. Appl Biochem Biotechnol DOI 10.1007/s12010-011-9177-3.
- Borst DW, Betley MJ, Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression correlate with sea allele class. Infect Immun 1994; 62: 113-118.
- Buzby JC, Roberts T (1997): Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness. World Health Stat Q 50, 57-66.
- Brum G, Mckane L, Karp G (1994) : Biology: Exploring Life 2nd Edition. pp.646-658 John Wiley& Sons, Inc.
- Cookson, B., Schmitz, F.J. and Fluit A.C. 2003. Introduction to MRSA. In, MRSA: Current Perspective. Eds. A.C. Fluit, F.J. Schmitz. Horizon Scientific Press, 340pp.
- Çayan, H.H. 2000. *Staphylococcus aureus* Toksinlerinden Alfa-Toksinin Yeni Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Bilim Uzmanlığı Tezi, (basılmamış), 46 s.
- Cretenet M. , Even S. , Le Loir Y.(2011): Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. Dairy Sci. & Technol. (2011) 91:127–150
- Cummings M.R. (1996) : Biology:Science and Life. pp.407-421 West Publishing Company, New York.

Donovan J, Brown P (1995) : *Current Protocols in Immunology* 1.0.3-1.0.6 Copyright © 1995 by John Wiley & Sons, Inc. Vol. 1, Unit 2.

Edwin C. (1989) : Quantitative Determination of Staphylococcal Enterotoxin A by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using a Combination of Polyclonal and Monoclonal Antibodies and Biotin-Streptavidin Interaction. Channing Laboratory, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115

Erol İ, İseri Ö, Stafilokokal Enterotoksinler A.Ü. Veteriner fakültesi dergisi 2004;51:239-245. Harris TO, Grossman D, Kappler JW, Marrack P, Rich RR (1993): Lack of complete correlation between emetic and T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. *Infect Immun*, 61, 3175-3183.

Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdoll MS (1988): Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int J Food Microbiol*, 7, 311-316.

Fey H. , Pfister H. , Ruegg O. (1983) : Comparative Evaluation of Different Enzyme Linked Immunosorbent Assay Systems for the Detection of Staphylococcal Enterotoxins A, B, C, and D. Veterinary Bacteriological Institute of the University of Bern, CH-3001 Bern, Switzerland.

Freed R. C. , Evenson M. L. , Reiser R. F. , MERLIN S. Bergdoll M. S. (1982) : Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Foods. Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin 53706

Halpin-Dohnalek MI, Marth EH (1989): *Staphylococcus aureus*: Production of extracellular compounds and behavior in foods- A review. *J Food Prot*, 52, 267-282.

Holmberg SD, Blake PA (1984): Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. *J Am Med Assoc*, 251, 487-489.

Huang S. Y. , Hughes J. L. , Bergdoll M. S. , Schantz E. J. (1987) : Complete Amino Acid Sequence of Staphylococcal Enterotoxin. Peptide Chemistry Department, Smithkline Beckmun Corporation, Palo Alto, California 94304 and the Food Research Institute, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin 53706

Huang WT, Lin MT, Won SJ. Staphylococcal enterotoxin A induced fever is associated with increased circulating levels of cytokines in rabbits. *Infect Immun* 1997; 65: 2656-62

Irina V Pinchuk, Ellen J. Beswick, Victor E. Reyes (2010) : Staphylococcal Enterotoxins, Galveston

Jablonski LM, Bohach GA (1997): *Staphylococcus aureus*. 353-375. In: Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. MP Doyle, LR Beuchat, TJ Montville (Eds), ASM Press, Washington DC

Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2005) : Part IV The Adaptive Immune Response, Immunobiology 6th Ed Garland Science Publishing, New York.

Jay JM (1996): Staphylococcal gastroenteritis. 429-450. In: Modern Food Microbiology. 5th ed., New York.

Jones, T.A., Zou, J.-Y., Cowan, S.W. and Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr.*, A47, 110-119.

Jorgensen H.J, Mathisen T, Lovseth A, Omeo K, Ovale K.S, Loncarevic S, An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk *Fems Microbiol Lett* 2005; 15:252(2):267-72.

Kısa Ö, Albay A, Erol İ ve ark. Kremalı pastalardan izole edilen koagülaz pozitif stafilokokların enterotoksin oluşturma özelliklerinin VIDAS yöntemiyle belirlenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Dergisi* 1996; 43: 405-411

Kloos, W. and Bannerman, T.L. (1995). Staphylococci and Micrococci. In; Manual of Clinical Microbiology, 6th Ed. Eds. P.A. Murray, B.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.H. Tenover. ASM Press, Washington D.C, 1482 pp.

Koneman, E. W., S. D. Allen, M. W. Janda, C. S. Paul, W. C. Winn (1997): Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Fifth Edition

Krakauer, T. (1999): Immune response to staphylococcal superantigens. Immunol Res, 20, 163-173.

Küçükçetin A, Milci S (2007) : *Staphylococcus Aureus* ile kontamine olan peynirlerden kaynaklanan gıda zehirlenmeleri, Antalya.

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. and Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J. Appl. Crystallogr, 26, 283-291.

Litman G, Cannon J, Dishaw L (2005) : Reconstructing immune phylogeny new perspectives. Nat Rev Immunology 5(11) : 866-79

Margaret, A., Stiehm, E.R., 2000. Passive Immunity in Prevention and Treatment of Infectious Diseases. Clinical Microbiology Reviews 13(4) : 602-614

Meyer, R. F., Miller, L., Bennett, R. W., & MacMillan, J. D. (1984). Development of a monoclonal antibody capable of interacting with five serotypes of *Staphylococcus aureus* enterotoxin. Applied and Environmental Microbiology, 47(2), 283-287.

Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Decastelli L, Mioni R, Scuota S, Bolzoni G, Di Giannatale E, Salinetti A.P, La Salandra G, Bartoli M, Zuccon F, Pirino T, Sias S, Parisi A, Quaglia M.C, Celano G.V. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. Journal of Food microbiology 2005;98:73-79.

Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu, D-L, Ueda S, Shinagawa K (2002): Detection of seg, seh, and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring seg, seh, or sei genes. J Clin Microbiol, 40, 857-862.

Nelianne J (2010) : Immunogenicity of Toxins during *Staphylococcus aureus* Infection. Departments of 1Medical Microbiology and Infectious Diseases and 2Immunology, Erasmus Medical Center, Rotterdam, the Netherlands.

Pancer Z, Copper M (2006) : The evolution of adaptive immunity. Annu Rev Immunol 24 497-518

Pettersson H, Forsberg G (2002): Staphylococcal enterotoxin H contrasts closely related enterotoxins in species reactivity. Immunology, 106, 71-79

Saatçılar Ç (2008).: Monoclonal Antibody Production Against Hepatitis B Core Antigen. Yüksek lisans tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi . İstanbul

Saqi, M.A.S. and Sayle, R. (1994) Pdb motif - a tool for the automatic identification and display of motifs in protein structures. Comput. Appl. Biosci., 10, 545-546

Schad E.M., Zaitseva V.N., Dohisten M., Kalland T., Schlievert P.M., Ohlendorf D.H. and Svensson L.A. (1995) : Crystal structure of the superantigen staphylococcal enterotoxin type A. Embo, 14: (3292-3301)

Shrayer D. P., Koultab N, Hearing V. C., Wanebo H. J. (1998) : Immunization of mice with melanoma cells transfected to secrete the superantigen, staphylococcal enterotoxin A, Cancer Immunol Immunother (1998) 46: 7-13

Skaletsky E. (1997) : Antidiagnostic antibodies as diagnostic antigens IVD technology, pp 24-35

Sospedra I, Soler C, Mañes J, Soriano J. M. (2011) : Analysis of staphylococcal enterotoxin A in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry.

Stiles BG, Bavari S, Krakauer T, Ulrich RG. Toxicity of staphylococcal enterotoxins potentiated by lipopolysaccharide: major histocompatibility complex class II molecule dependency and cytokine release. *Infect Immun* 1993; 61: 5333-8.

Stuart D., Levine M., Muirhead H. and Stammers D. (1979) The crystal structure of cat pyruvate kinase at a resolution of 2.6 Å, *J. Mol. Biol.* 134, pp. 109–142.

Sutherland J, Varnam A (2002): Enterotoxin-producing *Staphylococcus*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*. 384-415. In: CW Blackburn, PJ McClure (Eds), *Foodborne Pathogens*. CRC press, Washington, DC.

Taylor, S.L.; Schlunz, L.R.; Beery, J.T.; Cliver, D.O.; Bergdoll, M.S. (2010) Emetic Action of Staphylococcal Enterotoxin A on Weanling Pigs. *Infect. Immun.* 1982, 36, 1263–1266.

The British Medical Journal (1929) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2450191/pdf/brmedj07635-0047.pdf>. February 16, 1929

Todd ECD (1989): Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the United States. *J Food Prot*, 52, 595-601.

Thompson N. E. , Meenakshu R. , Gerhardt K. , Aschenbach J M. , Evenson M. L. , Bergdoll M. S. (1986) : Detection of Staphylococcal Enterotoxins by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Radioimmunoassays: Comparison of Monoclonal and Polyclonal Antibody Systems. Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin 53706.

Tkaaikova L, Tesfaye A, Mikula I. Detection of the Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxin By PCR. *Acta Veterinaria Brno* 2003; 72: 627–630.

Van de Perre P (2003) : Transfer of antibody mother milk. *Vaccine* 24: 3374-6.

Wieneke A. A. , R. J. Gilbert R. J. (1985) : The use of a sandwich ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxin A in foods from outbreaks of food poisoning. Food Hygiene Laboratory, Central Public Health Laboratory, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT

Yüce, A. 1992. İzmir Yöresindeki Mandıralardan Alınan Çiğ Sütlerde *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* aranması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 101 s, İzmir.

Yılmaz S, (2009). *Kayseri* Bölgesi'nde tüketime sunulan çiğ sütlerde *Staphylococcus aureus* ve *enterotoksin* varlığının araştırılması. Yüksek lisans tezi. Erciyes Üniversitesi. Kayseri

Yücel F, Öztürk S, Akçael E (2010). Hibridoma Teknolojisi ve Antikora Dayalı Tanı Sistemlerinin Geliştirilmesi. Kocaeli, TÜBİTAK.

Yücel Fatıma; Modern Biyoteknoloji ve Uygulamaları Kitap Bölümü: "Hibridoma Teknolojileri", Bölüm 7, Erciyes Üniversitesi Yayınları, : Editör; M. DüNDAR, H.Bağış; 2010, Kayseri, ISBN 978-975-6478-63-9.

<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Teblig/2002-63.html>

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

- Ad Soyadı: Arzu Pınarbaşı
- Doğum Tarihi ve Yeri: 03/01/1977 Karamürsel
- Uyruğu: T. C.
- Medeni Hali: Bekar
- İletişim Adresi: Cumhuriyet Cad. Gülen Eczanesi 41500 Karamürsel/Kocaeli
- Telefon: 0 532 7936860

2. Eğitimi

- Özel Kocaeli İlkokulu (1985)
- Özel Kocaeli Koleji (1990)
- Özel Atafen Fen Lisesi (1995)
- İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2001)
- Özel İnkur Dil Kursu (Almanca) (2001)
- Bournemouth Business School International (MBA Certificate Programme) (2006)
- Kocaeli Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi (Uygulamalı Kök Hücre Kursu) (2008)
- Yeditepe Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi (Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası) (2011)
- Tübitak MAM GMBE (Hibridoma Teknolojisi ve Antikora Dayalı Tanı Sistemlerinin Geliştirilmesi Kursu) (2011)